

2024

Producción y estudios de caracterización de la  
proteína recombinante humana lactoferrina

Beatriz Liliana Álvarez Mayorga



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Producción y estudios de caracterización  
de la proteína recombinante humana Lactoferrina

Que como parte de los requisitos para  
obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta

Beatriz Liliana Álvarez Mayorga

Dirigido por:

Dr. Jorge Luis Rosado Loría

Querétaro, Qro., marzo de 2024



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Producción y estudios de caracterización de la  
proteína recombinante humana Lactoferrina

**por**

Beatriz Liliana Álvarez Mayorga

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** CNDCC-50591



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Doctorado en Ciencias Biológicas



**PRODUCCIÓN Y ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN  
DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE HUMANA LACTOFERRINA**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

**Presenta:**

Beatriz Liliana Álvarez Mayorga

**Dirigido por:**

Dr. Jorge Luis Rosado Loría

Dr. Jorge Luis Rosado Loría  
Presidente  
Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez  
Secretario  
Dra. Angelina Rodríguez Torres  
Vocal  
Dr. Carlos Regalado González  
Suplente  
Dr. José Antonio Cervantes Chávez  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Marzo, 2024  
México

## RESUMEN

Proteínas como la lactoferrina (LF) presente en la leche materna, es una de las proteínas que proporcionan una variedad de ventajas fisiológicas claves para los infantes y que han tomado interés para su producción recombinante. Muchas son las proteínas recombinantes que se pueden producir por medio de la biotecnología en microorganismos, en plantas y en la leche de ganado bovino transgénico. La producción de proteínas debe ser mejorada de sus fuentes nativas o buscar otras nuevas junto con el desarrollo de sistemas de expresión de proteínas eficientes y el avance de los protocolos de extracción de proteínas. En este estudio se produjo la proteína recombinante LF sérica humana en el sistema eucariótico de *Pichia pastoris* (renombrada como *Komagataella phaffii*), utilizando la cepa de levadura transformada con un plásmido previamente caracterizado para la expresión de la hLF, se indujo su producción en un medio de cultivo selectivo, obteniéndose un rendimiento de 0.186mg/mL de proteína excretada al medio. La proteína obtenida, se caracterizó mediante SDS-PAGE, se purificó a partir del medio de cultivo mediante cromatografía de afinidad y se determinaron parámetros termodinámicos mediante espectroscopía de dicroísmo circular (DC). Los espectros obtenidos por DC muestran que a pH alcalino la estructura secundaria de la LF nativa, así como la recombinante, cambia a una estructura desplegada, a pH ácido ambas proteínas precipitan. Mediante la respuesta de DC a diferentes pH y mediante la determinación de parámetros termodinámicos, fue posible proponer que en la producción de LF humana recombinante la forma apo de la proteína podría haberse favorecido en comparación con la LF de origen humano. Para demostrar si una LF recombinante y una LF nativa son comparables en funcionalidad para usarse en productos alimenticios, se deben realizar algunos estudios de seguridad. Sin embargo, el DC puede utilizarse como primera herramienta de inspección en la producción de proteínas recombinantes.

**Palabras clave:** dicroísmo circular; proteínas recombinantes; lactoferrina; *Komagataella phaffii*

## ABSTRACT

Proteins such as lactoferrin (LF) present in breast milk are one of the proteins that provide a variety of key physiological advantages for infants and that have attracted interest for their recombinant production. There are many recombinant proteins that can be produced through biotechnology in microorganisms, in plants and in the milk of transgenic cattle. Protein production must be improved from its native sources or new ones sought along with the development of efficient protein expression systems and the advancement of protein extraction protocols. In this study, the human recombinant protein LF was produced in the eukaryotic system of *Pichia pastoris* (renamed *Komagataella phaffii*), using the yeast strain transformed with a plasmid previously characterized for the expression of hLF, its production was induced in a medium of selective culture, obtaining a yield of 0.186mg/mL of protein excreted to the medium. The protein obtained was characterized by SDS-PAGE, purified from the culture medium by affinity chromatography and thermodynamic parameters were determined by circular dichroism (CD) spectroscopy. The spectra obtained by CD show that at alkaline pH the secondary structure of the native LF, as well as the recombinant one, changes to an unfolded structure, at acidic pH both proteins precipitate. Through the response of CD to different pH and by determining thermodynamic parameters, it was possible to propose that in the production of recombinant human LF the apo form of the protein could have been favored in comparison with native human LF. To demonstrate whether a recombinant LF and a native LF are comparable in functionality for use in food products, some safety studies must be performed. However, CD can be used as a first inspection tool in the production of recombinant proteins.

**Keywords:** circular dichroism; recombinant proteins; human lactoferrin; *Komagataella phaffii*

## DEDICATORIAS

*A mi madre por ser ese apoyo incondicional*

*A mis hijos por siempre estar y ser mi motor para seguir adelante y hacer el  
camino más sencillo*

*José Antonio por enseñarme a creer en mí y no dejarme caer, por siempre estar  
en cada caída y en cada triunfo*

*A mi familia y amigos por formar parte del camino*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Ciencias Naturales por darme el espacio y la oportunidad de realizar los estudios de Doctorado.

Al Dr. Jorge Luis Rosado Loría por la confianza y el apoyo incondicional para la realización de este proyecto, infinitas gracias.

Al comité tutorial, Dr. Sergio Romero Gómez, Dra. Angelina Rodríguez Torres, Dr. José Antonio Cervantes Chávez y Dr. Carlos Regalado González por sus atinadas contribuciones y observaciones al proyecto.

A Violeta por las largas horas de laboratorio, sin ti no hubiera sido posible.

A NUCITEC por todas las facilidades otorgadas para la realización de las actividades de laboratorio.

A la Facultad de Química por permitirme cumplir este objetivo.

## ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
I. INTRODUCCIÓN	12
II. ANTECEDENTES	15
2.1 LECHE MATERNA, HUMANA Y DE OTROS MAMÍFEROS	15
2.2 PROTEÍNAS BIOACTIVAS DE LA LECHE MATERNA	17
2.2.1 Lactoferrina	18
2.3 TECNOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE	22
2.3.1 Sistemas de expresión disponibles para la producción de hLF recombinante.	26
2.3.2 <i>Pichia pastoris</i> ( <i>Komagataella phaffii</i> ) como hospedero en el sistema de expresión	27
2.4 TÉCNICAS MODERNAS DE ANÁLISIS DE ESTRUCTURA Y QUÍMICA DE PROTEÍNAS	29
2.4.1. Métodos tradicionales para la determinación de concentración de proteína.	29
2.4.2. Métodos para el análisis de la química y estructura de proteínas.	32
2.4.2.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)	34
2.4.2.2. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS).	35
2.4.2.3. MALDI-TOF	36
2.4.2.4. Dicroísmo circular	39
III. HIPÓTESIS	50
IV. OBJETIVOS	50
General	50
Específicos	50
V. METODOLOGÍA	51
5.1 OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE hLF PURIFICADA.	51
5.1.1 Construcción del plásmido recombinante para la expresión y la secreción de la proteína recombinante en la levadura <i>P. pastoris</i> .	51
5.1.2 Propagación y conservación de los plásmidos	51
5.1.3 Transformación de la levadura <i>P. pastoris</i> X-33 con el plásmido pGAPZ B linealizado.	52
5.1.3.1 Digestión de los plásmidos	53
5.1.3.2 Preparación de células electrocompetentes de <i>P. pastoris</i> X-33	53
5.1.3.3. Transformación de <i>P. pastoris</i> X-33 mediante electroporación.	54
5.1.3.4 Genotipificación	54
5.1.4 Producción, extracción y purificación de la proteína recombinante hLF.	55
5.1.4.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE)	56



5.2 PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE hLF OBTENIDA, MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA DE DICROÍSMO CIRCULAR.	56
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
6.1. OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE hLF PURIFICADA.	57
6.1.1. Propagación y conservación del plásmido recombinante pGZαLM	59
6.1.1.1. Transformación de células ultracompetentes de <i>E.coli</i> OneShot™ Top10	59
6.1.1.2. Cuantificación del plásmido purificado	61
6.1.1.3. Genotipificación del plásmido purificado	62
6.1.2. Transformación de <i>P. pastoris</i>	66
6.1.2.1. Digestión de los plásmidos	66
6.1.2.2. Electroporación	67
6.1.2.3. Genotipificación de las células transformadas de <i>Picha pastoris</i>	69
6.1.1.4. Producción, extracción y purificación de las proteínas recombinantes	70
6.2 PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE hLF OBTENIDA, MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA DE DICROÍSMO CIRCULAR.	73
6.2.1 Efecto del pH	74
6.2.2 Efecto de la temperatura y parámetros termodinámicos	77
VII. CONCLUSIÓN	81
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

## Índice de tablas

Tabla 1. Aplicación de la tecnología del ADN recombinante .....	24
Tabla 2. Métodos para la determinación de concentración de proteínas .....	31
Tabla 3. Ufc de células transformantes de <i>E. coli</i> Top 10 y sus controles den placa de medio selectivo con Zeocina™ .....	60
Tabla 4. Ufc/placa de las cepas presuntivas transformantes con hLTF en medio selectivo con Zeocina™ en cuatro volúmenes de inóculos probados. ....	68
Tabla 5. Valores de porcentaje de $\alpha$ -hélice de lactoferrina recombinante humana y lactoferrina humana nativa a 30° C variando el pH (7 a 13) del medio (PBS). ....	77

## Índice de figuras

Figura 1. Mapa del plásmido LACTOTRANS-opt, indicando los sitios de clonación. ....	58
Figura 2. Curva de cuantificación del plásmido recombinante pGZαLM LF extraído con el QIAGEN® Plasmid Mini Kit (A) y Maxi Kit (B). ....	61
Figura 3. Esquema de amplificación del plásmido LACTOTRANS-opt.....	62
Figura 4. Patrón de digestión del gen LACTOTRANS-opt con las enzimas <i>Xho</i> I y <i>Xba</i> I. ....	63
Figura 5. Análisis electroforético de los productos de PCR del Miniprep en gel de agarosa al 1 % p/v. Carriles, 1: marcador de peso molecular, 5-6: gen hLTF, 7: control lactoferrina. ....	64
Figura 6. Análisis electroforético de los productos de la digestión doble con las enzimas de restricción <i>Xho</i> I y <i>Xba</i> I en gel de agarosa al 1 % p/v. Carriles, 1: marcador de peso molecular, 3: plásmido purificado pGZαLM LF, 5: control positivo para pGZαLM LF, 6: control negativo. ....	64
Figura 7. Análisis electroforético de los productos de PCR del Maxiprep en gel de agarosa al 1 % p/v. Carriles, 1: marcador de peso molecular, 4: gen hLTF, 5: control lactoferrina, 6: control negativo. ....	65
Figura 8. Análisis electroforético de los productos de la digestión con la enzima <i>Bsp</i> HI en gel de agarosa al 1 % p/v. Carriles, 1: marcador de peso molecular, 2: plásmido pGZαLM LF digerido, 3: plásmido pGZαLM LF sin digerir, 6: control negativo. ....	66
Figura 9. Presuntivas transformantes con hLTF en placas de medio selectivo con Zeocina™ en los cuatro volúmenes de inóculo probados y después de 72 horas de incubación.....	68
Figura 10. Análisis electroforético en geles de agarosa al 1 % p/v de los productos de PCR de las secuencias de nucleótidos que codifican para la proteína rhLF. Carriles, 1: marcador de peso molecular, carriles 2-10: muestras de los productos de PCR para hLTF.....	69
Figura 11. Análisis electroforético SDS-PAGE de los extractos obtenidos del medio de cultivo de las cepas transgénicas de <i>P. pastoris</i> transformadas con el gen hLTF cultivadas en 50 mL de caldo YPD con Zeocina™ a 300 µg/mL. ....	71
Figura 12. Cuantificación de lactoferrina humana recombinante en extracto crudo, y concentrada en tubos AMICON™ Ultracel 10K. ....	72

Figura 13. Análisis electroforético SDS-PAGE de los extractos concentrados en tubo AMICON™ Ultracel 10K del medio de cultivo de las cepas transgénicas de <i>P. pastoris</i> transformadas con el gen hLF cultivadas en 50 mL de caldo YPD con 300 µg/mL de Zeocina™ .....	73
Figura 14. Espectro de dicroísmo circular de la lactoferrina recombinante humana (0.02 mg/mL) en PBS a 30 °C, con valores de pH (a) 1-7 y (b) 7-13.....	75
Figura 15. Espectro de dicroísmo circular de la lactoferrina humana nativa (0.02 mg/mL) en PBS a 30 °C, con valores de pH (a) 1-7 y (b) 7-13. ....	76
Figura 16. Porcentaje de α-hélice vs. temperatura de la lactoferrina recombinante humana y la lactoferrina humana nativa (0.02 mg/mL) en PBS de 30 a 86 °C. ....	78
Figura 17. Gráficos tridimensionales para la desnaturalización térmica de lactoferrina humana recombinante 0,02 mg/ml (a) y lactoferrina humana nativa (b) (0,03 mg/ml) en PBS de 30 a 86 °C, pH 7. ....	79

## I. INTRODUCCIÓN

La leche materna (LM) representa la principal fuente de nutrimentos para los infantes en sus primeros meses de vida, es un líquido secretado por la glándula mamaria, de gran complejidad biológica: nutrientes, hormonas, factores de crecimiento, células inmunoprotectoras, etc. En el calostro producido en los primeros 6 días postparto, aproximadamente el 97% de la composición es proteína, principalmente inmunoglobulinas y lactoferrina, complementándose la composición con vitaminas liposolubles y bacterias probióticas, y en menor concentración grasas, lactosa y vitaminas hidrosolubles; después del calostro, la leche producida es la leche de transición, en donde progresivamente se eleva la concentración de lactosa, grasas y disminuye la proporción de proteínas; en la leche madura, que se produce después de los 15 días postparto, la composición es más estable en cuanto a agua, osmolaridad, energía (carbohidratos y grasas) y proteínas.

La leche materna madura contiene entre 9 y 12 g/L de proteína total, las proteínas séricas como la lactoferrina (LF) y la alfa-lactoalbúmina (A-LA) son las de mayor relevancia por su función biológica. La A-LA humana (hA-LA) es un cofactor en la biosíntesis de la lactosa, tiene baja alergenicidad debido a su bajo peso molecular comparado con la beta-lactoglobulina presente en la leche de bovinos. La LF humana (hLF) al unirse al hierro, mejora su transporte y absorción, promueve la proliferación celular de la mucosa intestinal de la rata *in vivo* y de los enterocitos humanos *in vitro*, lo que podría sugerir que hLF puede favorecer la incorporación de nutrientes en los infantes mediante el desarrollo del epitelio del intestino delgado.

Específicamente está documentado que la hLF, que representa el 27% del total de seroproteínas de la leche materna madura, favorece la absorción del hierro en el intestino e inhibe el crecimiento de bacterias patógenas como algunos serovares de *Escherichia coli* y *Enterobacter sakazakii* en el tracto gastrointestinal, al secuestrar el hierro que las bacterias necesitan para su multiplicación y así prevenir contra enfermedades infecciosas que pueden poner en peligro la vida del recién nacido.

Por otro lado, hay evidencias que muestran que la hLF tiene una actividad antiviral contra citomegalovirus, el virus de la Hepatitis C, el virus simple del Herpes, rotavirus y adenovirus entre otros.

La LM es considerada el estándar de oro de la nutrición infantil temprana. Sin embargo, de acuerdo a los últimos resultados publicados de la Encuesta Nacional de Salud 2023 (González-Castell y col., 2023), solo el 33.6% de los infantes menores de 6 meses recibió lactancia materna exclusiva, el 27.2 % de niños de menos de 24 meses no recibió lactancia materna exclusiva durante los primeros tres días de vida y fue alimentado con una fórmula comercial infantil, las cuales están elaboradas a base de las proteínas de la leche de vaca que presenta una escasa concentración de LF y A-LA. Situación que puede representar una desventaja fisiológica y nutricional en los infantes.

La leche de vaca y otros mamíferos domesticados ha sido utilizada en sustitución o además de la leche materna por mucho tiempo, como parte de los primeros alimentos en la dieta de los infantes, sin embargo, también ha sido la principal causa de alergias alimentarias. En ocasiones se puede confundir la alergia a la leche a una intolerancia a la leche, que es mucho más común y produce síntomas clínicos muy similares a la alergia, pero no tan peligrosos. Una intolerancia se considera una enfermedad metabólica no inmunológica, es una reacción a determinado componente de la leche que provoca trastornos digestivos, de absorción o metabolismo, por el contrario, en una alergia que, si es un trastorno inmunológico, se puede manifestar con una diversidad de síntomas que puede involucrar uno o más órganos, resultando incluso en la muerte.

Se ha buscado la maternización de los infantes, con fórmulas infantiles que se asemejen a la leche materna, en cuanto a calidad nutricia, solubilidad, estabilidad, sabor y calidad microbiológica adecuados para alimentar con seguridad a los niños de diferentes edades. Existe una gran variedad de ellas y con el fin de mimetizar en lo posible a leche materna se han realizado intentos con diferentes tecnologías, por

ejemplo, utilizando leches que provengan de ganado transgénico que no tengan el gen de la beta caseína A1, la cual al ser hidrolizada genera un opioide (beta casomorfin-7) molécula que tiene un impacto negativo en funciones inmunológicas. Otra alternativa que se ha considerado viable es la incorporación de proteínas recombinantes humanas en las fórmulas infantiles, estas pueden tener actividades biológicas similares a las de las proteínas de la leche humana, pero aún hace falta investigación suficiente referente a bioactividad y seguridad para el consumo humano antes de que puedan ser utilizadas en las fórmulas infantiles.

Debido a la importancia nutricional y biológica de la hLF durante el desarrollo temprano de los infantes, en el presente trabajo se desarrolló un método para la producción de la proteína recombinante humana en el sistema eucariótico *Pichia pastoris* (renombrada como *Komagataella phaffii*). Este método permitió contar con una fuente pura de hLF, la cual podría utilizarse para la elaboración de alimentos especializados para la nutrición infantil, una vez que se cuente con una caracterización fisicoquímica y estudios de seguridad. Para esta familia de proteínas recombinantes, hay muy pocos estudios sobre su caracterización estructural. El dicróismo circular en el UV cercano de una proteína puede dar información estructural de la proteína, generalmente refleja el contenido de su estructura secundaria y proporciona una huella valiosa de su estructura terciaria, lo que resulta muy útil al comparar, por ejemplo, proteínas mutantes y proteínas nativas.

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1 LECHE MATERNA, HUMANA Y DE OTROS MAMÍFEROS**

Es bien sabido que el estándar de oro para la nutrición infantil es la leche materna. Se puede decir que los componentes de la leche materna derivan de tres fuentes: por la síntesis de grasas, lactosa y algunas proteínas en los lactocitos, algunas inmunoglobulinas y minerales son transportadas directamente desde el torrente sanguíneo, y otros pueden ser de origen dietario de las reservas de la madre. La proporción de los macronutrientes en la leche materna es variable entre madres y etapa de lactancia, sin embargo, en la leche madura de término se conserva notablemente, derivado de diversos estudios, está documentado que la composición media de macronutrientes se estima en 9 – 12 g/L de proteína, 32 – 36 g/L de grasa y de 67 – 78 g/L de lactosa (Ballard y Morrow, 2018). Los nutrientes presentes en la leche materna son fundamentales para el crecimiento y desarrollo durante la primera infancia, funciones biológicas como actividad antimicrobiana directa o indirecta, regulación inmune, antiinflamatoria y regulación del desarrollo tisular (Quitadamo y col., 2021). En situaciones en donde la lactancia materna no es posible, se utilizan fórmulas infantiles como sustituto de la leche materna. La leche bovina se ha utilizado ampliamente como base para las fórmulas infantiles, a pesar de su composición nutricional distintiva en comparación con la leche humana (Zhongyun y col., 2024). Cabe destacar que el contenido de proteínas oscila entre 32 y 34 g/L, lípidos entre 33 y 47 g/L, carbohidratos entre 34 y 54 g/L y elementos minerales entre 4,0 y 4,6 g/L (Pereira, 2014). Curiosamente, la importancia y el potencial de la leche no bovina de bajo rendimiento es un tema actual, especialmente en los lactantes alérgicos a las fórmulas bovinas. Además, varias leches y productos lácteos no bovinos, incluidos los de camello, burro y cabra, tienen propiedades nutricionales y terapéuticas especiales (Altomonte y col., 2019, Wang y col., 2019, Wang y col., 2020). Estas fórmulas subutilizadas son de gran



importancia en la búsqueda de humanizar las fórmulas infantiles (Zhongyun y col., 2024).

Se ha demostrado que las propiedades nutracéuticas y funcionales de las proteínas, un componente clave de la leche, mejoran la salud humana. En la leche humana, las proteínas séricas de fácil digestión representan entre el 60% y el 80% de la proteína total (Liao y col, 2011). Estas proteínas, incluidas las inmunoglobulinas, la LF y la lactoperoxidasa, también tienen algunas características antibacterianas y antivirales importantes y participan en la inmunidad del huésped (Zhu y Dingess, 2019). Además, muchos estudios previos han indicado las funciones biológicas de las proteínas séricas de leche. Por ejemplo, se indicó actividad citotóxica de las proteínas séricas de leche de camello, bovino y de burra (Shariatikia, y col., 2017). La actividad citotóxica en las células de cáncer de mama de las proteínas séricas de leche de burra y bovina también ha sido estudiada (Mao y col., 2009).

El análisis comparativo de los proteomas de la leche humana y de los animales lecheros proporciona datos valiosos para comprender las similitudes y diferencias entre estos tipos de leche. Esta información es fundamental en el desarrollo de estrategias destinadas a replicar las propiedades benéficas de la leche humana utilizando fuentes alternativas de leche animal (Zhongyun y col., 2024). La  $\beta$ -lactoglobulina (LGB), un alérgeno típico, es el componente principal de las proteínas séricas en todos los rumiantes estudiados, pero está prácticamente ausente en la leche humana. Curiosamente, la leche de camello parece ser similar a la leche humana en que carece de LGB y es rica en  $\alpha$ -lactobúmina, y el contenido de LF es más cercano al de la leche humana que el de la leche de otros animales lecheros (El-Hatmi y col., 2015). Además, nutricionalmente la digestión es significativamente diferente entre la leche humana y la leche bovina. La leche humana es rica en lipasa, activada por sales biliares, mientras que apenas se identifica en la leche bovina, y la leche bovina es rica en ribonucleasa pancreática (Zhang, y col., 2017). También se han observado en la leche humana concentraciones más altas de IgA, LF y proteínas complementarias, que enriquecen la respuesta inmune, mientras que la

leche de rumiantes contiene una gran cantidad de proteínas bactericidas, incluida la lactoperoxidasa y la molécula de adhesión celular 1 dependiente de la glicosilación (Glycam1) (Cao, y col., 2019, Lu y col., 2018). Recientemente, se ha prestado más atención a los componentes específicos de la leche de varios animales lecheros menores como ovejas, caballos y burros, y su posible función fisiológica, sin embargo, a pesar de diversos estudios publicados, aún no ha sido aclarado el contraste que existe en la distribución y variación de las proteínas de la leche de los mamíferos mencionados (Yang, y col., 2017). Aún no se cuenta con información suficiente respecto a las funciones nutricionales y bioactivas, para sugerir su uso en fórmulas infantiles.

## **2.2 PROTEÍNAS BIOACTIVAS DE LA LECHE MATERNA**

Queda claro que tanto la leche humana como la leche de vaca, son una excelente fuente de nutrientes necesarios para el crecimiento, especialmente de infantes.

Las proteínas lácteas son conocidas por tener propiedades nutricionales, funcionales y biológicas que hacen de ellas ingredientes importantes en alimentos funcionales promotores de la salud. Estas propiedades son parcialmente atribuidas a los péptidos bioactivos codificados en las diferentes proteínas de la leche (Torres-Llanez y col., 2005). Dentro de estas actividades, los péptidos bioactivos podrían influir en el metabolismo celular y actuar como vasos reguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores (Robert y Zaloga, 1994).

Estos péptidos funcionales o bioactivos se definen como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática (Meisel, 1998). Los péptidos derivados de las proteínas caseicas y séricas han demostrado poseer varias propiedades bioactivas como lo son: opioide, antihipertensiva, antimicrobial, inmunomodulatoria, transporte de minerales y

antitrombótica. Generalmente, son péptidos de pequeño tamaño, de 3 a 20 aminoácidos, aunque en algunas ocasiones pueden exceder esta longitud, que son liberados durante el procesado industrial de los alimentos, o bien durante la digestión gastrointestinal (Pihlanto-Leppälä, 2000; Shahidi y Zhong, 2008). Tras la administración oral, los péptidos bioactivos pueden ejercer su efecto, entre otros, sobre los sistemas cardiovascular (antiangiogénico), digestivo (absorción de nutrientes), inmunológico (potenciando crecimiento celular) y nervioso (FitzGerald y Meisel, 2000; Korhonen y Pihlanto, 2003). La literatura científica evidencia que estos péptidos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas como a nivel local, en el tracto gastrointestinal y a nivel sistémico, por ejemplo, actividad antimicrobiana, antioxidantes, antihipertensivas e inmunomoduladoras.

Hay que resaltar que ambas leches, bovina y materna, son fuente de proteínas bioactivas, pero se ha demostrado que la leche materna es muy superior aportando estas proteínas a los infantes.

### **2.2.1 Lactoferrina**

La lactoferrina o lactotransferrina (LF) es una glicoproteína que se basa en una cadena polipeptídica de aproximadamente 80 KDa y alrededor de 700 aminoácidos, presenta dos dominios globulares homólogos, N con dos subdominos N1 y N2 y C con dos subdominios C1 y C2, los extremos de los dominios están conectados por una  $\alpha$ -hélice, el glóbulo N corresponde a los residuos de aminoácidos 1-333 y el glóbulo C de 345 a 692, los dominios contiene un sitio de unión de hierro y un sitio de glicosilación. El grado de glicosilación de la proteína puede ser diferente y por lo tanto su peso molecular el cuál puede variar entre 76 y 80 kDa. La estabilidad de la lactoferrina está asociada con el grado de glicosilación. La LF está codificada por el gen LTF en el humano. Los mamíferos producen LF, proteína no hémica, de unión a hierro perteneciente a la familia de las transferrinas, está distribuida en leche, calostro, saliva, lágrimas, bilis, secreciones vaginales, semen, fluido bronquial y en

gránulos secundarios de neutrófilos (Harouna y col., 2020). La LF endógena es una molécula con propiedades antimicrobianas que se considera un componente esencial de la inmunidad innata del hospedero. La contribución de la LF a la respuesta innata se relaciona con su estratégica presencia en líquidos secretados por los epitelios, expuestos continuamente a agentes patógenos que colonizan o invaden las mucosas, así como a su incremento al ser liberada como resultado de la degranulación de neutrófilos que ocurre durante la inflamación de origen infeccioso (Ward, 2002).

Lönnerdal y colaboradores (2014) demostraron que la LF humana es una proteína globular resistente a las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal que presenta una marcada actividad antimicrobiana y antiviral relacionada con su fuerte afinidad por el hierro, que está involucrada en la función del sistema inmunitario así como en la incorporación del hierro por las células del intestino y que además, regula directamente la expresión de citocinas como la IL-1 y de factores de crecimiento como el TGF- $\beta$  (Lönnerdal, 2014). La LF secuestra el hierro presente en el medio, esto evita el desarrollo microbiano, y puede interactuar con la membrana bacteriana provocando su desestabilización (Harouna y col., 2020).

En la actualidad, la LF bovina (bLF) y la LF humana (hLF) han sido las mejor caracterizadas desde el punto de vista estructural y funcional. En ensayos *in vitro* se ha evaluado la actividad antibacteriana de la LF que involucra su efecto bacteriostático y bactericida. El efecto bacteriostático relativo a la inhibición de la multiplicación bacteriana, está relacionado a su habilidad de captar Fe<sup>3+</sup> (ion férrico) que es esencial para el crecimiento y expresión de factores de virulencia de algunos agentes patógenos. El efecto bactericida radica en la capacidad de la LF de interaccionar con cationes divalentes como el Ca<sup>2+</sup> que contribuyen a estabilizar la superficie bacteriana y con componentes bacterianos con carga negativa como el lipopolisacárido. Dicha interacción desorganiza y desestabiliza la superficie celular causando la pérdida de la permeabilidad y finalmente la muerte celular (Harouna y col., 2020).

A nivel sistémico y local, la LF modula *in vivo* la función de componentes humorales y celulares de la respuesta innata como neutrófilos, células asesinas naturales (*natural killer cells* [NKs]), linfocitos T  $\gamma/\delta$ , interferón  $\alpha$  (IFN  $\alpha$ ) e IFN  $\beta$ , interleucina 18 (IL-18), y adaptativa a través de anticuerpos, ILs, linfocitos Th1/Th2 y B. La acción moduladora de la LF le permite regular positiva o negativamente la inflamación de origen infeccioso. El efecto protector conferido por la LF resulta de la convergencia de eventos multifactoriales en los que está implicada su capacidad de interactuar con receptores de membrana de diversas células inmunocompetentes. A través de su unión a receptores, la LF modula la expresión de genes involucrados en diversas funciones como activación celular y producción de citocinas (Drago-Serrano y col., 2008).

Independientemente de la capacidad de unión al hierro, la LF interactúa con las superficies microbianas, virales y celulares, inhibiendo así su adhesión microbiana y viral, así como su entrada a las células huésped. La LF puede considerarse no sólo un factor de defensa primario contra infecciones en las mucosas, sino también un regulador polivalente que interactúa en procesos infecciosos virales (Berlutti y col., 2011). La LF también tiene una amplia actividad contra virus encapsulados y desnudos que causan enfermedades tanto en humanos como en animales. Los mecanismos antivirales de las lactoferrinas y péptidos derivados de LF, incluyen la prevención de la apoptosis de las células inducida por virus, la prevención de la entrada del virus en las células por la unión a la envoltura de proteína del virus o a los receptores del virus en las células, o influyendo en otros mecanismos intracelulares virales (Gruden y Poklar, 2011). Su capacidad antiviral, radica en la fase temprana de la infección, impidiendo así la entrada del virus a la célula huésped. Esta actividad se ejerce mediante la unión a receptores celulares de glicosaminoglicanos de heparán sulfato, partículas virales o ambos. A pesar del efecto antiviral de la LF, ampliamente demostrado en estudios *in vitro*, se han llevado a cabo pocos ensayos clínicos y el mecanismo de acción relacionado aún está en debate. La localización nuclear de la LF en diferentes células epiteliales

humanas sugiere que su efecto antiviral se ejerce no sólo en la fase temprana de la interacción entre la superficie del virus y la célula, sino también intracelularmente. La potente capacidad antiviral, a través de la unión a células huésped y/o partículas virales, además su localización nuclear refuerza la idea de que la LF es muy importante en la mucosa, eficaz contra ataques virales y podría ser útil aplicado como nueva estrategia para el tratamiento de este tipo de infecciones (Berlutti y col., 2011).

Se han publicado efectos inhibitorios de la LF contra los virus de la influenza A H1N1, H3N2, H5N1, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B, virus del herpes simple, citomegalovirus humano, virus de la inmunodeficiencia humana, coronavirus, adenovirus, virus del papiloma humano, rotavirus, echovirus (Gruden y Poklar, 2011).

La LF muestra diferentes mecanismos para su capacidad antiviral contra los virus de la influenza A, la bLF previene la propagación del virus, potencialmente mediante la prevención de la actividad de la caspasa 3, esta enzima es una cisteín proteasa que tiene una de las funciones cruciales en la regulación de la apoptosis; además, se ha demostrado que la LF interactúa con la hemaglutinina del virus de la influenza A y previene la infección por diferentes subtipos virales H1 y H3. Se ha demostrado que tanto la bLF como la hLF se unen igualmente bien a dos glicoproteínas en la envoltura superficial del virus de la hepatitis C, E1 y E2. El mecanismo de entrada del virus del herpes simple en las células huésped está mediado por la unión del virus a los glicosaminoglicanos, principalmente como el heparán sulfato, en los proteoglicanos del receptor de la superficie celular, a través de las glicoproteínas virales gB y gC; los estudios indicaron que la LF humana puede unirse al heparán sulfato y/o a sulfato de condroitina y glicosaminoglicanos en las membranas celulares para ocupar los lugares iniciales de unión del virus. Parece que se requiere una estructura globular y una carga negativa neta para la actividad del virus de la inmunodeficiencia humana-1; las lactoferrinas interfieren con la replicación del virus, probablemente en el nivel de fusión y/o unión del virus con la célula para evitar así

la entrada del virus en las células huésped. Las actividades antivirales de la LF contra virus sin envoltura se informaron por primera vez para el rotavirus; la bLF evitó la hemaglutinación del rotavirus y la unión viral a células susceptibles al unirse a las partículas virales. (Gruden y Poklar, 2011).

Estos hechos han cobrado aún más relevancia, dado que hay evidencia de que también puede unirse a algunos receptores utilizados por los coronavirus y bloquear su entrada, de tal manera que la LF podría prevenir el síndrome respiratorio agudo causado por el virus SARS-CoV-2, impidiendo que se adhiera a las células huésped (Kell y col., 2020). Además, en un estudio de Hou et al., encontraron evidencia de que la LF puede inducir la proliferación de osteoblastos, al tiempo que inhibe la apoptosis (Hou y col., 2015). Entre los factores tróficos de la leche humana, la LF es una importante molécula bioactiva que regula el crecimiento del intestino delgado (proliferación y diferenciación), mediada por un receptor de LF estrechamente regulado en la membrana plasmática tanto de las células epiteliales como de las células de las criptas (Liao y col., 2012). La aplicación de la LF como proteína biológicamente activa está en expansión, puesto que su uso en la industria alimentaria debe considerarse prometedor para el suministro de productos alimenticios con componentes fijadores de hierro, la mejora de su carácter inmunomodulador y su acción antioxidante, así como un aumento de la vida útil del producto (Bobreneva y Rokhlova, 2021).

### **2.3 TECNOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE**

Se reconoce que la calidad de vida se ve afectada principalmente por tres factores, como son: la deficiencia de alimentos, los problemas de salud y los daños medioambientales. Dichos factores requieren atención debido al incremento de la población mundial, ya que actualmente ésta es de 8,000 millones de personas y alcanzarán los 8,500 millones para el año 2030 y los 9,700 millones para el año 2050 (ONU, 2023). También de relevancia es el número de muertes anuales que

son causadas debido enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, VIH/SIDA, tuberculosis, malaria, entre otros, que en 2015 sumaban un total de 36 billones de muertes anuales (Khan y col., 2016). Los últimos datos publicados por la OMS, atribuyen las principales causas de defunción en el mundo a tres grandes cuestiones: las enfermedades cardiovasculares (cardiopatías isquémicas, accidentes cerebrovasculares), las enfermedades respiratorias (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infecciones de las vías respiratorias inferiores) y las afecciones neonatales, que engloban la asfixia y el traumatismo en el nacimiento, la septicemia e infecciones neonatales y las complicaciones del parto prematuro (OMS, 2024).

Los esfuerzos realizados para tratar de mejorar estas condiciones con métodos tradicionales no han sido suficiente, llevando al uso de nuevas tecnologías en donde la ingeniería genética hace uso de herramientas y enfoques modernos que proveen ahorro de tiempo y mayores rendimientos para hacer a estas tecnologías más rentables (Khan y col., 2016).

En tratamientos terapéuticos dentro de la salud humana, se han desarrollado diversas aplicaciones mediante tecnología del ADN recombinante. Dicha tecnología se basa en la generación de características deseables en un organismo o en sus productos por medio de la modificación *in vitro* del material genético (Khan y col., 2016). Las modificaciones en el material genético se pueden dar por medio de la introducción de uno o varios genes con sus elementos regulatorios o por la disminución o bloqueo de la expresión de genes endógenos (Clark y Pazdernik, 2016).

Desde mediados de la década de los 80's esta tecnología ha ido evolucionando y en la actualidad tiene múltiples aplicaciones en varios sectores, como la agricultura, salud y medio ambiente (Tabla 1).



**Tabla 1. Aplicación de la tecnología del ADN recombinante**

<b>Productos terapéuticos</b>	<b>Productos genéticamente modificados</b>	<b>Diagnosís</b>	<b>Energéticos</b>
Vacunas	Frutas	Terapia génica	Biohidrógeno
Hormonas de crecimiento	Vegetales	CRISPR	Bioetanol
Anticuerpos	Cereales	Dispositivos de monitoreo	Biometanol
Vectores	Microorganismos	Estrategias terapéuticas	Biobutanol
Proteínas recombinantes	Animales		

Fuente: Khan y col., 2016

El uso de proteínas recombinantes se ha ido incrementando conforme avanzan las investigaciones, estos van desde aplicaciones en laboratorio, diagnóstico, propósitos terapéuticos y materiales inteligentes. El tamaño del mercado de proteínas recombinantes se estima en 2.69 mil millones de dólares en 2024 y se espera que alcance los 3.94 mil millones de dólares en 2029, creciendo a una tasa compuesta anual del 7.91% durante el período previsto (2024-2029). (Mordor, 2024).

La purificación de una proteína recombinante, así como la evaluación de la calidad, cuantificación y almacenamiento son factores relevantes para que su aplicación sea segura, principalmente para obtener proteínas homogéneas y adecuadamente plegadas. Posteriormente el uso de técnicas adecuadas para la caracterización estructural y la cuantificación vienen a sumar a la calidad de las proteínas producidas (Khan y col., 2016; Oliveira y Domingues, 2018).

No nada más hay que considerar la caracterización estructural, la funcionalidad es un factor relevante en la posible incorporación o aplicación de proteínas recombinantes. Por ejemplo, si se introduce una proteína recombinante extraña en el cuerpo humano, puede desencadenar una respuesta inmune. No está claro si la

actividad de la bLF es la misma que la de la LF humana (hLF) para todas las funciones propuestas. Por el contrario, existe evidencia de que la bLF es bastante diferente en varios aspectos en comparación con la hLF y se ha observado mecánicamente que la bLF no se une al mismo sitio en los enterocitos del intestino delgado del lactante (Conesa y col., 2010). La producción de LF mediante tecnología de ingeniería genética se ha convertido de gran relevancia en la investigación y una tendencia de desarrollo para producir LF y evitar sus efectos secundarios (He y col., 2008).

La producción de proteínas recombinantes en sistemas eucariotas está bien documentada, concretamente utilizando levaduras como *Pichia pastoris*, ahora renombrada como *Komagataella phaffii*; la levadura *Pichia* fue transferida al género monotípico *Komagataella* y estuvo representada por dos especies, *K. pastoris* y *K. phaffii* (Bernauer y col., 2021). En esta levadura se han reportado altos niveles de expresión de proteínas como la LF humana con diferentes vectores de expresión como pPIC9K entre otros (Jiang y col., 2008; Carneiro y col., 2022). Obtener altos rendimientos de una proteína recombinante siempre ha sido un gran desafío. Son bastas las investigaciones que se han realizado para la obtención de LF mediante ingeniería genética. Estos sistemas han incluido bacterias, hongos, células vegetales y animales (Cui y col., 2022). La secuencia de la LF derivada de humanos, bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, equinos, ratones, búfalos y camellos ha sido definida (He y col., 2008; Conesa y col., 2008). La LF de mamíferos tiene una secuencia de aminoácidos similar, por ejemplo, la hLF y la bLF tiene 691 y 696 aminoácidos, respectivamente, con ~70% de identidad de secuencia (Wang y col., 2019).

Para esta familia de proteínas recombinantes existen pocos estudios de caracterización estructural simple, encontramos datos de proteínas recombinantes equinas producidas en levadura (Paramasivam y col., 2002), proteínas recombinantes humanas producidas en animales transgénicos (Thomassen y col., 2005), proteínas nativas caprinas, bovinas o incluso humanas (Zeng y col., 2023).

### **2.3.1 Sistemas de expresión disponibles para la producción de hLF recombinante.**

Como se ha venido mencionando, por más de dos décadas se ha realizado investigación en encontrar sistemas de expresión eficientes para la producción de proteínas recombinantes de la leche materna, principalmente para la producción de las proteínas recombinantes humanas  $\alpha$ -lactoalbúmina y lactoferrina (rhLF).

Específicamente para la LF, en una revisión bibliográfica publicada en el año 2014 se mencionan sistemas procariotes en bacterias como *Escherichia coli* y *Rhodococcus erythropolis*; y como sistemas eucariotes las levaduras *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*; los hongos filamentosos *Aspergillus oryzae*, *A. nidulans* y *A. awamori* (Yemets y col., 2014).

Así mismo están publicadas investigaciones en sistemas de expresión utilizando organismos superiores, como plantas y algunos mamíferos. Para la producción de LF en estos sistemas se han realizado en las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. y *N. bentamiana* Domin), trigo (*Triticum aestivum* L.), papa (*Solanum tuberosum* L. e *Ipomoea batatans*), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer y *Acanthopanax senticosus*), arroz (*Oryza sativa* L.), pera (*Pyrus sp.*), alfalfa (*Medicago sativa* L.), berro de Thale (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), cebada (*Hordeum vulgare* L.). Los mamíferos también se han empleado como sistemas de expresión, donde destacan los bovinos (*Bos sp.* Bojan) y caprinos (*Capra sp.* L.) (Cooper y col., 2015; Yemets y col., 2014). Para estos últimos todavía existen cuestiones bioéticas y políticas deficientes acerca del uso de organismos genéticamente modificados (OGM), lo cual representa una desventaja sobre los otros sistemas de expresión, así como que los ciclos de vida de los mamíferos son más largos y los métodos de purificación son más caros, lo que se traduce en un alto costo de obtención de las proteínas recombinantes de interés.

Aun cuando son diversos los sistemas de expresión para dichas proteínas, pocos son los que han sido aprobados para el mercado e introducidos en la práctica

clínica. Por ejemplo, el fármaco Talactoferrina que se produce en *A. niger* se emplea para el tratamiento de tumores, y el antiapoptótico Lacromin (rhLF) que se produce en arroz es un suplemento para medios de cultivo celulares que incrementa la tasa de crecimiento (InVitria, Ventria Bioscience, E. U. A., <http://www.invitria.com>)

Los sistemas de expresión eucarióticos basados en microorganismos como las levaduras y los hongos filamentosos, así como las plantas superiores, son los que se consideran más eficientes basado en los altos niveles de expresión de la proteína de interés, procedimientos de extracción y purificación más sencillos y económicos, facilidad de manipulación, entre otros (Cooper y col., 2015; Yemets y col., 2014).

### **2.3.2 *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) como hospedero en el sistema de expresión**

*Pichia pastoris* es una levadura metilotrófica empleada frecuentemente en sistemas de expresión con la que se han de producido más de 400 proteínas para investigación básica y con aplicación industrial (Bhataya y col., 2009). La Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) ha aprobado biofarmacos y enzimas industriales producidos en *P. pastoris* considerando el uso de este sistema como adecuado y seguro para el uso en humanos (Wang y col., 2016).

Se han realizado varias modificaciones genéticas en esta levadura como en *S. cerevisiae*, sin embargo, en *P. pastoris* se han encontrado algunas ventajas como la fuerte preferencia por el metabolismo respiratorio obteniéndose altas densidades celulares sin la generación de etanol, puede escalarse con mayor facilidad de matraces a biorreactores, y optimizando las condiciones de cultivo el proceso es altamente reproducible (Bhataya *et al.*, 2009; Carneiro y col., 2022). Otras ventajas que presenta como sistema de expresión es el bajo costo comparado con otros sistemas de expresión bacterianos y sistemas eucariotas complejos, el rápido desarrollo, no codifica endotoxinas, realiza un plegamiento adecuado de las proteínas producidas, y las modificaciones postraduccionales tales como puentes

disulfuro y N-glicosilaciones (Bhataya y col., 2009; Akbarzadeh y col., 2015; Armanmehr y col., 2016; Azoun y col., 2017, Karbalaei y col., 2020). Hay que considerar que las glicosilaciones presentan algunas diferencias comparadas con las producidas por organismos eucariotes superiores, la función de la proteína no se ve afectada debido a que solo se añaden de 8 a 14 residuos de manosa sobre la asparagina de la proteína expresada (Zou y col., 2013).

*P. pastoris* emplea dos de los promotores mejor regulados, el promotor derivado del gen de la alcohol oxidasa (AOX1) y el promotor del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP), el primero es inducible por metanol y el segundo es un promotor constitutivo (Bhataya y col., 2009; Cooper *et al.*, 2015; Armanmehr y col., 2016; Wang y col., 2016). Esta consideración es tomada en cuenta para el diseño de plásmidos, realizándolo bajo el mando de alguno de los dos promotores, para las proteínas que se van a incorporar en alimentos, es recomendable el uso del promotor constitutivo GAP que no requiere metanol para la inducción de la expresión.

En el marco de un programa conjunto de científicos rusos y bielorrusos se crearon construcciones genéticas que expresan el gen de la hLF. Usando estas construcciones, se produjeron ratones transgénicos, se determinó que la concentración máxima de rhLF en su leche fue de 160 g/L; se generaron cabras transgénicas cuya producción de rhLF fue de hasta 10 g/L en su leche. En el mismo sentido, se diseñaron rebaños experimentales de cabras que producían rhLF en su leche y se descubrió que la rhLF era idéntica a la proteína natural en sus propiedades físicas y químicas. Estas características incluían, entre otros parámetros, estudios de espectroscopia de dicroísmo circular (Goldman y col., 2012).

Por medio de la biotecnología, las proteínas de la leche materna pueden producirse en microorganismos, en plantas y en la leche de ganado bovino transgénico (Krimpenfort, 1993; Hyvönen y col., 2006; He y col., 2008) en cantidades suficientes

para utilizarlas en la elaboración de alimentos especializados, incluyendo las fórmulas infantiles. Sin embargo, para lograr esto, es necesario evaluar la bioactividad de dichas proteínas recombinantes, demostrar su seguridad para el consumo humano y considerar la opinión del consumidor sobre los productos recombinantes (García-Ugalde y col., 2017).

## **2.4 TÉCNICAS MODERNAS DE ANÁLISIS DE ESTRUCTURA Y QUÍMICA DE PROTEÍNAS**

Las técnicas utilizadas para la caracterización de la estructura de proteínas y péptidos han tenido grandes cambios que han mejorado la velocidad, confiabilidad y aplicabilidad del proceso. Fue necesario el avance en las diferentes ramas de la química para llegar a técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución y la electroforesis en gel, que han convertido la purificación de proteínas y péptidos en un procedimiento de rutina, incluso cuando el compuesto de interés es un componente menor en una mezcla biológica compleja. La química y la instrumentación utilizadas en el análisis y secuenciación de aminoácidos permiten el análisis de tan solo de 5 a 50 picomoles de muestras. Esto representa un aumento de la sensibilidad de más de mil veces y ha hecho posible el análisis estructural de una amplia variedad de compuestos escasos pero importantes (Hunkapiller y col., 1984). Y más aún técnicas para determinar su estructura tridimensional, por ejemplo, difracción de rayos X.

### **2.4.1. Métodos tradicionales para la determinación de concentración de proteína.**

Una diversidad de métodos se utiliza de forma rutinaria para la determinación de proteínas, como se indica en la Tabla 2 (Kelly y col., 2005).

El método Biuret depende de la formación de un complejo púrpura entre iones Cu (II) y enlaces peptídicos adyacentes en una proteína en condiciones alcalinas. El

método proporciona una respuesta bastante uniforme para diferentes proteínas, pero requiere grandes cantidades de muestra (0.5 a 5 mg). El método Lowry se basa en la reducción del cromógeno ácido tungstático fosfomolibdico mixto (en el reactivo Folin - Ciocalteu) por una proteína para dar un producto azul. Aunque el método de Lowry es sensible (5 a 100 µg de muestra), las diferentes proteínas dan respuestas diferentes y una gran cantidad de sustancias pueden interferir. El método del Ácido Bicinconínico (BCA) se basa en la capacidad de BCA para combinarse con iones de Cu (I) (producidos por la reducción de Cu (II) por una proteína en condiciones alcalinas) para dar un producto amarillo-verde. El método es conveniente y sensible (1 a 100 µg de muestra), sin embargo, la respuesta es diferente para cada proteína. El método de unión a azul de Coomassie (por ejemplo, el método de Bradford) se basa en el cambio en el espectro de absorción del colorante cuando se une a las proteínas en condiciones ácidas (desde el rojo-naranja al azul). El método es conveniente y sensible (1 a 100 µg de muestra), pero la respuesta es particular para cada proteína. Para una proteína purificada, la medición de  $A_{280}$  es un método muy utilizado. Un segundo método de absorbancia menos utilizado se basa en mediciones de la absorbancia de una proteína en el extremo ultravioleta (205 nm). A esta longitud de onda, la absorción se debe principalmente a enlaces peptídicos que se producen a una frecuencia muy similar en prácticamente todas las proteínas. Hay una pequeña contribución a  $A_{205}$  de otros cromóforos, principalmente las cadenas laterales de Tyr, Phe, Trp y His, y estos se tienen en cuenta en una fórmula empírica ideada por Scopes que requiere medidas de  $A_{205}$  y  $A_{280}$  (Kelly y col., 2005).

$$A_{205}(1 \text{ mg/ml}) = 27 + 120(A_{280}/A_{205})$$

**Tabla 2. Métodos para la determinación de concentración de proteínas**

Método	Cantidad de proteína requerida (µg)	Complejidad del método	Respuesta de masas idénticas de diferentes proteínas	Proteína de referencia utilizada	Principales fuentes de interferencia
<b>Biuret</b>	500-5000	2	Muy similar	Si	Tris, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> glicerol
<b>UV (280 nm)</b>	100-1000	1	Variable	No	Ácidos nucleicos y otros cromóforos
<b>UV (205 nm)</b>	5-50	1	Similar	No	Muchos componentes de los buffer y otros solutos
<b>Lowry</b>	5-100	3	Variable	Si	Aminoácidos, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ciertos buffers y detergentes
<b>Ácido bicinonínico (BCA)</b>	5-100 (1-10 en miniprotocolo)	3	Variable	Si	Glucosa, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , EDTA
<b>Unión con azul de Coomassie</b>	5-50 (1-10 en miniprotocolo)	2	Variable	Si	Triton, SDS
<b>Análisis de aminoácidos</b>	10-200	4	Variable	No	Otras proteínas contaminantes

Kelly y col., 2005

El método de absorbancia ultravioleta es sensible y proporciona resultados confiables para diferentes proteínas. Sin embargo, puede haber problemas debido al hecho de que: (a) las fuentes de arco de deuterio en la mayoría de los espectrofotómetros tienen un rendimiento relativamente pobre en longitudes de onda tan bajas como 205 nm, y (b) muchos componentes del buffer pueden absorber fuertemente a 205 nm, comprometiendo la validez de las medidas de absorbancia de la solución de proteína. Debe señalarse que la absorbancia  $A_{280}$  de una solución de proteína es generalmente del orden de solo el 5% de la  $A_{205}$ , por lo que puede ser difícil medir ambos valores de absorbancia con precisión para una solución de proteína a menos que se utilicen celdas de diferente longitud de onda, o alternativamente la solución se diluye con precisión para medir la  $A_{205}$ . Un número relativamente pequeño de proteínas contiene cofactores que se absorben en la luz ultravioleta cercana o visible; esta absorción puede usarse como la base para estimar la concentración de proteína, por ejemplo, el citocromo P450 se estima sobre la base de la absorción del grupo hemo a 450 nm en la forma reducida de la enzima complejada con CO. Debe observarse que este método supone que existe una ocupación estequiométrica de los sitios de unión del cofactor en la proteína, lo



que puede no ser siempre el caso con proteínas sobre expresadas en sistemas heterólogos (Kelly y col., 2005).

Concentración de proteína basada en  $A_{280}$

Este método conveniente, no destructivo, depende de la absorción de una proteína a 280 nm (suponiendo que la proteína contenga al menos algo de Tyr y Trp). El valor  $A_{280}$  esperado de una solución de proteína de 1 mg / ml en GdmCl (6M) (es decir, en condiciones desnaturalizantes) puede calcularse a partir de la siguiente fórmula, que se basa en las propiedades de absorbancia de estos aminoácidos y una pequeña contribución de los enlaces disulfuro. Debe observarse que, aunque estos enlaces raramente se encuentran en las proteínas intracelulares, este término contribuye solo muy poco a la absorbancia calculada

$$A_{280} (1 \text{ mg/ml}; 1 \text{ cm}) = (5690n_W + 1280n_Y + 60n_C)/M \text{ donde } n_W, n_Y \text{ y } n_C$$

donde  $n_W$ ,  $n_Y$  y  $n_C$  son el número de Trp, Tyr y Cys por cadena polipeptídica y  $M$  es la masa molecular (en Da). En la ecuación anterior, el coeficiente de  $n_C$  en la ecuación dada por Gill y von Hippel se ha reducido a la mitad ya que su valor (120) se refiere a la unidad unida a disulfuro, es decir, cistina. Si no hay enlaces disulfuro en la proteína, se debe descuidar el término en  $n_C$  (Kelly y col., 2005).

#### **2.4.2. Métodos para el análisis de la química y estructura de proteínas.**

De acuerdo a las características de la LF, se han utilizado diversos métodos de separación para su purificación, incluida la sal, la precipitación de reactivos orgánicos y la cromatografía (Luo y col., 2010; Moradian y col., 2014; Fan y col., 2017). Existen otros métodos de separación, como las tecnologías de membrana, nanopartículas magnéticas, etc., e incluso hay estudios donde se utilizan métodos combinados; sin embargo, todos ellos presentan grandes ventajas y desventajas.

Una tarea importante para la producción de bioterapéuticos y alimentos que contienen glucoproteínas bioactivas es la evaluación de las contribuciones de los glucanos individuales a las bioactividades observadas. Para comprender mejor las funciones de la glucosilación de proteínas en eucariotas, se pueden identificar globalmente las proteínas que contienen glicanos por ejemplo en la levadura. La glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales más común en las proteínas y sus alteraciones están relacionadas con patologías clínicas como el retraso mental y las anormalidades gastrointestinales, así como con alteraciones fisiológicas asociadas con la intolerancia gastrointestinal. La evaluación de las glicosilaciones se realiza comúnmente con kits comerciales como el Glycoprotein Detection Kit (Sigma Aldrich). Estos métodos están basados en técnicas tradicionales como la detección selectiva de glicoproteínas en geles de poliacrilamida mediante su tinción con el ácido periódico-reactivo de Schiff, el cual tiñe los grupos dioles de los carbohidratos de la periferia y el ácido siálico presentes en la proteína. Las proteínas se separan en un gel de poliacrilamida con un gradiente de 4% a 20% en condiciones desnaturalizantes y reductoras. Los geles se corren en una cámara de electroforesis con una solución amortiguadora compuesta de Tris, glicina y SDS, pH 8.3 a 100 V. Los geles se fijan con una solución de metanol:agua durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación moderada. Posteriormente el gel se lava con agua ultrapura y se incuba con una solución de oxidación compuesta de ácido periódico. El gel se lava nuevamente con agua ultrapura y se incuba con el reactivo de Schiff (fucsina-sulfito) para teñirlo. Finalmente, el gel se trata con una solución de reducción compuesta por metabisulfito de sodio para visualizar las bandas de las proteínas glicosiladas. Para validar la técnica, se utiliza la peroxidasa de rábano como control positivo y proteínas purificadas como control negativo (Zacharius y col., 1969).

Una metodología para el mismo fin (análisis de glicosilaciones) bastante confiable es Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) acoplada a Espectrometría de Masas (MS).

### 2.4.2.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

La HPLC separa las moléculas antes de su introducción y detección dentro del sistema de MS. La combinación de estas dos técnicas permite la identificación de moléculas con composición idéntica, que difieren solo en la geometría muy precisa mediante la cual están unidas. Los chips de glicano-HPLC especializados están disponibles para separar los glicanos al nivel estructural del isómero. Un chip de glicano-HPLC se compone de una columna de enriquecimiento y una columna de separación llena de carbón grafitado poroso que proporciona la fase estacionaria con mecanismos de afinidad que conducen a la separación isomérica. La columna de enriquecimiento logra una purificación miniaturizada de una muestra atrapando solo las moléculas de interés, y la columna de separación separa las moléculas en función de su interacción con la fase estacionaria. Una bomba mueve la solución de muestra con la fase móvil líquida en la columna de carbono grafitado que se une a los N-glicanos. En función de la fuerza de su partición entre las fases móvil y estacionaria, los N-glicanos se eluyen en diferentes momentos con diferentes concentraciones de fase móvil (disolvente), lo que permite su separación antes de la detección. La punta de nanospray produce una pulverización de iones protonados para el análisis de MS. Los nuevos instrumentos de HPLC, incluida la nano-HPLC, tienen una alta sensibilidad y reproducibilidad, y utilizan solo una pequeña cantidad de muestra (1-2  $\mu\text{L}$ ) (Karav y col., 2017).

MS. Los glicanos a menudo se ionizan usando un método de ionización suave: ionización por electrospray (ESI). El chip microfluídico con nano ESI generalmente se acopla a un analizador de masas de tiempo de vuelo (QTOF) de cuadrupolo de alta precisión. Con alta precisión, esta plataforma de medición puede elucidar mezclas complejas molécula por molécula. Los iones entran en el analizador de masas QTOF donde son acelerados por un campo eléctrico, y viajan hacia el detector como una función de su relación de masa a carga. El espectrómetro de masas QTOF realiza MS/MS utilizando un cuadrupolo, un hexápolo (celda de colisión) y una unidad de tiempo de vuelo para producir espectros. El cuadrupolo

selecciona iones precursores que se fragmentan en la celda de colisión en iones producto, que luego se impulsan al detector en un ángulo perpendicular a la trayectoria original. Todos los iones reciben la misma energía, y el tiempo requerido para alcanzar el detector es extremadamente sensible a su relación de masa a carga ( $m/z$ ). El detector cuenta los iones y traduce la energía iónica en energía eléctrica. Las señales se generan y registran mediante un sistema informático que produce un espectro de masas que muestra la abundancia relativa de los compuestos detectados según su  $m/z$  a muy alta velocidad y precisión temporal. Como resultado, los glicanos se pueden analizar rápidamente de una manera altamente reproducible y de alto rendimiento (Karav y col., 2017).

#### **2.4.2.2. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS).**

Para mezclas particularmente complejas, medir la masa precisa no es suficiente para identificar estructuras. Por lo tanto, se utiliza el modo MS/MS, donde los iones precursores se fragmentan para generar iones de producto que se analizan mediante QTOF. La fragmentación se realiza por disociación inducida por colisión (CID). Los iones precursores chocan con moléculas de gas de colisión (nitrógeno), lo que provoca su fragmentación. Estos iones producto brindan información estructural sobre la molécula inicial, lo que permite una identificación más precisa. Los N-glicanos pueden identificarse inicialmente a partir de los espectros de masas en función de la masa precisa. MS/MS puede realizarse para confirmar las composiciones de N-glucano. El análisis MS/MS genera iones de fragmentos específicos que son comunes a todos los N-glicanos, incluyendo  $163.06 m/z$  [Hex + H] +1,  $204.09 m/z$  [HexNAc + H] +1 y  $366.14 m/z$  [HexNAc - Hex + H] +1. Cada espectro puede examinarse para detectar la presencia de iones fragmentos. Después de la identificación con N-glicano, las moléculas pueden ingresarse en bibliotecas de datos digitales. Estas bibliotecas incluyen típicamente masa, tiempo de retención y composiciones de monosacáridos. La disponibilidad de estas bibliotecas ha impulsado el desarrollo de programas de software capaces de consultar en estas bibliotecas en tiempo real para identificar moléculas en

cromatogramas basados en la masa precisa y el tiempo de retención. Hua y col., en el 2013 establecieron, para ratones y humanos, respectivamente, bibliotecas de N-glicanos ligados, que ilustran la utilidad de este enfoque (Karav y col., 2017).

### **2.4.2.3. MALDI-TOF**

La espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF) de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) se ha desarrollado durante la última década como una herramienta versátil para el análisis de biopolímeros. Estos incluyen el análisis de mutaciones, la resecuenciación de amplicones con una secuencia de referencia conocida y el análisis cuantitativo de la expresión génica y las frecuencias alélicas en mezclas complejas de ADN. El principio general de la MS es producir, separar y detectar iones en fase gaseosa. Tradicionalmente, los métodos de vaporización térmica se utilizan para transferir moléculas a la fase gaseosa. Los métodos clásicos para la ionización son impacto electrónico (EI) e ionización química (CI). La mayoría de las biomoléculas, sin embargo, sufren descomposición y fragmentación significativa bajo las condiciones de ambos métodos. En consecuencia, la aplicación de MS al análisis de ácidos nucleicos se ha limitado a moléculas del tamaño de dinucleótidos. El análisis de oligonucleótidos con un rango de masa de hasta 3000 Dalton (aproximadamente 10 nucleótidos) se hizo factible con el desarrollo de métodos de desorción de plasma (PD). Hasta la invención de técnicas de ionización "blandas" tales como la espectrometría de masas por ionización por electrospray (ESI-MS) y MALDI-MS, las herramientas de espectrometría de masas no fueron consideradas ampliamente para aplicaciones de rutina en ciencias biológicas. En MALDI-MS, la muestra se incrusta en la estructura cristalina de pequeños compuestos orgánicos (matriz) y se deposita en un soporte de muestra conductivo. Los co-cristales se irradian con un rayo láser de nanosegundos, por ejemplo, un láser ultravioleta (UV) con una longitud de onda de 266 o 337 nm. La energía del láser causa la descomposición estructural del cristal irradiado y genera una nube de partículas (la pluma) de la cual los iones son extraídos por un campo eléctrico. El mecanismo detrás del proceso de desorción no

se entiende completamente. Se puede describir mejor como una conversión de energía láser a oscilación vibratoria de las moléculas de cristal. Esto resulta en la desintegración del cristal. Después de la aceleración a través del campo eléctrico, los iones se desplazan a través de un camino libre de campo y finalmente llegan al detector (por ejemplo, un multiplicador de electrones secundario o placa de canal). Las masas de iones (relaciones de masa a carga [ $m/z$ ]) se calculan normalmente midiendo su TOF, que es más larga para las moléculas más grandes que para las más pequeñas (siempre que sus energías iniciales sean idénticas). Debido a que se generan predominantemente iones no fragmentados de carga única, las masas de iones padres pueden determinarse fácilmente a partir del espectro resultante sin la necesidad de un procesamiento de datos complejo. Las masas son accesibles como datos numéricos para el procesamiento directo y el análisis posterior. Las TOF medidas durante un experimento MALDI típico están en el rango de varios microsegundos (Jurinke, 2004).

Espectrometría de masas MALDI-TOF se utiliza para obtener determinaciones rápidas y precisas de la masa molecular, pero las determinaciones cuantitativas generalmente se realizan mediante otras técnicas (Bucknall y col, 2002).

Desde su inicio y disponibilidad comercial, la versatilidad de MALDI-TOF MS ha sido demostrada convincentemente por su amplio uso para el análisis cualitativo. Por ejemplo, MALDI-TOF MS se ha empleado para la caracterización de polímeros sintéticos, análisis de péptidos y proteínas, ADN y secuenciación de oligonucleótidos, y la caracterización de proteínas recombinantes. Recientemente, las aplicaciones de MALDI-TOF MS se han ampliado para incluir el análisis directo de tejidos biológicos y organismos unicelulares con el objetivo de caracterizar péptidos y componentes proteicos endógenos. Las propiedades que hacen de MALDI-TOF MS una herramienta cualitativa popular (su capacidad para analizar moléculas en un amplio rango de masa, alta sensibilidad, mínima preparación de muestras y rápidos tiempos de análisis) también lo convierten en una herramienta cuantitativa potencialmente útil. MALDI-TOF MS también permite analizar las moléculas no volátiles y térmicamente lábiles con relativa facilidad. Por lo tanto, es

prudente explorar el potencial de MALDI-TOF MS para el análisis cuantitativo en entornos clínicos, para exámenes toxicológicos, así como para el análisis ambiental. Además, la aplicación de MALDI-TOF MS a la cuantificación de péptidos y proteínas es particularmente relevante. La capacidad para cuantificar las proteínas intactas en tejidos y fluidos biológicos presenta un desafío particular en el área en expansión de la proteómica y los investigadores requieren urgentemente métodos para medir con precisión la cantidad absoluta de proteínas. Si bien ha habido informes de aplicaciones MALDI-TOF MS cuantitativas, existen muchos problemas inherentes al proceso de ionización MALDI que han restringido su uso generalizado. Estas limitaciones provienen principalmente de factores como la heterogeneidad muestra/matriz que se cree que contribuye a la gran variabilidad en la intensidad de señal observada para analitos, el rango dinámico limitado debido a la saturación del detector y las dificultades asociadas al acoplamiento de MALDI-TOF MS a técnicas de separación en línea como la cromatografía líquida. Combinados, se piensa que estos factores comprometen la precisión, precisión y utilidad con que se pueden hacer las determinaciones cuantitativas. Debido a estas dificultades, los ejemplos prácticos de aplicaciones cuantitativas de MALDI-TOF MS han sido limitados. La mayoría de los estudios hasta la fecha se han centrado en la cuantificación de analitos de baja masa, en particular, alcaloides o ingredientes activos en productos agrícolas o alimenticios, mientras que otros estudios han demostrado el potencial de MALDI-TOF MS para la cuantificación biológica analitos relevantes tales como neuropéptidos, proteínas, antibióticos o diversos metabolitos en tejidos o fluidos biológicos (Bucknall y col, 2002).

A través de MALDI-MS pueden identificarse y localizarse las modificaciones postraduccionales covalentes tales como la fosforilación y la formación de enlaces disulfuro. MALDI-MS también se puede usar para mapear en masa rápidamente las proteínas digeridas para la confirmación de la secuencia, a menudo sin requerir el fraccionamiento peptídico. El potencial para la secuenciación directa de péptidos y

proteínas de estructura desconocida se ha demostrado con éxito utilizando diferentes enfoques MALDI-MS (Zaluzec, 1995).

#### 2.4.2.4. Dicroísmo circular

El dicroísmo circular (DC) de una proteína a cualquier longitud de onda se puede expresar como  $X = f_H X_{H\bar{n}} + f_\beta X_\beta + f_R X_R$ . La  $f$ 's son las fracciones de la hélice (H),  $\beta$ , y desordenada (R).  $\bar{n}$  se refiere al promedio de las unidades de péptidos por segmento de hélice en una molécula de proteína (Chen y col., 1974).

El DC en ultravioleta cercano de una proteína generalmente refleja su contenido de estructura secundaria. Una de las aplicaciones más exitosas del DC, la caracterización estructural de las proteínas, depende de la notable sensibilidad del DC en el ultravioleta cercano a la conformación de la cadena principal de las proteínas. Se han desarrollado varios métodos empíricos para analizar los espectros de proteína por DC para la estimación cuantitativa del contenido de la estructura secundaria. El principio básico involucrado en el análisis de proteína por espectros de DC, y utilizado en la estimación de fracciones estructurales secundarias, es que el espectro de proteína por DC ( $C_\lambda$ ) se puede expresar como una combinación lineal de espectros de componentes de estructura secundaria individuales ( $k$ ),  $B_{k\lambda}$ ,  $C_\lambda = \sum f_k B_{k\lambda}$ , donde  $f_k$  es la fracción de la estructura secundaria  $k$ . También se han desarrollado métodos para estimar el número de segmentos estructurales secundarios en proteínas, y para asignar la clase de estructura terciaria proteica del análisis de espectros de DC de UV lejano (Sreerama y Woody, 2000).

El DC se está reconociendo cada vez más como una técnica valiosa para examinar la estructura de las proteínas en solución. Sin embargo, el valor de muchos estudios que usan DC se ve comprometido por un diseño experimental inapropiado o por la falta de atención a los aspectos clave de la calibración del instrumento o la caracterización de la muestra (Kelly y Price, 2000).

Desde finales de la década de 1980, ha habido un crecimiento explosivo en la



biología estructural con el número de estructuras de alta resolución de proteínas añadidas al banco de datos de proteínas (PDB) que actualmente crece a más de 2000 por año. Esto ha permitido una comprensión mucho más detallada de la función de sistemas de tamaño cada vez mayor, incluidos conjuntos celulares complejos como el proteosoma y la gran subunidad ribosómica. En gran medida, el crecimiento de la biología estructural ha sido impulsado por desarrollos en la tecnología de ADN recombinante que permiten que las proteínas se produzcan en las cantidades (a menudo sustanciales) requeridas, así como por los avances en el análisis de datos y la bioinformática. Sin embargo, existe una creciente comprensión de la necesidad de realizar estudios estructurales en las condiciones en que las proteínas realmente funcionan (es decir, generalmente en solución), así como en otras condiciones y para proporcionar medidas de las tasas de cambios estructurales de proteínas, que a menudo son esenciales para su función biológica (Kelly y Price, 2000).

#### Origen del efecto de DC

La luz polarizada plana se puede ver integrada de 2 componentes circularmente polarizados de igual magnitud, uno que gira en sentido antihorario (zurdo, L) y el otro en el sentido de las agujas del reloj (diestro, R). El dicroísmo circular (DC) se refiere a la absorción diferencial de estos 2 componentes. Si después de pasar a través de la muestra que se está examinando, los componentes L y R no se absorben o se absorben en extensiones iguales, la recombinación de L y R regeneraría la radiación polarizada en el plano original. Sin embargo, si se absorben L y R en diferentes grados, se dice que la radiación resultante posee polarización elíptica. Se observará una señal de DC cuando un cromóforo es quiral (ópticamente activo) por uno de los siguientes motivos: (a) es intrínsecamente quiral debido a su estructura, por ejemplo, un átomo de C con 4 sustituyentes diferentes, o el enlace disulfuro que es quiral debido a los ángulos diedros de la cadena de átomos C - S - S - C, (b) está unido covalentemente a un centro quiral en la molécula, o (c) se coloca en un ambiente asimétrico en virtud de la estructura tridimensional adoptada

por la molécula. La base teórica de la técnica de DC y su aplicación al estudio de otros tipos de moléculas han sido bien cubiertos en una serie de libros y artículos. Los instrumentos de DC (conocidos como espectropolarímetros) miden la diferencia de absorbancia entre L y R de los componentes polarizados de forma circular ( $\Delta A = A_L - A_R$ ), pero generalmente se reporta en términos de la elipticidad ( $\theta$ ) en grados. Existen varios métodos mediante los cuales el efecto DC se puede medir en un espectropolarímetro: (a) modulación, en la cual la radiación incidente se conmuta continuamente entre los componentes L y R, (b) sustracción directa, en la cual las absorbancias de los 2 componentes se miden por separado y se restan entre sí, y (c) elipsisométrica, en la que se mide la elipticidad de la radiación transmitida. Aunque es posible que los métodos (b) y (c) tengan algunas ventajas potenciales en términos de la medición del DC resuelto en el tiempo, el método de modulación es con mucho el más utilizado. En dicho instrumento de DC, la luz polarizada plana se divide en los componentes L y R por el paso a través de un modulador sometido a un campo eléctrico alterno (50 kHz es la frecuencia más comúnmente empleada). El modulador normalmente usado consiste en un cristal de cuarzo piezoeléctrico y una placa delgada de material isótropo (por ejemplo, sílice fundida) estrechamente acoplado al cristal. El campo eléctrico alterno induce cambios estructurales en el cristal de cuarzo; estos hacen que la placa transmita luz circularmente polarizada en los extremos del campo. Como la radiación transmitida se conmuta entre los componentes L y R, estos son detectados sucesivamente por el fotomultiplicador (Kelly y Price, 2000).

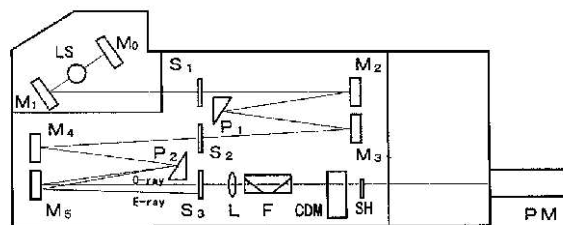


Diagrama de bloques de un espectropolarímetro (Jasco J-810). La radiación polarizada plana se produce por el paso de la luz desde la fuente (LS) a través de 2 prismas (P1 y P2) y una serie de espejos (M0 a M5) y rendijas (S1 a S3). El rayo ordinario (O) se enfoca mediante una lente (L) y pasa a través de un filtro (F) al modulador (CDM). Los componentes circularmente polarizados se pasan a través del obturador (SH) al compartimiento de muestra, antes de ser detectados por el fotomultiplicador (PM). (E representa el rayo extra ordinario) (Kelly y Price, 2000).

Siempre debe recordarse que, en la mayoría de los estudios biológicos, si no en todos, las señales de DC observadas son muy pequeñas, es decir, las elipticidades están típicamente en el rango de 10 mdeg, correspondiendo a una diferencia en la absorbancia ( $\Delta A = (A_L - A_R)$ ) del orden de  $3 \times 10^{-4}$ . Por lo tanto, es especialmente importante en el trabajo de DC prestar atención a las condiciones experimentales para garantizar que se obtengan datos significativos (Kelly y Price, 2000).

#### Información disponible de estudios de DC de proteínas

Las señales de DC solo surgen donde ocurre la absorción de radiación, y así las bandas espectrales se asignan fácilmente a las características estructurales distintas de una molécula. Una ventaja de la técnica de DC en estudios de proteínas es que se puede obtener información estructural complementaria de varias regiones espectrales.

En proteínas, los cromóforos de interés incluyen el enlace peptídico (absorción por debajo de 240 nm), cadenas laterales de aminoácidos aromáticos (absorción en el rango de 260 a 320 nm) y enlaces disulfuro (bandas de absorción amplias débiles centradas alrededor de 260 nm). Además, los cofactores no proteicos pueden absorber en un amplio rango espectral, incluyendo piridoxal-5V-fosfato alrededor de 330 nm, flavinas en el rango de 300 nm a 500 nm (dependiendo del estado de oxidación), grupos hemo fuertemente alrededor de 410 nm con otras bandas en el rango de 350 nm a 650 nm (dependiendo del estado de espín y la coordinación del ion Fe central) y restos de clorofila en las regiones IR visible y cercana. Si una cantidad de cromóforos del mismo tipo están muy cerca, pueden comportarse como una única unidad absorbente (excitón) que dará lugar a características espectrales características. Finalmente, las señales de DC inducidas pueden surgir de ligandos que no tienen quiralidad intrínseca, pero adquieren quiralidad cuando se unen en un entorno asimétrico tal como el proporcionado por una proteína (Kelly y Price, 2000).

El dicroísmo circular de una proteína puede proporcionar información estructural sobre las proteínas (Paramasivam y col., 2002; Thomassen y col., 2005). El DC en

UV cercano de una proteína generalmente refleja el contenido de su estructura secundaria y proporciona una valiosa huella digital de la estructura terciaria de esa proteína, que puede usarse para comparar, por ejemplo, formas de proteínas mutantes y nativas (Wong, 2018; Paramasivam y col., 2002). Implica una forma sencilla de preparar las muestras y requiere equipos de bajo costo, que son algunas de sus ventajas en comparación con los métodos de difracción de rayos X (Zeng y col., 2023).

En la estructura secundaria de una proteína, la disposición del enlace peptídico está muy ordenada y la direccionalidad de la disposición del enlace peptídico también determina la transición y división del nivel de energía del enlace peptídico. Por lo tanto, diferentes características estructurales secundarias de las proteínas dan como resultado diferentes posiciones de las bandas de DC e intensidades de absorción. Según la DC ultravioleta lejana de la proteína detectada, se puede reflejar la información de la estructura secundaria de la proteína (Zeng y col., 2023; Bokkhim y col., 2013).

Los tipos de información que se pueden obtener a partir de estudios de DC de proteínas incluyen:

Composición de la estructura secundaria (% hélice, lámina, vueltas, etc.) de la región del enlace peptídico.

La absorción en esta región (240 nm e inferior) se debe principalmente al enlace peptídico; hay una transición débil pero amplia  $n - \pi^*$  *centrada* alrededor de 220 nm y una transición  $n - \pi^*$  más intensa alrededor de 190 nm. En ciertos casos, las cadenas laterales de aminoácidos aromáticos también pueden contribuir significativamente en este rango espectral. Los diferentes tipos de estructuras secundarias regulares que se encuentran en las proteínas dan lugar a espectros de DC característicos en la ultravioleta lejana. Existe una cantidad de algoritmos que utilizan los datos de espectros de DC UV lejanos para proporcionar una estimación de la composición de estructura secundaria de las proteínas. La mayoría de los

procedimientos emplean bases de datos que comprenden los espectros de DC de proteínas de varios tipos de pliegues cuyas estructuras se han resuelto mediante cristalografía de rayos X. Los algoritmos ampliamente utilizados incluyen SELCON (autoconsistente), VARSLC (selección de variable), CDSSTR, K2d y CONTIN. Se ha desarrollado un servidor en línea DICHROWEB, alojado en el Birkbeck College de la Universidad de Londres, Reino Unido, que permite introducir datos en varios formatos, incluidos los de los principales fabricantes de instrumentos de DC, y analizarlos por los diversos algoritmos con una elección de bases de datos. Un punto que debe tenerse en cuenta es que las bases de datos no incluyen estructuras de oligopéptidos y, por lo tanto, los espectros de DC de estos compuestos excepto en condiciones donde las estructuras secundarias particulares son predominantes no pueden analizarse confiablemente en la actualidad. Para instrumentos de DC convencionales con una fuente de luz de arco Xe, es difícil hacer mediciones muy por debajo de 180 nm, en parte porque la intensidad de la radiación cae en esta región, pero también porque el N<sub>2</sub> se utiliza para purgar el compartimento de muestra y la óptica y el solvente H<sub>2</sub>O absorbe significativamente. Sin embargo, las estimaciones del contenido de estructuras secundarias son significativamente más confiables si se incluyen datos de DC más abajo en la región ultravioleta lejana (170 nm y menos); estos se pueden obtener utilizando radiación sincrónica (SRCD). Sin embargo, para aprovechar al máximo estos desarrollos, será necesario crear conjuntos de datos más grandes que contengan datos espectrales sobre proteínas de diferentes tipos de pliegues a 170 nm o menos. Es posible obtener estimaciones del contenido  $\alpha$ -helicoidal de péptidos y proteínas a partir de datos más limitados utilizando los valores de las señales de DC a 208 nm y 222 nm. Sin embargo, se debe enfatizar que estas estimaciones se deben tratar con precaución y, si es posible, los datos de DC se deben recopilar en un rango más amplio de longitudes de onda en el extremo ultravioleta. Se debe enfatizar que, para un análisis confiable de la estructura secundaria, es necesario garantizar que la concentración de la solución de proteína se conozca con precisión y que el instrumento de DC esté calibrado y operado adecuadamente (Kelly y Price, 2000).

## Huella digital de la estructura terciaria

Los espectros en la región 260-320 nm surgen de los aminoácidos aromáticos. Cada uno de los aminoácidos tiende a tener un perfil de longitud de onda característico. Trp muestra un pico cercano a 290 nm con una estructura fina entre 290 y 305 nm; Tyr un pico entre 275 y 282 nm, con un hombro en longitudes de onda más largas a menudo oscurecido por bandas debido a Trp; Phe muestra bandas más débiles, pero más nítidas con una estructura fina entre 255 y 270 nm. La estructura fina en estas bandas surge de transiciones vibracionales en las que están implicados diferentes niveles de vibración del estado excitado. Cabe señalar que, en ciertos casos, las cadenas laterales aromáticas pueden contribuir significativamente a las señales de DC en la región ultravioleta lejos (por debajo de 250 nm). La forma y la magnitud real del espectro de DC cercano a UV de una proteína dependerán del número de cada tipo de aminoácido aromático presente, su movilidad, la naturaleza de su entorno (enlaces H, grupos polares y polarizabilidad) y su disposición espacial en la proteína; los vecinos cercanos (generalmente a menos de 1 nm de distancia) pueden acoplarse como excitones, aunque las señales son generalmente demasiado débiles para que esto sea significativo. Aunque el tratamiento teórico de los espectros de DC ultravioleta cercano no está lo suficientemente avanzado como para proporcionar conocimientos estructurales significativos, se han realizado progresos importantes en la asignación de características del espectro a residuos particulares mediante la eliminación secuencial de cadenas laterales aromáticas mediante mutagénesis dirigida al sitio, como en el caso de ribonucleasa bovina, anhidrasa carbónica humana II y el factor de transcripción de unión a molibdato ModE de *Escherichia coli*. Sin embargo, el espectro de DC cercano a UV de una proteína proporciona una valiosa huella digital de la estructura terciaria de esa proteína, que puede usarse para comparar, por ejemplo, formas de proteínas de tipo silvestre y mutantes. También puede proporcionar evidencia importante de la existencia de estados de "glóbulo fundido" en proteínas, que se caracterizan, entre otras cosas, por señales muy débiles de DC ultravioleta, lo que refleja la alta

movilidad de las cadenas laterales aromáticas. Está claro que las regiones flexibles o desordenadas se encuentran comúnmente en las proteínas y pueden desempeñar una serie de funciones importantes (Kelly y Price, 2000).

#### Integridad de los sitios de unión del cofactor

Generalmente cofactores orgánicos tales como piridoxal-5V-fosfato, hemo, flavina, etc., muestran muy pocas señales de DC cuando están en solución libre, pero solo cuando se unen a su pareja de proteína en sitios que confieren quiralidad. Las señales de DC en la región espectral apropiada son por lo tanto excelentes indicadores de la integridad del sitio de unión del cofactor. En algunos casos, el espectro de DC se ha utilizado para proporcionar información estructural detallada sobre los sitios del cofactor; ejemplos incluyen el sitio hemo en el citocromo P450s y los sitios de bacteriocloro-opil en el complejo de recolección de luz LH2 de *Rhodospseudomonas acidophila* (Kelly y Price, 2000).

#### Cambios conformacionales en proteínas

Los cambios estructurales en las proteínas causados por la unión de ligandos son una parte esencial del mecanismo de acción y regulación de la actividad biológica. DC proporciona un medio experimentalmente muy conveniente para detectar tales cambios que pueden examinarse en diferentes regiones espectrales. Además, el DC se puede usar para evaluar el rango de concentraciones de ligando sobre el que tienen lugar cambios estructurales, la extensión de los cambios en la proteína de interés y (utilizando estudios de DC resueltos en el tiempo) la velocidad a la que ocurren tales cambios. El DC es especialmente valioso en el estudio de péptidos donde la cristalografía de rayos X no es generalmente practicable. Ejemplos de esto son proporcionados por el cambio entre las estructuras  $\alpha$ -helice y hoja  $\beta$  en los péptidos priónicos y las secuencias peptídicas diseñadas que pueden cambiar la conformación de una horquilla helicoidal a una espiral (Kelly y Price, 2000).

#### Plegamiento de la Proteína

Una clase especial de cambio conformacional ocurre durante la adquisición de la

estructura nativa de una proteína durante la biosíntesis. El enfoque experimental de este problema generalmente implica estudios del replegamiento de proteínas desnaturalizadas DC se ha utilizado para medir la velocidad de adquisición de la estructura secundaria y terciaria. Los métodos de DC continuos o de flujo detenido pueden usarse para detectar eventos que suceden en la escala de tiempo ms o sub-ms; dicha información se ha usado para explorar el mecanismo de plegamiento de proteínas. Las proteínas pequeñas (100 aminoácidos o menos) pueden plegarse rápidamente en un mecanismo de dos estados sin intermediarios cinéticamente detectables. Sin embargo, el plegamiento de proteínas más grandes a menudo implica una vía de etapas múltiples (o "embudo plegador"), en las etapas iniciales de la estructura secundaria nativa que se ha adquirido en gran parte antes de la formación de contactos de estructura terciaria correctos (Kelly y Price, 2000).

#### CD como técnica estructural en comparación con los enfoques de rayos X y RMN

En contraste con la cristalografía de rayos X o la RMN que son capaces de proporcionar información estructural sobre proteínas a nivel atómico de resolución, la DC es una técnica estructural de baja resolución en la que se describen las características estructurales generales. Sin embargo, es una técnica mucho menos exigente tanto en términos de requisitos de muestra y tiempo. Por lo tanto, se pueden obtener espectros de DC de buena calidad en < 0.1 mg (lejos UV) o 1 mg (cerca de UV y visible) en 30 minutos o menos y la técnica no es destructiva. Por el contrario, la cristalografía de rayos X requiere que estén disponibles cristales de proteína difractantes adecuados; La RMN requiere altas concentraciones de la proteína (típicamente 0.5 mM) y está limitada a proteínas relativamente pequeñas o fragmentos de proteínas (<40 kDa más o menos). Además, el DC es versátil porque puede explorar la estructura de la proteína en una amplia variedad de condiciones experimentales, y puede usarse para medir las tasas a las que ocurren los cambios estructurales. También vale la pena señalar que el DC podría utilizarse para evaluar la estructura y la estabilidad de una proteína en condiciones utilizadas para la RMN (generalmente una alta concentración de proteína, pH ligeramente



ácido, temperaturas elevadas, tiempos de adquisición largos). Además, el DC podría usarse para explorar la estructura de una proteína en condiciones cercanas a las utilizadas para la cristalización y comparada con aquella en condiciones que podrían considerarse más relevantes fisiológicamente (Kelly y Price, 2000).

### Determinación de la concentración de proteína

La determinación precisa de la concentración de proteína es particularmente importante para la determinación confiable de la estructura secundaria por DC UV (Kelly col., 2005).

El dicroísmo circular se basa en la absorción diferencial de la radiación polarizada circularmente izquierda y derecha por cromóforos que poseen quiralidad intrínseca o se encuentran en entornos quirales. Las proteínas poseen una cantidad de cromóforos que pueden dar lugar a señales de DC. En la región UV lejana (240-180 nm), que corresponde a la absorción del enlace peptídico, el espectro DC puede analizarse para obtener el contenido de características estructurales secundarias regulares tales como  $\alpha$ -hélice y hoja- $\beta$ . El espectro de DC en la región de UV cercana (320-260 nm) refleja los entornos de las cadenas laterales de aminoácidos aromáticos y, por lo tanto, proporciona información sobre la estructura terciaria de la proteína. Otros cromóforos no proteicos tales como restos de flavina y hemo pueden dar lugar a señales de DC que dependen del entorno preciso del cromóforo afectado. Debido a sus demandas de recursos relativamente modestas, el DC se ha utilizado ampliamente para proporcionar información útil sobre la estructura de la proteína, la extensión y la velocidad de los cambios estructurales y la unión del ligando. En el campo del diseño de proteínas, el DC se usa para evaluar la estructura y la estabilidad de los fragmentos de proteína diseñados. Los estudios del plegamiento de proteínas hacen un uso extensivo de DC para examinar la ruta de plegamiento. La técnica ha sido especialmente importante en la caracterización de intermedios de glóbulos fundidos que pueden estar implicados en el proceso de plegamiento. El DC es una técnica extremadamente útil para evaluar la integridad estructural de las proteínas de membrana durante los procedimientos de extracción

y caracterización. Las interacciones entre cromóforos pueden dar lugar a señales de DC características. Esto está bien ilustrado por el caso del complejo de recolección de luz de bacterias fotosintéticas, donde los espectros de DC pueden analizarse para indicar el grado de superposición orbital entre los anillos de moléculas de bacterioclorofila. Por lo tanto, es evidente que el DC es una técnica versátil en biología estructural, con una gama cada vez más amplia de aplicaciones (Kelly y Price, 2000).

Paramasivam y col., compararon el patrón de dicroísmo circular de las lactoferrinas equinas recombinantes y nativas, y los valores calculados para el contenido de los elementos estructurales secundarios de la proteína recombinante coincidieron con los valores obtenidos para la proteína nativa. Todos estos resultados confirmaron que la proteína expresada estaba correctamente plegada y era funcional (Paramasivam y col., 2002). También es interesante evaluar si se encuentran datos similares con la LF humana. Sin embargo, no se han informado estudios de estabilidad que incluyan parámetros termodinámicos para la LF recombinante.

La poca información referente a la caracterización de proteínas recombinantes mediante patrones de dicroísmo circular, nos motivó a obtener una proteína humana recombinante utilizando la levadura *Pichia pastoris* para estudiar cambios estructurales modificando el pH y la temperatura mediante espectroscopía de dicroísmo circular (CD). Se calcularon parámetros termodinámicos como  $\Delta H$  y  $\Delta S$  y se compararon con la LF humana comercial (hLF).

### **III. HIPÓTESIS**

El desarrollo de un método eficaz para la producción de la proteína recombinante hLF en *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*), permite obtener una proteína con características comparables a la proteína hLF de origen humano.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **GENERAL**

Desarrollar el proceso de producción de la proteína recombinante hLF, y evaluar mediante parámetros termodinámicos su obtención con características comparables a la proteína de origen humano.

#### **ESPECÍFICOS**

- a) Obtener y purificar la proteína recombinante hLF a partir del sistema eucariótico *P. pastoris*.
- b) Realizar un estudio de parámetros termodinámicos de la proteína recombinante hLF obtenida, mediante espectroscopía de dicroísmo circular.

## V. METODOLOGÍA

### 5.1 OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE hLF PURIFICADA.

#### 5.1.1 Construcción del plásmido recombinante para la expresión y la secreción de la proteína recombinante en la levadura *P. pastoris*.

Los vectores de expresión que se utilizaron fueron los plásmidos recombinantes pGZaLM sintetizados en por Invitrogen, y fueron producto de la clonación del plásmido pGAPZαA (Invitrogen) y los genes con secuencias de nucleótidos optimizadas que codifican a la proteína de la LM recombinante, se sintetizaron *in vitro* utilizando como referencia las secuencias del ARNm de la proteína de la LM que están publicadas en el GenBank: LACTOFERRINA | Gen LTF, REFSEQ: AY165046.1. *P. pastoris*. La secuencia de nucleótidos codificante optimizada está flanqueada “en marco” a una región promotora GAP (pGAP), por una región codificante del factor de secreción α, para secretar una proteína estable al medio de cultivo de la levadura. El plásmido contiene una región que codifica un motivo de polihistidinas que da especificidad a la proteína recombinante. Contiene una región de terminación de la transcripción (AOX1) que incrementa la estabilidad de la proteína recombinante. Por otro lado, el plásmido utilizado contiene un gen de resistencia al antibiótico Zeocina™ con sus regiones reguladoras específicas para el huésped procarionte y el huésped eucariote, este gen permite seleccionar sólo las células que han sido transformadas con el plásmido. Finalmente, el plásmido contiene una región de origen de replicación, la cual le permite ser reconocida y autoreplicarse en el huésped procarionte.

#### 5.1.2 Propagación y conservación de los plásmidos

Para obtener plásmidos en cantidad y calidad apropiadas, y conservarlos, se realizó la transformación de *E.coli* OneShot® Top 10 por el método químico de CaCl<sub>2</sub>/choque térmico. Esta transformación se fundamenta en la generación de

células competentes con el  $\text{CaCl}_2$ , debido a que los iones de  $\text{Ca}^{+2}$  tienen la capacidad de unirse a la membrana plasmática, lo que facilita la unión del ADN plasmídico cargado negativamente, el posterior choque térmico permite la permeabilización de la membrana y así el ADN unido a la membrana se puede internalizar (Sambrook, y col., 2001).

La extracción y purificación del plásmido se realizó por el método Dimitry Mozzherin de lisis alcalina indicado en el kit QIAGEN® miniprep. Para verificar la correcta transformación de *E. coli* se emplearon dos métodos: 1) PCR de punto final y 2) una doble digestión con las enzimas de restricción XhoI y XbaI.

### **5.1.3 Transformación de la levadura *P. pastoris* X-33 con el plásmido pGAPZ B linealizado.**

La cepa de *P. pastoris* X-33, wild type HIS4+, Mut+ (C18000, Invitrogen), fue la utilizada para la expresión de proteínas recombinantes a partir de vectores con resistencia a Zeocina™ como único marcador seleccionable (pGAPZ y pGAPZα). La cepa *Pichia* Classic X-33 conserva un gen HIS4 funcional (HIS4+) y puede ser usado con otros marcadores seleccionables como Zeocina (vectores pPICZ). Otra consideración es la inducción con metanol bajo el promotor AOX1, o la expresión constitutiva de la proteína bajo el promotor GAP. Una cepa de *Pichia* Classic con una designación "Mut+" significa que la cepa tiene genes AOX1 y AOX2 operables (GS115, X-33, SMD1168) y desarrolla rápidamente tras la inducción con metanol.

Se empleó el método físico de electroporación por pulsos de decaimiento exponencial, por el cual se pueden alcanzar altas eficiencias de transformación (en promedio  $10^{4-6}$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico). En este método las células son expuestas a un campo eléctrico de alto voltaje, lo que genera un re-arreglo temporal de la membrana celular, así las células son permeables para tomar solutos del medio ambiente que las rodea, como ADN plasmídico y otras moléculas más pequeñas (Ausubel y col., 2002).

### **5.1.3.1 Digestión de los plámidos**

Para la transformación de la levadura, primero se realizó la digestión de 10 µg del ADN plasmídico con la enzima *Bsp* HI, que corta una vez en la región del promotor GAP (356pb) para linealizar el vector, se siguió el protocolo de digestión descrito por el fabricante. La completa digestión del plásmido se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v teñido con SYBR Gold™. Una vez linealizados los vectores, se eliminaron las sales por medio de una precipitación del ADN plasmídico con 0.7 volúmenes de isopropanol y un lavado con etanol al 70 %, y se re-suspendieron con 10 µL de agua desionizada estéril y se mantuvieron a 4 °C hasta la electroporación.

### **5.1.3.2 Preparación de células electrocompetentes de *P. pastoris* X-33**

La levadura *P. pastoris* X-33 fue activada en 15 mL medio líquido YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose, Sigma Aldrich) durante 24 h/30°C con agitación a 150 rpm, se verificó pureza en agar YPD (Sigma Aldrich). Una colonia aislada de la levadura en agar YPD se inoculó en 50 mL de caldo YPD y se incubó en las mismas condiciones de activación. Para la transformación de las células de *P. pastoris* X-33, se tomaron 20 mL del cultivo y se centrifugaron durante 5 minutos a 1,500 rpm. El sobrenadante resultante se desechó y la pastilla se lavó con agua destilada estéril a 4°C. Se realizó una segunda centrifugación de las células lavadas por 10 minutos a 1,500 rpm. La solución de transformación se vertió en una cubeta de 0.2 cm (Bio-Rad Laboratories) y las células se resuspendieron en 5 mL de sorbitol 1 M, estas células electrocompetentes se mantuvieron a 4°C y de procedió a la electroporación el mismo día.

### **5.1.3.3. Transformación de *P. pastoris* X-33 mediante electroporación.**

En celdas de electroporación de 0.2 cm previamente enfriadas en hielo, se mezclaron 80  $\mu$ L de las células de *P. pastoris* electrocompetentes con 5  $\mu$ g de ADN plasmídico linealizado correspondiente a la proteína de interés. Las celdas con la mezcla se incubaron 5 minutos en hielo, previo a colocarlas en el electroporador Gene Pulser Xcell (Bio-Rad Laboratories) bajo las siguientes condiciones: 25  $\mu$ F de capacitancia, 200 Ohm de resistencia y 2.0 kV de voltaje. Inmediatamente después de electroporar se adicionó 1 mL de sorbitol 1 M frío a las celdas y se transfirió el contenido a tubos estériles de 1.5 mL, se incubaron a 30 °C/ 1 h sin agitación para permitir la recuperación de las células, se inocularon las células en placas de medio YPD con sorbitol al 1 M y 300  $\mu$ g/mL de Zeocina™, se incubaron a 30 °C/72 h y se eligieron colonias aisladas para la genotipificación.

### **5.1.3.4 Genotipificación**

Mediante PCR de punto final se realizó la amplificación de la región que abarca el promotor GAP y la región TransR para hLF para verificar la incorporación del gen recombinante hLTF en el genoma de la levadura *P. pastoris*.

El ADN genómico se extrajo con el Kit PureLink® Genomic DNA. Se utilizaron cultivos de 3 mL con 16 h de incubación a 30 °C y 150 rpm. 1.5 mL del cultivo se centrifugó a 6,000 rpm/10 min., el pellet se resuspendió en 500  $\mu$ L de buffer CTAB (100 mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 2 % p/v CTAB, 1.4 M NaCl, pH=8.0) y se adicionaron 180  $\mu$ L del buffer de digestión PureLink® Genomic más 20  $\mu$ L de proteinasa K, la digestión se realizó a 55 °C por 2.5 h. Una vez digerido se adicionaron 20  $\mu$ L de RNAsa, se mantuvo a temperatura ambiente por 2 min y se adicionaron 200  $\mu$ L del buffer de lisis PureLink® Genomic, se centrifugó a 14,000 rpm/5 min y se recuperó el sobrenadante. Al sobrenadante se adicionaron 200  $\mu$ L de etanol al 96 % v/v y se homogeneizó en vortex. Terminada la lisis celular se

continuó con el protocolo descrito por el fabricante (PureLink® Genomic DNA Kits User guide, ThermoFisher Scientific).

El ADN genómico de las cepas transgénicas de *P. pastoris* se utilizó como templado para la amplificación por PCR de punto final de la región mencionada anteriormente utilizando oligonucleótidos GAP-sentido y TransR-antisentido para hLF. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en una mezcla con un volumen final de 5 µL que contenía 2.5 µL del Platinum™ SuperFi Master Mix 2x, 1 µL de ADN genómico diluido 1:2 en agua grado PCR y concentraciones equimolares (0.5 µM) de los oligonucleótidos. Las condiciones empleadas fueron temperatura de desnaturalización inicial de 98 °C por 10 s, temperatura de desnaturalización en cada ciclo fue 98 °C durante 1 s, temperatura de alineamiento 56 °C durante 5 s, temperatura de extensión 72 °C (45 s LF), la temperatura de extensión final de 72 °C durante 1 min. El proceso se realizó por 30 ciclos. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1 % p/v teñido con SYBR Gold™.

#### **5.1.4 Producción, extracción y purificación de la proteína recombinante hLF.**

Las células transformadas de *P. pastoris* se inocularon en medio líquido YPD con 300 µg/mL de Zeocina incubando a 30°C y 200 rpm durante 72 horas para inducir la producción de la proteína. La proteína recombinante de interés obtenida se extrajo a partir del medio de cultivo y se purificó utilizando el kit ProBond Purification System (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este sistema se basa en la purificación de las proteínas recombinantes mediante una cromatografía de afinidad utilizando una matriz polimérica activada con ácido iminodiacético y níquel, el níquel es un metal di y trivalente que permite separar selectivamente las proteínas recombinantes marcadas con residuos de polihistidina (His Tag). La proteína recombinante pura se almacenó a -20°C para su posterior caracterización termodinámica mediante dicróismo circular.



#### **5.1.4.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)**

El medio de cultivo de las levaduras transgénicas, concentrado en tubos AMICON® 10,000K fue analizado mediante SDS- PAGE para determinar la expresión y la secreción de la rhLF.

Una alícuota del medio de cultivo se mezcló en una proporción 1:1 (v/v) con una solución amortiguadora de carga de muestra compuesta de Tris-HCl 65.8 mM pH 6.8, SDS 2.1 % (p/v), glicerol 26.3 % (v/v), azul de bromofenol 0.01 % (p/v) y 2-mercaptoetanol 355 mM. La solución de trabajo se calentó a 90 °C/10 min y se cargó en un gel de poliacrilamida con un gradiente de 4 % a 20 %. Se incluyó el marcador de masa molecular Precision Plus Protein y el estándar de la LF de bovino como referencia para identificar las rhLF en función de su movilidad relativa. La electroforesis se realizó en una cámara Mini PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) utilizando una solución amortiguadora de corrida compuesta de Tris base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1 % (p/v), pH 8.3. Las condiciones de corrida fueron: 70 V durante 15 min y luego, 110 V durante 70 min. Los geles se tiñieron con el QC Colloidal Coomassie Stain (Bio-Rad), fotodocumentados con el GelDoc EZ (Bio-Rad) y las imágenes se analizaron con el software ImageLab 5.2.1 (Bio-Rad).

#### **5.2 PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE hLF OBTENIDA, MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR.**

Las mediciones de dicroísmo circular se realizaron utilizando un espectrofotómetro MOS-500 Bio-Logic. Las soluciones de proteína se prepararon a 0.02 mg/mL en tampón fosfato, luego se colocaron 2 mL en una celda de cuarzo con una longitud de paso óptico de 1 cm. Durante las mediciones se controló la temperatura con un peltier. Los espectros se obtuvieron en el rango de 206 nm a 260 nm con una rendija: 0.5, paso: 0.25 y tadq: 0.5 s. Para los experimentos en los que se varió el pH, la solución de LF se ajustó con NaOH o HCl según correspondiera, a 30 °C. En el

programa Biokine del espectrofotómetro se programó una rampa de temperatura de 30 °C a 86 °C, adquiriendo espectros de dicroísmo circular cada 2 °C.

## **VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

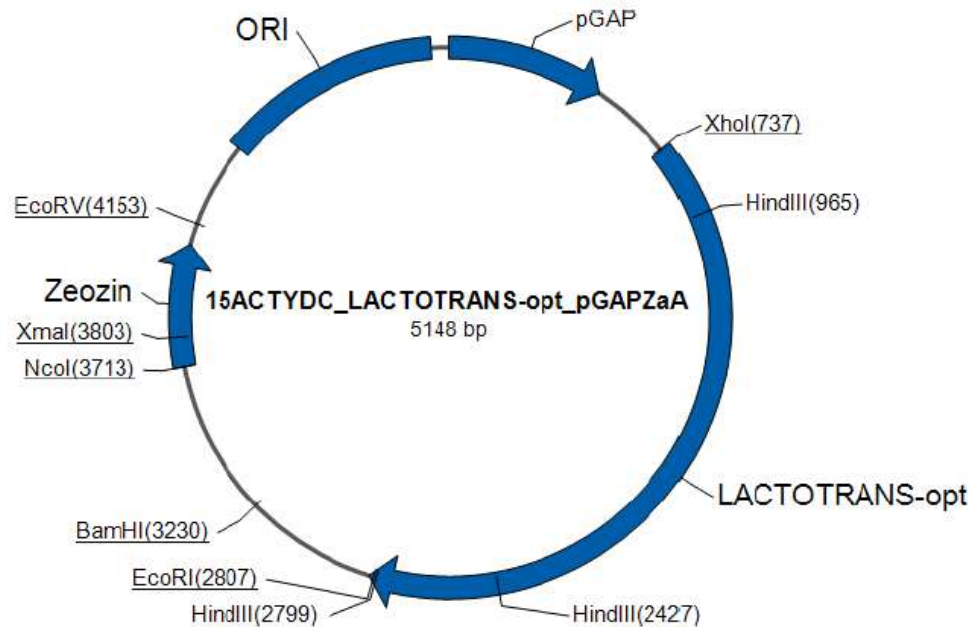
### **6.1. OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE hLF PURIFICADA.**

En diversos países, se están realizando extensos estudios para desarrollar métodos biotecnológicos para obtener hLF a partir de plantas transgénicas, hongos y la leche de varios animales agrícolas (Macauley y col., 2005), y poder satisfacer la necesidad de su producción a nivel industrial.

Una de las principales características compartidas por todos los vectores de expresión de *P. pastoris* es un casete de expresión, que se compone de una secuencia promotora (más a menudo el promotor AOX1), una secuencia de terminación transcripcional derivada de AOX1 que dirige el procesamiento 3' y la poliadenilación eficiente de los ARNm y, entre ellos, sitios de clonación únicos o múltiples para la inserción del gen de interés. Si el promotor AOX1 no es adecuado, se pueden utilizar otros promotores como GAP, FLD1, PEX8 e YPT7. El promotor GAP se deriva del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP) de *P. pastoris*. La ventaja de usar este promotor es que no se requiere metanol para la inducción, ni es necesario cambiar los cultivos de una fuente de carbono a otra, lo que hace que el crecimiento de cepas y la expresión de proteínas sean más convenientes y sencillos. El promotor GAP también es conveniente para expresar proteínas marcadas (Goldman y col., 2012).

La Figura 1 muestra el mapa del plásmido; el gen sintético LACTOTRANS-opt se ensambló a partir de oligonucleótidos sintéticos y/o productos de PCR. El fragmento fue insertado en pGAPZalphaA\_A049. El ADN plasmídico se purificó a partir de bacterias transformadas y su concentración determinada por espectroscopía UV. La

construcción final fue verificada por secuenciación. La congruencia de secuencia dentro de los sitios de inserción fue del 100%.



**Figura 1. Mapa del plásmido LACTOTRANS-opt, indicando los sitios de clonación.**

Las proteínas heterólogas expresadas en *P. pastoris* se pueden producir intracelular o extracelularmente. Debido a que esta levadura secreta solo niveles bajos de proteínas endógenas, la proteína heteróloga secretada constituye la gran mayoría de la proteína total en el medio. Por lo tanto, dirigir una proteína heteróloga al medio de cultivo puede servir como un primer paso importante en la purificación. Sin embargo, debido a la estabilidad de la proteína y los requisitos de plegamiento, la opción de secreción generalmente se reserva para proteínas exógenas que normalmente son secretadas por sus huéspedes nativos. Se debe considerar la proporción del medio de cultivo respecto al volumen del matraz y la agitación para que la aireación del medio de cultivo permita el óptimo desarrollo de la levadura y

por tanto la producción de la proteína de interés (Cereghino y Cregg, 2000; Cereghino y col., 2002; Macauley y col., 2005).

### **6.1.1. Propagación y conservación del plásmido recombinante pGZ $\alpha$ LM**

#### **6.1.1.1. Transformación de células ultracompetentes de *E.coli* OneShot™ Top10**

Para iniciar con la producción de las proteínas recombinantes se propagaron los plásmidos recombinantes pGZ $\alpha$ LM en cantidad y calidad apropiadas, se utilizó como hospedero procarionte células ultracompetentes de *E. coli*, OneShot™ Top10, transformándolas por el método químico de CaCl<sub>2</sub>/choque térmico.

La verificación de la transformación se hizo utilizando el recurso del gen de resistencia a Zeocina que está incluido en el plásmido que permite seleccionar las células transformadas. Para ello se inocularon placas de medio YPD, incluyendo algunos controles:

- Control negativo: cepa no transformada en el medio de cultivo con el antibiótico.
- Control positivo: cepas transformadas con el plásmido pPUC19, incluido en el kit de la cepa como recurso de verificación de la transformación.
- Control de viabilidad: cepa no transformada en el medio de cultivo sin el antibiótico.
- Control de la funcionalidad del antibiótico: *Salmonella* Thompson ATCC 8391 y *Staphylococcus aureus* ATCC 89213 en el medio de cultivo con el antibiótico.

En la Tabla 3 se muestran los resultados del desarrollo de *E.coli* Top10 con el plásmido pGZ $\alpha$ LM LF y sus controles, es evidente la adecuada transformación y funcionalidad de las cepas.

**Tabla 3. Ufc de células transformantes de *E. coli* Top 10 y sus controles den placa de medio selectivo con Zeocina™**

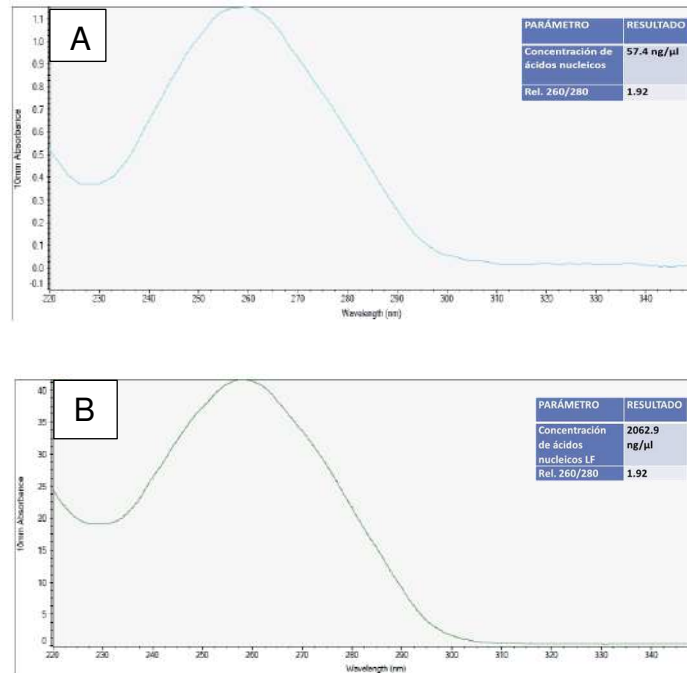
<b>Muestra</b>	<b>UFC/placa</b>
Transformantes LF	>25
Control negativo	0
Control positivo	6-15
Control de viabilidad	>25
Control de funcionalidad Zeocina™	0

Coincidiendo con lo publicado en diversas investigaciones (Islam *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017) *E. coli* resultó ser un hospedero procariote adecuado para la propagación del plásmido, hecho que se atribuye principalmente a la deficiencia en endonucleasa A, por presentar recombinación deficiente y síntesis constitutiva de desoxirribosa. Se hicieron algunas modificaciones al método del CaCl<sub>2</sub>/choque térmico descrito por Ausubel (Ausubel, 2002), lo que incluyó disminuir el tiempo del choque térmico de 2 minutos a 30 segundos, y agregar una incubación en hielo posterior al choque térmico por 2 minutos, esto para disminuir el tiempo de exposición celular a alta temperatura (42 °C) y evitar daño celular. Definir la temperatura y el tiempo de incubación son condiciones particularmente trascendentes en la transformación (Im, 2011). Optimizaciones realizadas al método para transformar *E. coli* han mostrado que con menores tiempos de incubación en la etapa de choque térmico, se tiene mayor eficiencia de transformación (Nakata y col., 2008). La etapa de recuperación celular se hizo con medio S.O.C a 150 rpm, en lugar de medio LB, el primero funciona como osmoprotector al contener iones divalentes. También está publicado que la agitación ayuda a incrementar la eficiencia de transformación (Im, 2011). En general, estas modificaciones permiten una mejor recuperación celular y una

correcta expresión del gen marcador de resistencia a antibióticos después del proceso de choque térmico y con ello una mayor probabilidad de éxito en la recuperación de transformantes en medio selectivo (Chang y col., 2017; Im, 2011).

### 6.1.1.2. Cuantificación del plásmido purificado

En la Figura 2 se muestran las curvas de la cuantificación de la extracción/purificación del plásmido pGZαLM LF a escala miniprep (a) y maxiprep (b)



**Figura 2. Curva de cuantificación del plásmido recombinante pGZαLM LF extraído con el QIAGEN® Plasmid Mini Kit (A) y Maxi Kit (B).**

La extracción/purificación del plásmido llevada a cabo por el método de lisis alcalina permitió obtener concentraciones de 57.4 ng/μL para el plásmido que contiene la secuencia de nucleótidos optimizada hLTF a escala de miniprep. Estas concentraciones son suficientes para verificar la correcta transformación, solo se

requieren concentraciones de 1 pg a 1 ng. La extracción a escala de maxiprep, tiene como objetivo proveer de plásmidos para la transformación de *P. pastoris* por electroporación, donde se requieren concentraciones de 1 µg/µl. En la extracción maxiprep hay puntos clave en el método para obtener rendimientos máximos, como utilizar soluciones buffer de reciente preparación y realizar la elución con amortiguador TE a una temperatura de 65 °C en lugar de temperatura ambiente (Ausubel, 2002; Sambrook, 2001).

### 6.1.1.3. Genotipificación del plásmido purificado

Los eventos de inserción genética en el promotor GAP surgen de un único cruce entre el promotor y la región PGAP en los vectores pGAPZ o pGAPZα. Esto da como resultado la inserción de una o más copias del vector río arriba o río abajo del promotro GAP.

La Figura 3 muestra el resultado de la inserción del plásmido 5´ al promotor GAP y PGAP, el gen de interés y la resistencia a Zeocin™. Esto también ocurre con plásmidos no linealizados y plásmidos ligados, aunque con menor frecuencia.

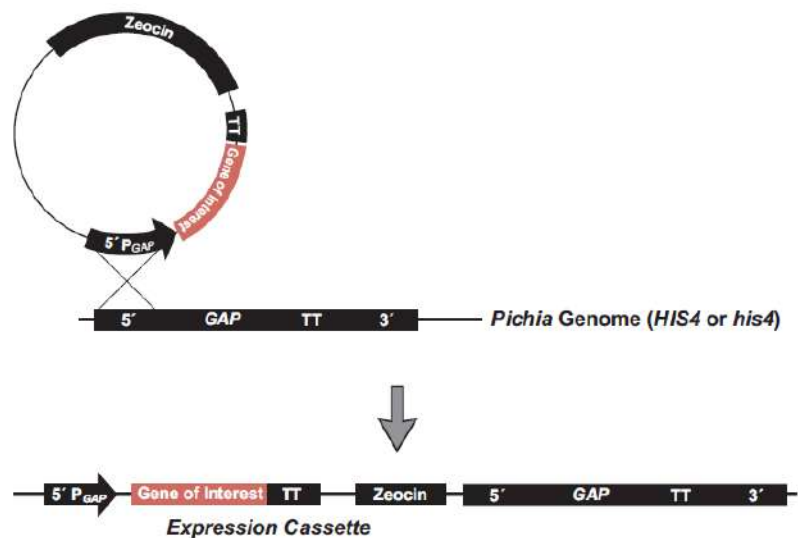


Figura 3. Esquema de amplificación del plásmido LACTOTRANS-opt.

En la Figura 4 se muestra la secuencia de nucleótidos del plásmido y los sitios de corte de las enzimas *Xho*I y *Xba*I.

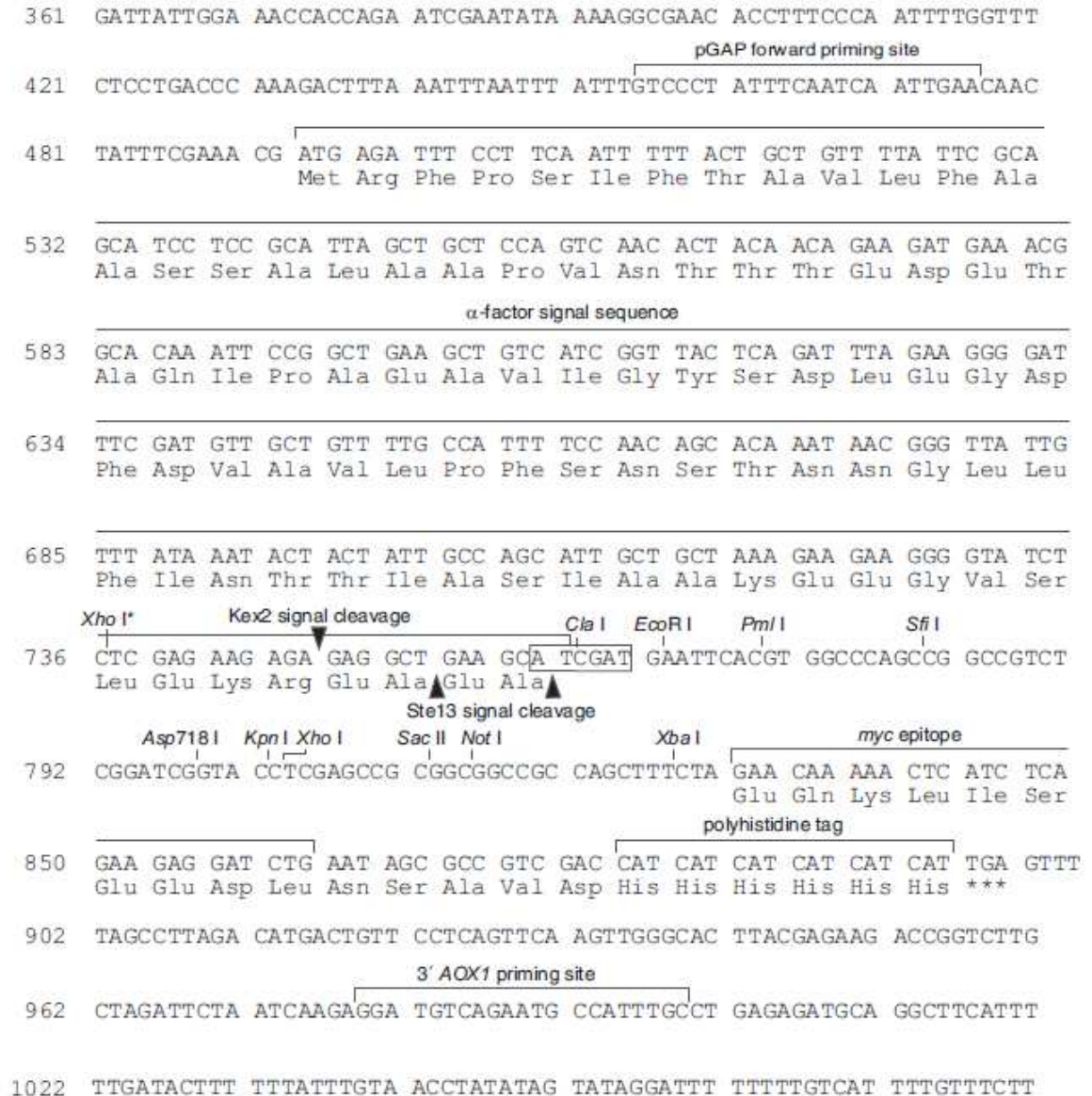
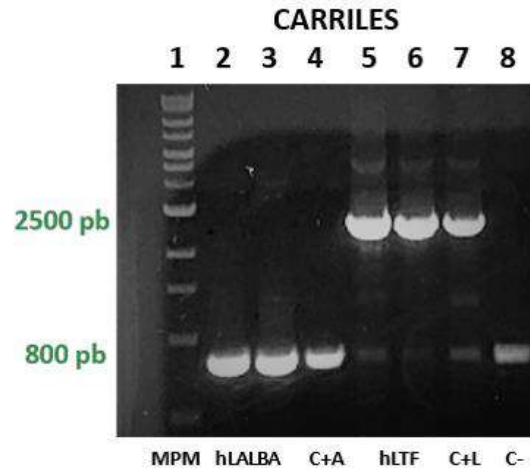


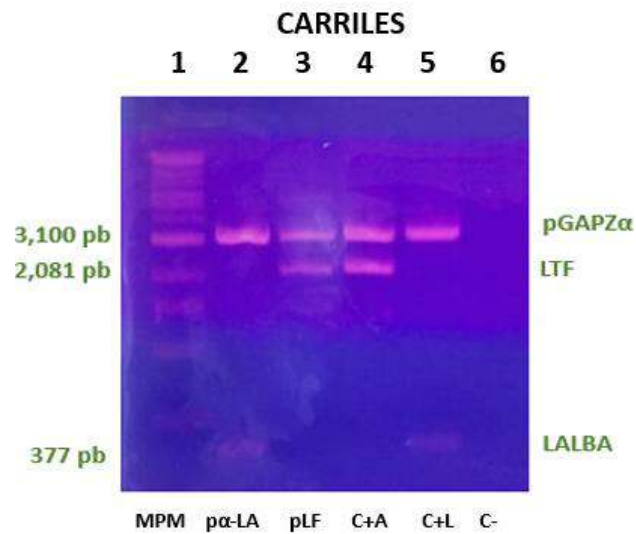
Figura 4. Patrón de digestión del gen LACTOTRANS-opt con las enzimas *Xho*I y *Xba*I.



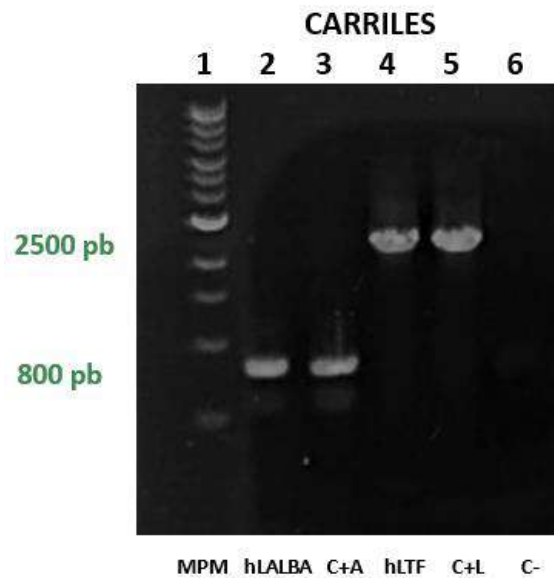
La genotipificación del plásmido por PCR y la digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *XbaI* fueron analizados por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v (Figuras 5, 6 y 7).



**Figura 5.** Análisis electroforético de los productos de PCR del Miniprep en gel de agarosa al 1 % p/v. Carriles, 1: marcador de peso molecular, 5-6: gen hLTF, 7: control lactoferrina.



**Figura 6.** Análisis electroforético de los productos de la digestión doble con las enzimas de restricción *XhoI* y *XbaI* en gel de agarosa al 1 % p/v. Carriles, 1: marcador de peso molecular, 3: plásmido purificado pGZαLM LF, 5: control positivo para pGZαLM LF, 6: control negativo.



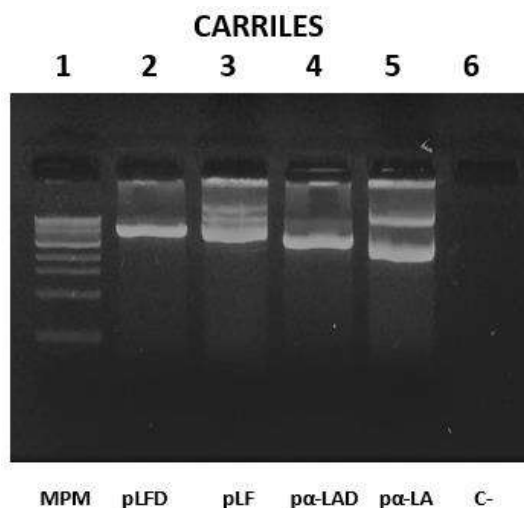
**Figura 7. Análisis electroforético de los productos de PCR del Maxiprep en gel de agarosa al 1 % p/v. Carriles, 1: marcador de peso molecular, 4: gen hLTF, 5: control lactoferrina, 6: control negativo.**

Los gels de electroforesis donde se analizaron los productos de la digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *XbaI* así como los productos de PCR (Fig. 5 y 6) muestran fragmentos correspondientes al gen que codifica para la proteína rhLTF (2,500 pb), y que corresponde a su control positivo. En la Fig. 6 se muestra el gel correspondiente a la digestión con las enzimas de restricción, donde se comparan la muestra con su respectivo control positivo y con el marcador de peso molecular. Se observan bandas en 3100 pb, que corresponde al plásmido PGAPZ $\alpha$ A y bandas en 2,081 pb para el fragmento hLTF que codifica a la proteína hLF. Las endonucleasas de restricción generan productos más pequeños porque cortan casi exactamente en los límites de las secuencias de nucleótidos optimizadas hLTF, mientras que los oligonucleótidos abarcan secuencias propias del promotor GAP y del factor de secreción  $\alpha$ , así como las secuencias codificantes del c-myc y de la cola de polihistidinas. Como controles positivos se emplearon los plásmidos recombianes pGZ $\alpha$ LM originales.

## 6.1.2. Transformación de *P. pastoris*

### 6.1.2.1. Digestión de los plásmidos

Previo al proceso de electroporación es necesario linealizar el plásmido, para lo cual se empleó la enzima de restricción *Bsp*HI que corta en una región cercana al promotor GAP. En la Fig. 8 se muestra el gel resultado de la verificación de la digestión. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular, los carriles 2 y 3 corresponden a los plásmidos de LF digerido y sin digerir respectivamente. Para los plásmidos no digeridos se pueden observar bandas que corresponden a los distintos grados de enrollamiento del ADN lo que ayuda a diferenciarlos de los plásmidos ya digeridos, los cuales presentan una sola banda en el análisis electroforético. En el carril 6 se muestra el control negativo para la digestión, el cual contenía agua estéril en lugar de plásmido.



**Figura 8. Análisis electroforético de los productos de la digestión con la enzima *Bsp*HI en gel de agarosa al 1 % p/v. Carriles, 1: marcador de peso molecular, 2: plásmido pGZαLM LF digerido, 3: plásmido pGZαLM LF sin digerir, 6: control negativo.**

### 6.1.2.2. Electroporación

En la Tabla 4 se muestran los resultados de los recuentos en placa de las presuntivas transformantes con las secuencias de nucleótidos optimizadas hLTF, en los distintos volúmenes de inóculo y su duplicado. Así como el control negativo, donde se electroporó empleando agua estéril en lugar de plásmido y un volumen de 25  $\mu\text{L}$  por placa.

En la Fig. 9 se muestran las placas de medio YPD con Zeocina™ con las colonias presuntivas transformantes para hLTF. Las colonias presentan una morfología típica de *P. pastoris* (colonias cremosas y redondeadas). Esas características se tomaron en consideración para posteriormente hacer la selección de las colonias.

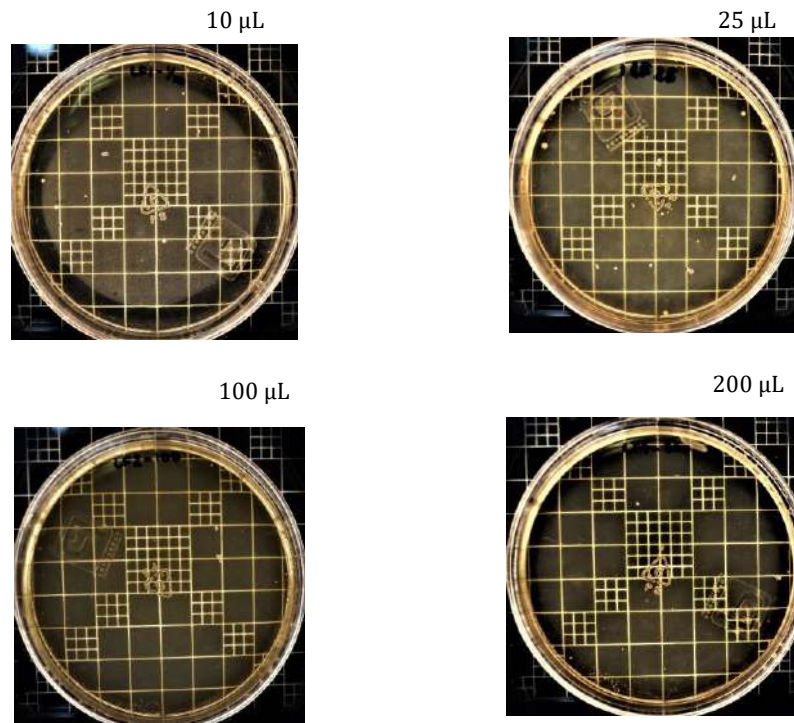
Está documentado que mientras menor sea el volumen extendido en la placa mejor es la acción de selección por parte del antibiótico. Lo cual se puede ver en las placas con volúmenes de 10 y 15  $\mu\text{L}$ , mientras que para las placas con 100 y 200  $\mu\text{L}$  las placas presentan un mayor número de colonias con menor tamaño en las orillas de la placa. Para el cálculo de la eficiencia de transformación se consideraron los datos del volumen de inóculo de 25  $\mu\text{L}$  que es donde se presenta el máximo conteo en placa tanto para las cepas de a-LA como para las de LF.

Diversos factores tales como la composición del vector, la cepa del huésped, el método de transformación y la presión selectiva influyen en la eficiencia de transformación, la estabilidad del vector y el número de copias, por lo que no existen reglas generales para una exitosa expresión de un vector (Porro y Mattanovich, 2004). Por otro lado, aunque el promotor GAP proporciona un nivel de expresión constitutivo, otros promotores regulables tal como el AOX 1 pueden "desactivar" la expresión de proteínas heterólogas antes de la inducción, minimizando la selección de transformantes que no expresan durante la fase de crecimiento y permitiendo un control más estricto de la expresión (Pecorini y col., 2005).

**Tabla 4. Ufc/placa de las cepas presuntivas transformantes con hLTF en medio selectivo con Zeocina™ en cuatro volúmenes de inóculos probados.**

Cepa	10 µL UFC/placa	25 µL UFC/placa	100 µL UFC/placa	200 µL UFC/placa
LF 1	13	27	13	10
LF 2	15	13	10	5
Media	14	20	12	8
Control negativo	NA	0	NA	NA
<b>Eficiencia de transformación</b>	1.02 x 10 <sup>6</sup> UFC/ µg de ADN			

NA: No aplica



**Figura 9. Presuntivas transformantes con hLTF en placas de medio selectivo con Zeocina™ en los cuatro volúmenes de inóculo probados y después de 72 horas de incubación.**

### 6.1.2.3. Genotipificación de las células transformadas de *Pichia pastoris*

Se cuantificó el ADN genómico extraído de las cepas presuntivamente transformadas con el gen hLTF, y tanto la concentración como la pureza fueron adecuadas para la realización del PCR, dando valores desde 14.3 hasta 37.4 ng/μL y pureza entre 1.54 y 3.19 ng/μL. Una de la cepas se descartó debido a que la pureza de 3.19 nos indica un alto grado de contaminación química residual después del proceso de extracción.

La Figura 10 muestra los resultados de la amplificación de la región que comprenden los oligonucleótidos sentido pGAP y antisentido AOX1 obtenidos por PCR de punto final de las colonias seleccionadas de las placas en medio selectivo con Zeocina™ con morfología característica de *P. pastoris*. Se observa que los fragmentos amplificados por PCR corresponden con el tamaño teórico de 2,500 pb esperados para las secuencias de nucleótidos optimizadas de hLTF, sin embargo, de las nueve cepas presuntivamente transgénicas de *P. pastoris* resistentes a Zeocina™ que se probaron, una no generó los productos de PCR correspondientes, es decir, no se insertó el genotipo hLTF.

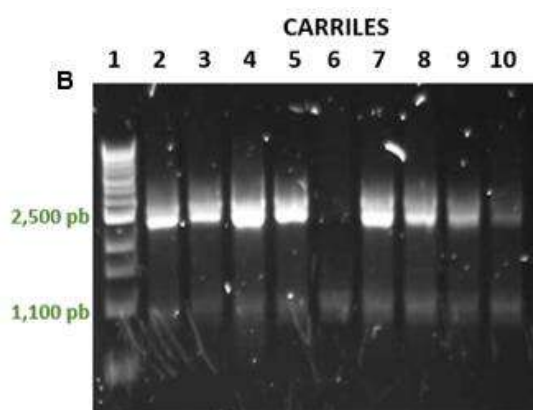
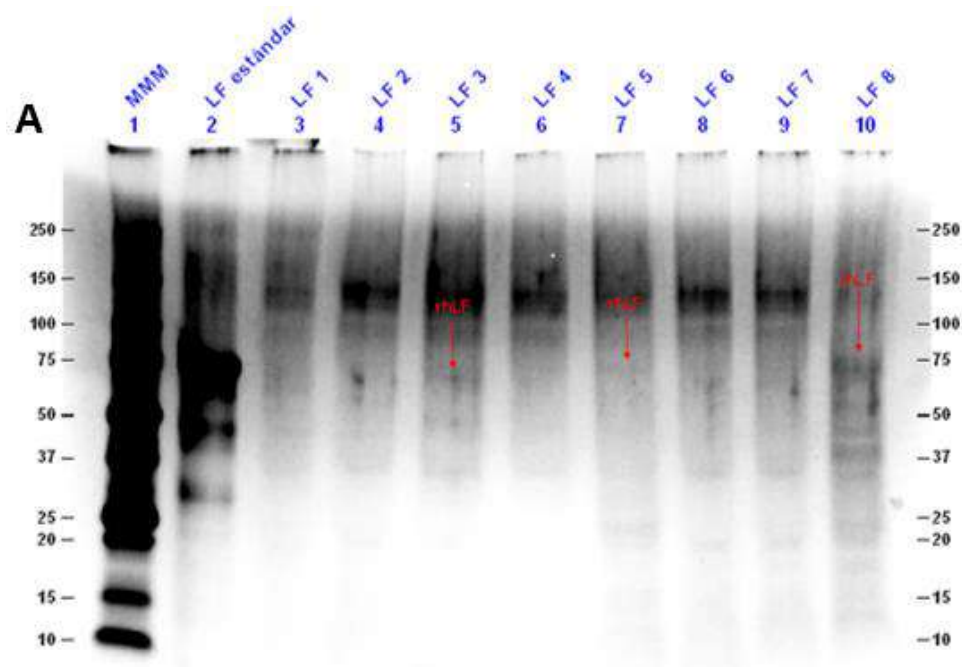


Figura 10. Análisis electroforético en geles de agarosa al 1 % p/v de los productos de PCR de las secuencias de nucleótidos que codifican para la proteína rhLF. Carriles, 1: marcador de peso molecular, carriles 2-10: muestras de los productos de PCR para hLTF.

#### **6.1.1.4. Producción, extracción y purificación de las proteínas recombinantes**

*Pichia pastoris* es particularmente adecuada para la expresión de proteínas heterólogas por varias razones, incluida la facilidad de manipulación genética, selección de genes; transformación de ADN de alta frecuencia; clonación mediante complementación funcional; altos niveles de expresión de proteínas a nivel intra o extracelular; y la capacidad de realizar modificaciones de proteínas eucariotas superiores, como glicosilación, formación de enlaces disulfuro y procesamiento proteolítico (Macauley-Patrick y col., 2005). Es una levadura con altos requerimientos de oxígeno, condición necesaria para su óptimo desarrollo y para la producción de las rHMP. En la literatura se encuentra publicado que para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* se debe tomar en cuenta la proporción del medio de cultivo respecto al volumen del matraz y la agitación para que la aireación del medio de cultivo permita el óptimo desarrollo de la levadura y por ende la producción de la proteína de interés (Cereghino y col., 2002; *Pichia Fermentation Process Guidelines*, Invitrogen). Se evaluó la fracción de las proteínas totales presentes en el medio de cultivo de las cepas de *P. pastoris* transformadas con las secuencias de nucleótidos optimizadas hLTF. En la Figura 11 las flechas en rojo señalan la presencia de la rhLF, las cuales presentan una movilidad relativa similar a la de los estándares de bovino, debido a que las rHMP al ser proteínas de fusión también cuentan con el epítome myc y la cola de polihistidinas que permiten su identificación con anticuerpos y la purificación específica respectivamente. Sólo las cepas LF 3, LF 5 y LF 8 expresaron niveles bajos de la rhLF y no se detectó la presencia de la rhLF en el medio de cultivo de las demás cepas transformadas de la levadura.



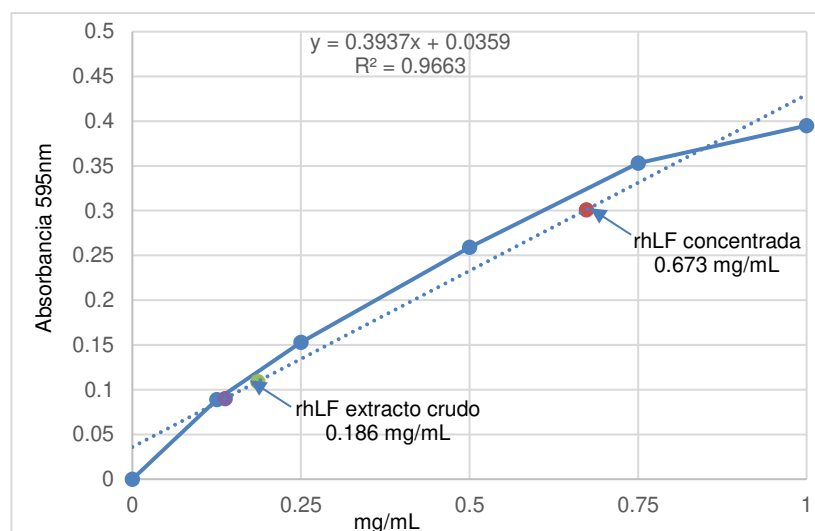
**Figura 11. Análisis electroforético SDS-PAGE de los extractos obtenidos del medio de cultivo de las cepas transgénicas de *P. pastoris* transformadas con el gen hLTF cultivadas en 50 mL de caldo YPD con Zeocina™ a 300 µg/mL.**

Varios son los promotores que se han desarrollado para la expresión de proteínas heterólogas utilizando el sistema de *Pichia*. Los promotores AOX1 y GAPDH son ampliamente utilizados para la producción de proteínas. Bajo condiciones de cultivo optimizadas, el promotor PpAOX1 se ha desempeñado mejor que el promotor PpGAPDH ya que se ha observado una mayor expresión de rhLF bajo el promotor PpGAPDH. Esto indica que el promotor inducible (PpAOX1) proporciona un mejor control, probablemente debido a la fase de producción más corta, que el proceso PpGAPDH (Cereghino y Cregg, 2000; Choi y col., 2008). Por otro lado, Chen y col. sugieren optimizar el pH y la concentración de  $Fe^{3+}$  para la expresión de LF recombinante (Chen y col., 2007).



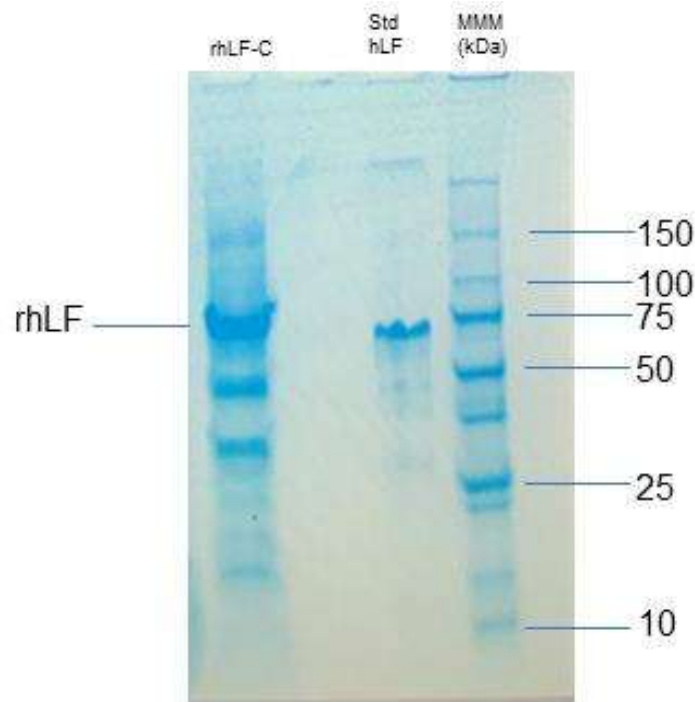
Los extractos obtenidos se concentraron en tubos AMICON™ Ultracel 10K (Merck, Darmstadt, Alemania), el procedimiento se realizó dos veces y se cuantificó la proteína total tanto en el extracto crudo como en el concentrado.

El sistema de expresión de *Pichia* se ha utilizado ampliamente para producir una variedad de proteínas heterólogas diferentes, muchas de las cuales están enumeradas por Cereghino y Cregg en el año 2000. Desde 2002 ha habido un gran aumento en la producción de proteínas heterólogas en *Pichia*. El crecimiento celular es particularmente importante para la producción de proteína secretada en biorreactores, ya que la concentración del producto en el medio extracelular es directamente proporcional a la concentración de células en el cultivo. (Macauley-Patrick y col., 2005), dato que coincide con lo encontrado en esta investigación. La producción de LF tuvo un bajo rendimiento en el medio de cultivo 0.186 mg/mL, concentrando dos veces en un tubo AMICON™, una concentración de 0.673 mg/mL (Figura 12). Los datos encontrados en la literatura incluyen rendimientos de proteína recombinante usando el sistema de expresión *Pichia* de 40 mg/L de LF equina, 12 mg/L de LF porcina, ambos obtenidos en un biorreactor (Macauley-Patrick y col., 2005), sin embargo, no hay datos para la rhLF.



**Figura 12. Cuantificación de lactoferrina humana recombinante en extracto crudo, y concentrada en tubos AMICON™ Ultracel 10K.**

La Figura 13 muestra la secreción de la proteína rhLF, concentrada en tubo AMICON™, se observa el mismo esquema que en los productos no concentrados presentados en la Figura 11, sin embargo, la banda es más franca y evidente.



**Figura 13. Análisis electroforético SDS-PAGE de los extractos concentrados en tubo AMICON™ Ultracel 10K del medio de cultivo de las cepas transgénicas de *P. pastoris* transformadas con el gen hLF cultivadas en 50 mL de caldo YPD con 300 µg/mL de Zeocina™.**

## **6.2 PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE hLF OBTENIDA, MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR.**

La dispersión rotatoria óptica (ORD) y el dicroísmo circular (DC) son dos fenómenos quirópticos que diferencian dos enantiómeros. Son causados por diferentes interacciones de luz polarizada circularmente a la izquierda y a la derecha con moléculas quirales. La quiralidad es una propiedad geométrica de las moléculas; por lo tanto, las sustancias correspondientes son ópticamente activas. Hoy en día,

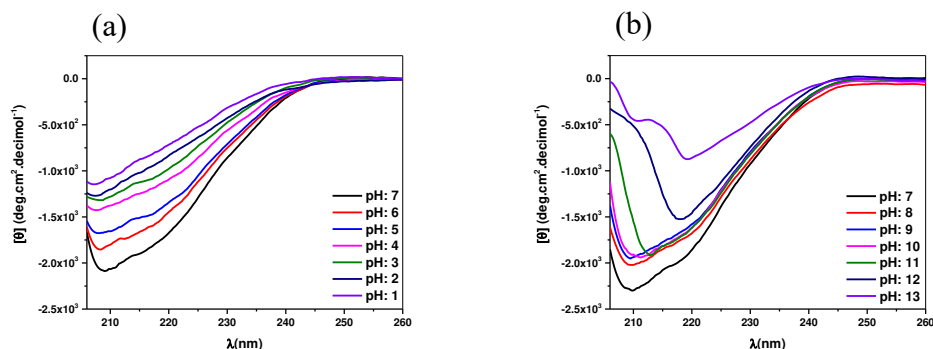
DC ha reemplazado a ORD para el análisis conformacional de proteínas porque las bandas de D C que son características de varias estructuras secundarias se pueden observar directamente (Yang y col., 1986).

Las construcciones genéticas que contienen el gen de la hLF se crearon dentro de un programa conjunto de científicos rusos y bielorrusos. Usando estas construcciones, se criaron ratones transgénicos (la concentración máxima de hLF en su leche fue de 160 g/l) y también se generaron cabras transgénicas (hasta 10 g/l de hLF en su leche). También se criaron cabreros experimentales que producían hLF en su leche, y se encontró que la rhLF era idéntica a la proteína natural en sus propiedades físicas y químicas. Estas propiedades incluyen, entre otros parámetros, estudios de espectroscopia de dicroísmo circular (Goldman y col., 2012).

Las propiedades biológicas de una proteína dependen de su estructura tridimensional, que puede verse influenciada por factores químicos y físicos (ligandos, pH, temperatura, presión, etc.) (Sreedhara y col., 2010).

### **6.2.1 Efecto del pH**

Los cambios de conformación estructural de la proteína se evaluaron midiendo los espectros de dicroísmo circular modificando el pH. La Figura 14a muestra los espectros de CD de rhLF a pH 7,0, donde los dos mínimos absolutos, a 208 nm y 220 nm, sugieren una estructura predominantemente de hélice  $\alpha$ . Cuando se aumenta el pH, estas dos señales presentan una disminución en los valores de MRE asociada a un proceso de desnaturalización (ver Figura 14b).



**Figura 14. Espectro de dicroísmo circular de la lactoferrina recombinante humana (0.02 mg/mL) en PBS a 30 °C, con valores de pH (a) 1-7 y (b) 7-13.**

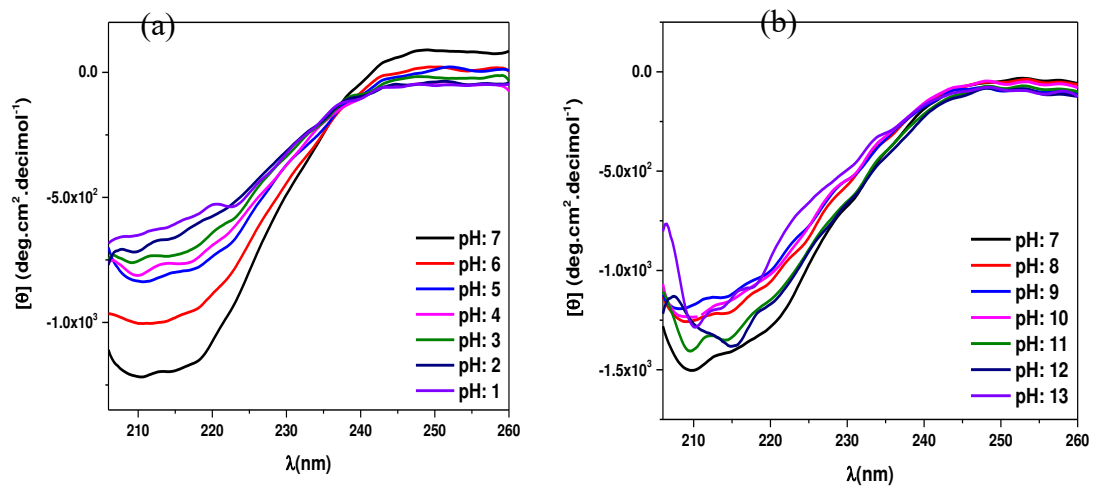
Cuando se disminuye el pH, los espectros DC de la rhLF muestran una disminución en todos los valores de MRE, asociada con una disminución en la cantidad de proteína soluble, debido a la precipitación de la muestra. Esto se confirmó mediante una simple inspección visual de la celda óptica en cada experimento. El porcentaje de valores de hélice  $\alpha$  se calculó utilizando la CD observada a 208 nm, según las Ecuaciones (1) y (2), y se presentan en la Tabla 5.

$$MRE = \frac{CD \text{ Observada a } 208 \text{ nm (mdeg)}}{C_p n l * 10} \quad \dots \text{Ec.1}$$

$$\alpha - \text{hélice (\%)} = \frac{-MRE_{208} - 4000}{33000 - 4000} * 100 \quad \dots \text{Ec.2}$$

Donde MRE corresponde a la elipticidad residual media,  $C_p$  es la concentración molar de la proteína,  $n$  es el número de amino ácidos residuales y  $l$  es la longitud del eje óptico (los mdeg son los mili grados observados a 208 nm), De los valores presentados en la Tabla 5, se puede inferir que la estabilidad de la proteína es óptima a un pH neutro.

Los espectros DC de la hLF nativa a pH 7, en las mismas condiciones que la rhLF (ver Figura 15a), también presentan dos mínimos cercanos a 208 nm y 220 nm, lo que indica un bajo porcentaje de hélice  $\alpha$  en comparación con rhLF. Para valores de pH superiores a 7, se observa una disminución en todos los valores espectrales, debido a una disminución en la cantidad de proteína soluble, asociada a su precipitación; este es el mismo comportamiento que el observado en la rhLF (ver Figura 15).



**Figura 15. Espectro de dicroísmo circular de la lactoferrina humana nativa (0.02 mg/mL) en PBS a 30 °C, con valores de pH (a) 1-7 y (b) 7-13.**

**Tabla 5. Valores de porcentaje de  $\alpha$ -hélice de lactoferrina recombinante humana y lactoferrina humana nativa a 30° C variando el pH (7 a 13) del medio (PBS).**

<i>pH</i>	<i>% <math>\alpha</math>-hélice</i>	
	<i>Lactoferrina recombinante humana</i>	<i>Lactoferrina humana nativa</i>
<b>7</b>	59.8	36
<b>8</b>	55.9	24.6
<b>9</b>	52.5	21.9
<b>10</b>	49.7	23.7
<b>11</b>	22.6	27.9
<b>12</b>	0.78	19.5
<b>13</b>	n.o.	11.7

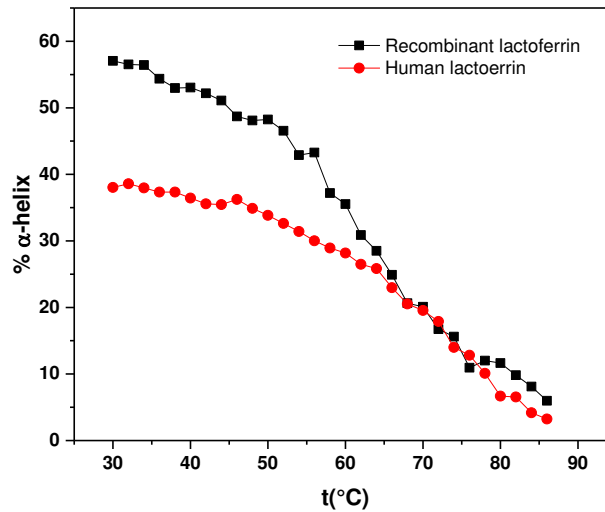
Son pocos los estudios publicados sobre cambios conformacionales evaluados mediante dicroísmo circular; sin embargo, podemos citar un estudio de Sreedhara y col. quienes, en 2010, evaluaron el efecto del pH en los espectros de dicroísmo circular del UV lejano de la lactoferrina caprina (cLF) y la bLF a pH 2,0, pH 5,0 y pH 8,0, informando que las estructuras secundarias de bLF en el rango de pH de 5 a 8,0 es constante, con cambios menores; se observó un patrón similar en el caso de cLF (Sreedhara y col, 2010).

Se han encontrado diferencias entre proteínas de distintas especies, incluso en la LF de origen humano. No es de extrañar que se encuentren diferencias entre una proteína recombinante y una nativa, aunque se trate de la misma proteína. Mediante el uso del software Chimera y el correspondiente archivo PDF (Notari y col., 2023) se calculó un 41 % de  $\alpha$ -hélice en estado sólido. La diferencia con el valor obtenido de 28% de  $\alpha$ -hélice, se puede atribuir a solvatación o interacciones iónicas o enlaces de hidrógeno al pasar del estado sólido a solución.

### **6.2.2 Efecto de la temperatura y parámetros termodinámicos**

Los espectros de CD de ambas muestras, rhLF y hLF de origen humano, se registraron a diferentes valores de temperatura. Según las ecuaciones (1) y (2), el

porcentaje de valores de hélice  $\alpha$  se calculó para cada temperatura (ver Figura 16). Se observa un proceso típico de desnaturalización para las dos proteínas, al presentarse una disminución en el porcentaje de  $\alpha$ -hélice. Este resultado indica que es posible medir parámetros termodinámicos para este proceso.



**Figura 16. Porcentaje de  $\alpha$ -hélice vs. temperatura de la lactoferrina recombinante humana y la lactoferrina humana nativa (0.02 mg/mL) en PBS de 30 a 86 °C.**

La Figura 17 muestra un gráfico 3D, donde se trazan MRE, temperatura y longitud de onda. Considerando una gráfica con una longitud de onda fija, la fracción de proteína  $F(u)$  desplegada se puede estimar utilizando la ecuación 3,

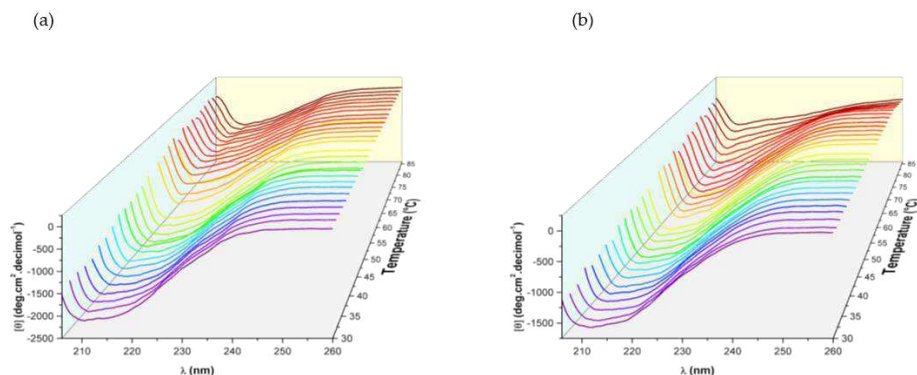
$$f(u) = \frac{Y_0 - (Y_N + m_N T)}{(Y_U + m_U T) - (Y_N + m_N T)} \dots \text{Ec.3}$$

En esta ecuación,  $Y_0$  corresponde al valor de elipticidad, y  $Y_N$  y  $m_N$  son la línea base y la pendiente de la proteína antes de la temperatura de desnaturalización  $T_m$ , obtenida a partir de los valores de elipticidad. De la misma manera  $Y_U$  y  $m_U$  son la línea base y la pendiente de la proteína después de la temperatura de desnaturalización  $T_m$ , respectivamente,  $T$  es la temperatura en grados Kelvin y  $R =$

8.314 KJ mol<sup>-1</sup>. Con este valor se puede calcular una constante de equilibrio para cada temperatura, ver ecuación 4.

$$K_T = \frac{F(u)}{1-F(u)} \dots \text{Ec.4}$$

Mediante el ajuste lineal de  $\ln(K) = f(1/T)$ , se obtuvieron los siguientes parámetros termodinámicos:  $T_m$  (temperatura de transición),  $\Delta H$  y  $\Delta S$ . Para la rhL, los valores obtenidos son  $\Delta H = 318.8$  kJ/mol,  $\Delta S = 0.94$  kJ/molK y  $T_m = 318$  K con  $\chi = 0.0017$ , correspondiente a un sistema no espontáneo. En el caso de la hLF de origen humano, los valores obtenidos son  $\Delta H = 103.3$  kJ/mol,  $\Delta S = 0.308$  kJ/molK y  $T_m = 334$  K, con  $\chi = 0.0035$ . La diferencia en los valores termodinámicos indica un sistema más desorganizado ( $\uparrow \Delta S$ ) en la rhLF asociado con un bajo porcentaje de  $\alpha$ -hélice, y la ruptura en diferentes enlaces dentro de la estructura ( $\uparrow \Delta H$ ) indica una disposición molecular no similar en ambas proteínas. Por lo tanto, los parámetros termodinámicos o la temperatura de desnaturalización simple ( $T_m$ ) pueden ser un criterio antes de usar proteínas humanas recombinantes para la preparación de alimentos especializados.



**Figura 17. Gráficos tridimensionales para la desnaturalización térmica de lactoferrina humana recombinante 0,02 mg/ml (a) y lactoferrina humana nativa (b) (0,03 mg/ml) en PBS de 30 a 86 °C, pH 7.**



Los cambios en la respuesta de DC y en la estructura de la rhLF y la hLF de origen humano pueden asociarse con los de la producción de la proteína recombinante en lotes. En el medio de cultivo selectivo YPD, la forma apo podría haberse visto favorecida y podría explicar las diferencias en los parámetros termodinámicos con la proteína nativa. Esto concuerda con los estudios reportados por Sreedhara et al., donde los datos de desnaturalización térmica ( $T_m$ ) de las formas apo y holo de LF indicaron que las holo formas de LF de especies bovinas y caprinas son diferentes, siendo más estables que las respectivas apo formas en el rango de pH de 2.0 a 7.0. Además, la conformación de apo y holo formas de LF de especies caprinas y bovinas mostró una mayor estructura desplegada con valores de pH reducidos. A pH 2.0, se observó un mayor contenido de estructuras aperiódicas con una pérdida general de  $\alpha$ -hélices en el caso de las formas apo y holo de bLF. Apo forma de cLF y holo forma de cLF mostraron entre un 7 y un 8% de  $\alpha$ -hélice a pH bajo (Sreedhara y col., 2010).

En la apo-Lf, el lóbulo N tiene una conformación abierta (un ángulo de  $53^\circ$  entre los subdominios N1 y N2), mientras que el lóbulo C tiene una conformación cerrada (los subdominios C1 y C2 se acercan). Esta conformación lo hace más resistente a la desnaturalización por calor y a la proteólisis. La conformación cerrada de la holo-Lf se pierde cuando la estructura se desestabiliza, y esto puede ocurrir, por ejemplo, cuando Lf se une a un receptor bacteriano u otro (lo mismo ocurre con Tf), cuando está a un pH muy ácido (menor superior a 4,0) o cuando hay protonación del ion carbonato (la estructura cerrada se desestabiliza y se libera el  $Fe^{2+}$ ). La diferencia entre las formas apo-Lf y holo-Lf en la estructura conformacional se debe simplemente a movimientos en los dominios de la proteína, y la forma de apo-Lf ofrece interacción con un mayor número de moléculas (Baker y Baker, 2009; Baker, 2004).

## VII. CONCLUSIÓN

Los espectros obtenidos mediante dicroísmo circular muestran que, a pH alcalino, la estructura secundaria de la hLF de origen humano, así como la rhLF, cambia a una estructura desplegada, y a pH ácido, ambas proteínas precipitan.

Mediante la respuesta del dicroísmo circular a diferentes niveles de pH y mediante la determinación de parámetros termodinámicos, fue posible proponer que, en la producción de rhLF, la forma apo podría haberse visto favorecida en comparación con la hLF de origen humano.

Las diferencias en los parámetros termodinámicos encontradas entre estas dos proteínas a pesar de provenir del mismo gen pueden atribuirse a su diferente origen: una es la LF nativa humana mientras que la otra es una LF recombinante obtenida de la levadura *P. pastoris*, un sistema eucariótico ampliamente utilizado para la producción de proteínas recombinantes, considerado al inicio de este trabajo como un buen candidato para la producción de LF. Se ha publicado que las levaduras pueden tener algunas peculiaridades en la interpretación de algunas señales genéticas durante el procesamiento de proteínas recombinantes, como se confirma en este trabajo.

Para determinar si la LF recombinante y la LF de origen humano tienen una función comparable para su uso en productos alimenticios, se deben realizar algunos estudios de seguridad. Sin embargo, el DC puede utilizarse como primera herramienta de inspección en la producción de proteínas recombinantes.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akbarzadeh, A., Dehnavi, E., Aghaeepoor, M., & Amani, J. 2015. Optimization of Recombinant Expression of Synthetic Bacterial Phytase in *Pichia pastoris* Using Response Surface Methodology. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 8(12). doi:10.5812/jjm.27553
- Altomonte, I., Salari, F., Licitra, R. and Martini, M. 2019. Donkey and human milk: insights into their compositional similarities. *International Dairy Journal*. 89:111-118.
- Armanmehr, S., Kalhor, H. R., & Tabarraei, A. 2016. Production of a soluble and functional recombinant apolipoprotein D in the *Pichia pastoris* expression system. *Protein Expression and Purification*. 121, 157–162. doi:10.1016/j.pep.2016.01.016
- Ausubel, F. M. 2002. Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
- Azoun, S.B., & Kallel, H. 2017. Investigating the effect of carbon source on rabies virus glycoprotein production in *Pichia pastoris* by a transcriptomic approach. *Microbiology Open*. 6(4), e00489. doi:10.1002/mbo3.489
- Baker, E.N. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *Biometals*. 2004, 17, 209-216.
- Baker, E.N.; Baker, H.M. A. 2009. Structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie*. 91, 3-10.
- Ballard, O. and Morrow, A. L. 2013. Human Milk Composition. *Pediatric Clinics of North America*. 60(1), 49–74. doi:10.1016/j.pcl.2012.10.002
- Berlutti, F.; Pantanella, F.; Natalizi, T.; Frioni, A.; Paesano, R.; Polimeni, A.; Valenti, P. 2011. Antiviral properties of Lactoferrin – A natural immunity molecule. *Molecules*. 6, 6992-7018.
- Bernauer, L.; Radkohl, A.; Lehmayr, L.G.K. 2021. *Komagataella phaffii* as Emerging Model Organism in Fundamental Research. *Front. Microbiol*. 11, 607028.
- Bhataya, A., Schmidt-Dannert, C., & Lee, P. C. 2009. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* X-33 for lycopene production. *Process Biochemistry*. 44(10), 1095–1102. doi:10.1016/j.procbio.2009.05.012
- Bio-Rad Laboratories Inc. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. Available online: [https://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6040.pdf](https://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf) (accessed on 12 January 2021).
- Bobreneva, I.V, Rokhlova, M.V. 2021. Lactoferrin: properties and application. A review. *Theory and practice of meat processing*. 6, 128–134.
- Bokkhim, H.; Bansal, N.; Grøndahl, L.; Bhandari, B. 2013. Physico-chemical properties of different forms of bovine lactoferrin. *Food Chemistry*. 141, 3007–3013.

- Bucknall, M., Fung, K. Y. C., and Duncan, M. W. 2002. Practical quantitative biomedical applications of MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, 1015–1027.
- Cao, X., Yang, M., Yang, N., Liang, X., Tao, D., Liu, B., Wu, J. and Yue, X. 2019. Characterization and comparison of whey N-glycoproteomes from human and bovine colostrum and mature milks. *Food Chemistry.* 276:266-273.
- Carneiro, C.V.G.C.; Serra, L.A.; Pacheco, T.F.; Ferreira, L.M.M.; Brandão, L.T.D.; Freitas, M.N.d.M.; Trichez, D.; Almeida, J.R.M.d. 2022. Advances in *Komagataella phaffii* Engineering for the Production of Renewable Chemicals and Proteins. *Fermentation.* 8, 575.
- Cereghino JL, Cregg JM. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24: 45–66.
- Cereghino, G.L.; Cereghino, J.L.; Ilgen, I.; Cregg, J.M. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology.* 13, 329–332.
- Chang, A. Y., V. W. Chau, J. A. Landas, Y. Pang. 2017. Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI Methods.* 1:22-25.
- Chen GH, Yin LJ, Chiang IH, Jiang ST. 2007. Expression and purification of goat lactoferrin from *Pichia pastoris* expression system. *J. Food Sci.* 72:67–71.
- Chen, Y.H., Yang, T. And Chau, K.H. 1974. Determination of the helix and  $\beta$  form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry.* 16(13):3350-3359
- Choi, B. K., J. K. Actor, S. Rios, M. D'Anjou, T. A. Stadheim, S. Warburton, E. Giaccone, M. Cukan, H. Li, A. Kull, N. Sharkey, P. Gollnick, M. Kocięba, J. Artym, M. Zimecki, M. L. Kruzel, and S. Wildt. 2008. Recombinant human lactoferrin expressed in glycoengineered *Pichia pastoris*: Effect of terminal N-acetylneuraminic acid on in vitro secondary humoral immune response. *Glycoconj. J.* 25:581–593.
- Clark, D. P., and N. J. Pazdernik. 2016. *Biotechnology.* Academic Cell. London.
- Conesa, C.; Calvo, M.; Sánchez, L. 2010. Recombinant human lactoferrin: A valuable protein for pharmaceutical products and functional foods. *Biotechnology Advances.* 28, 831–838.
- Conesa, C.; Sánchez, L.; Rota, C.; Pérez, M. D.; Calvo, M.; Farnaud, S.; Evans, R. W. 2008. Isolation of lactoferrin from milk of different species: Calorimetric and antimicrobial studies. *Comparative Biochemistry and Physiology B.* 150, 131–139.
- Cooper, C. A., Maga, E. A., & Murray, J. D. 2015. Production of human lactoferrin and lysozyme in the milk of transgenic dairy animals: past, present, and future. *Transgenic Research.* 24(4), 605–614. doi:10.1007/s11248-015-9885-5
- Cui, S.; Lv, X.; Sun, G.; Wu, W.; Xu, H.; Li, Y.; Liu, Y.; Li, J.; Du, G.; Wang, M. 2022. Recent advances and prospects in purification and heterologous expression of lactoferrin. *Food Bioeng.* 1, 58-67
- Drago-Serrano, M. E., Flores-Romo. L., Oliver-Aguillón, G., Jarillo-Luna, R. A.,

- Reina-Garfias, H., Barbosa-Cabrera, E., Campos-Rodríguez, R. 2008. La lactoferrina como modulador de la respuesta inmunitaria. *Bioquímica*. 2:71-82
- El-Hatmi, H., Jrad, Z., Salhi, I., Aguib, A., Nadri, A. and Khorchani, T. 2015. Comparison of composition and whey protein fractions of human, camel, donkey, goat and cow milk. *Mljekarstvo*, 65(3):159–167.
- Fan, F.; Tu, M.; Liu, M. 2017. Isolation and characterization of lactoferrin peptides with stimulatory effect on osteoblast proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65, 7179–7185.
- FitzGerald RJ and Meisel H. 2000. Milk protein derived inhibitors of <sup>[[L]]</sup>angiotensin-I-converting enzyme. *Br J Nutr*. 84:S33-7.
- García-Ugalde, C.; Villegas-Gutiérrez, L.M.; Duarte-Vázquez, M.A. 2017. Formulación de fórmulas infantiles. In *Fórmulas Infantiles, Nutrición y Tecnología*, 1st ed.; Rosado, J.L., Eds.; MGS Ediciones: Querétaro, México, 181-199.
- Goldman, I.L.; Georgieva, S.G.; Gurskiy, Y.G.; Krasnov, A.N.; Deykin, A.V.; Popov, A.N.; Ermolkevich, T.G.; Budzevich, A.I.; Chernousov, A.D.; Sadchikova, E.R. 2012. Production of human lactoferrin in animal milk. *Biochem. Cell. Biol*. 90, 513-519.
- González-Castell, L.D.; Unar-Munguía, M.; Bonvecchio-Arenas, A.; Ramírez-Silva, I.; Lozada-Tequeanes, A.L. 2023. Prácticas de lactancia materna y alimentación complementaria en menores de dos años de edad en México. *Salud Pública*. 65(supl I):S204-S210. <https://doi.org/10.21149/14805>
- Gruden, Š.; Poklar Ulrih, N. 2021. Diverse Mechanisms of Antimicrobial Activities of Lactoferrins, Lactoferricins, and Other Lactoferrin-Derived Peptides. *Int. J. Mol. Sci*. 22, 11264.
- Harouna, S.; Franco, I.; Carramiñana, J.J.; Blázquez, A.; Abad, I.; Pérez, M.D.; Calvo, M.; Sánchez, L. 2020. Effect of hydrolysis and microwave treatment on the antibacterial activity of native bovine milk lactoferrin against *Cronobacter sakazakii*. *International Journal of Food Microbiology*. 319,108495
- He, Z.; Du, X.; Yao, W.; Dai, J. 2008. Pharmaceutical proteins produced in plant bioreactor in recent years. *African Journal of Biotechnology*. 725, 4917–4925.
- Hou, J.M.; Chen, E.Y.; Lin, F.; Lin, Q.M.; Xue, Y.; Lan, X.H.; Wu, M. 2015. Lactoferrin Induces Osteoblast Growth through IGF-1R. *International Journal of Endocrinology*. 282806  
<https://www.biospace.com/article/releases/invitria-release-recombinant-human-transferrin-highlighted-for-its-therapeutic-and-cell-culture-potential/>
- Hunkapiller, M., Strickler, J., & Wilson, K. 1984. Contemporary methodology for protein structure determination. *Science*. 226(4672), 304–311. doi:10.1126/science.6385254
- Hyvönen, P., Suojala, L., Haaranen, J., von Wright, A., & Pyörälä, S. 2006. Human and bovine lactoferrins in the milk of recombinant human lactoferrin-transgenic dairy cows during lactation. *Biotechnology Journal*. 1(4), 410–412. doi:10.1002/biot.200600016

- Im, H. 2011. The inoue method for preparation and transformation of competent e. coli: "ultra competent" cells. Bio-protocol Bio.101:e143.
- Invitrogen life technologies. 2002. *Pichia* Fermentation Process Guidelines. Version B. Available online: [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pichiaferm\\_prot.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pichiaferm_prot.pdf) (accessed on 15 October 2020).
- Islam, R. S., D. Tisi, M. S. Levy, and G. J. Lye. 2007. Framework for the rapid optimization of soluble protein expression in *Escherichia coli* combining microscale experiments and statistical experimental design. Biotechnol. Progress. 23(4): 785-793.
- Jiang, T.; Chen, L.; Jia, S.; Chen, L.; Ma, Y. 2008. High-level expression and production of human lactoferrin in *Pichia pastoris*. Dairy Science and Technology. 88, 173–181.
- Jurinke, C., Oeth, P. and van den Boom, D. 2004. MALDI-TOF mass spectrometry. A versatile tool for high-performance DNA analysis. Molecular Biotechnology. 2(26):147-163.
- Karav, S., German, J.B, Rouquié, C., Le Parc, A. and Barile, D. 2017. Review. Studying Lactoferrin N-Glycosylation. International Journal of Molecular Sciences.
- Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. 2020. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. Journal of Cellular Physiology. doi:10.1002/jcp.29583
- Kell, D.B.; Heyden, E.L.; Pretorius, E. 2020. The Biology of Lactoferrin, an Iron-Binding Protein That Can Help Defend Against Viruses and Bacteria. Front. Immunol. 11, 1221
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. 2005. How to study proteins by circular dichroism. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 1751(2), 119–139. doi:10.1016/j.bbapap.2005.06.005
- Kelly, S.M. and Price, N.C. 2000. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. Current Protein and Peptide Science. 4(1):349-384
- Khan, S., M. W. Ullah, R. Siddique, G. Nabi, S. Manan, M. Yousaf, and H. Hou. 2016. Role of recombinant DNA technology to improve life. Int. J. Genomics. Article ID 2405954:1-14.
- Korhonen H. and Pihlanto 2003. A. Food-derived bioactive peptides- opportunities for designing future foods. Curr Pharm Design. 9:1297-308.
- Krimpenfort, P. 1993. The production of human lactoferrin in the milk of transgenic animals. Cancer Detect Prev. 17: 301-305.
- Liao, Y., Alvarado, R., Phinney, B. and Lönnerdal, B. 2011. Proteomic Characterization of Human Milk Whey Proteins during a Twelve-Month Lactation Period. Proteome Research. 10(4):1746-1754.
- Liao, Y.; Jiang, R.; Lönnerdal, B. 2012. Biochemical and molecular impacts of lactoferrin on small intestinal growth and development during early life. Biochem. Cell Biol. 90, 476-484

- Lönnerdal, B. 2014. Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 99(3), 712S–717S. doi:10.3945/ajcn.113.071993
- Lu, J., Zhang, S., Liu, L., Pang, X., Ma, C., Jiang, S., & Lv, J. 2018. Comparative proteomics analysis of human and ruminant milk serum reveals variation in protection and nutrition. *Food Chemistry*. 261: 274–282.
- Luo, F.; Liu, C. G.; Cheng, L. 2010. Study on the optimization of technique of crude extracting lactoferrin from bovine colostrum. *Journal of Dairy Science and Technology*. 33, 11–14.
- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. 22:249-270.
- Mao, X., Gu, J., Sun, Y., Xu, S., Zhang, X., Yang, H., and Ren, F. 2009. Anti-proliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk on A549 human lung cancer cells. *International Dairy Journal*. 19(11):703–708.
- Meisel H. 1998. Overview on milk protein-derived peptides. *Int Dairy J*. 8:363-73.
- Moradian, F.; Sharbafi, R.; Rafiei, A. 2010. Lactoferrin, isolation, purification and antimicrobial effects. *Journal of Medical and Bioengineering*. 3, 203–206.
- Mordor Intelligence. 2024. En: <https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/recombinant-protein-market>
- Nakata, Y., X. Tang, and K. Yokoyama. 2008. Preparation of competent cells for high-efficiency plasmid transformation of *Escherichia coli*. In: Cowell I.G., Austin C.A. (eds) *cDNA Library Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 69. p. 324. Humana Press. New Jersey.
- Notari, S.; Gambardella, G.; Vincenzoni, F.; Desiderio, C.; Castagnola, M.; Bocedi, A.; Ricci, G. 2023. The unusual properties of lactoferrin during its nascent phase. *Nature portfolio. Scientific Reports*. 13, 14113.
- Oliveira, C., and L. Domingues. 2018. Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins. *App. Microbiol. Biotechnol*. 102: 81-92.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. 2024. En: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- ONU. Organización de las Naciones Unidas. Departamento de Asuntos Económicos y Sociales. 2023. En: <https://www.un.org/es/desa-es/la-poblaci%C3%B3n-mundial-llegar%C3%A1-8000-millones-en-2022#:~:text=Las%20%C3%BAltimas%20proyecciones%20de%20las,y%209700%20millones%20en%202050>.
- Paramasivam, M.; Saravanan, K.; Uma, K.; Sharma, S.; Singh, T.P.; Srinivasan, A. 2002. Expression, purification, and characterization of equine lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. 26, 28–34
- Pecorini, C., F. Savazzini, P. A. Martino, E. Fusi, C. Fogher, and A. Baldi. 2005. Heterologous expression of biologically active porcine lactoferrin in *Pichia pastoris* yeast. *Vet. Res. Commun*. 29:379–382.
- Pereira, P. C. 2014. Milk Nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*. 30 (6):619-627

- Pihlanto-Leppälä A. 2000. Trends Food Sci Technol.11:347-56.
- Porro, D., and D. Mattanovich. 2004. Recombinant Protein Production in Yeasts. In: Balbás P., A. Lorence (eds). Recombinant Gene Expression. Methods in Molecular Biology. vol 267. Humana Press. New Jersey.
- Quitadamo, P.A., Comegna, L., Cristalli, P. 2021. Anti-infective, Anti-inflammatory and Immunomodulatory Properties of Breast Milk Factors for the Protection of Infants in the Pandemic From COVID-19. Front Public Health. Mar 2;8:589736. doi: 10.3389/fpubh.2020.589736. PMID: 33738273; PMCID: PMC7960784.
- Robert PR, Zaloga GP. 1994. Dietary bioactive peptides. New Horizons. 2:237-43.
- Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY.
- Shahidi A, and Zhong B. 2008. Bioactive peptides. Jour Aoac Int. 91:914-31.
- Shariatikia, M., Behbahani, M. and Mohabatkar, H. 2017. Anticancer activity of cow, sheep, goat, mare, donkey and camel milks and their caseins and whey proteins and in silico comparison of the caseins. Molecular Biology Research Communications. 6(2):57-64
- Sreedhara, A.; Ragnar, F.; Prakash, V.; Krowarsch, D.; Langsrud, T.; Kaul, P.; Devold, T.G.; Vegarud, G.E. 2010. A comparison of effects of pH on the thermal stability and conformation of caprine and bovine lactoferrin. International Dairy Journal. 20, 487-494.
- Sreerama, N. and Woody, R. 2000. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. Analytical Biochemistry. 287:252-260.
- Thomassen, E.A.J.; van Veen, H.A.; van Berkel, P.H.C.; Nuijens, J.H.; Abrahams, J.P. 2005. The protein structure of recombinant human lactoferrin produced in the milk of transgenic cows closely matches the structure of human milk-derived lactoferrin. Transgenic Research.14,397–405
- Torres-Llenez, María de Jesús, Vallejo-Cordoba, Belinda, & González-Córdova, Aarón Fernando. 2005. Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 55(2), 111-117.
- Wang, B.; Timilsena, Y.P.; Blanch, E.; Adhikari, B. 2019.Lactoferrin. Structure, function, denaturation and digestion. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 59, 580–596.
- Wang, J., Lei, B., Yan, J., Li, J., Zhou, X., Ren, F., & Guo, H. 2019. Donkey milk oligosaccharides influence the growth-related characteristics of intestinal cells and induce G2/M growth arrest via the p38 pathway in HT-29 cells. Food & Function. doi:10.1039/c8fo02584c
- Wang, M., Jiang, S., & Wang, Y. 2016. Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*. Bioengineered. 7(3), 155–165. doi:10.1080/21655979.2016.119170
- Wang, S., H. Lin, T. Zhao, S. Huang, D. G. Fernig, N. Xu, F. Wu, M. Zhou, C. Jiang C, and H. Tian. 2017. Expression and purification of an FGF9 fusion protein



- in *E. coli*, and the effects of the FGF9 subfamily on human hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101(21):7823-7835.
- Wang, Y., Zhou, X., Gong, P., Chen, Y., Feng, Z., Liu, P., Zhang, P., Wang, X, Zhang, L., Song, L. 2020. Comparative major oligosaccharides and lactose between Chinese human and animal milk. *International Dairy Journal*, 104727. doi:10.1016/j.idairyj.2020.104727
- Ward, P. P., Uribe-Luna, S., Conneely, O. M. 2002. Lactoferrin and host defense. *Biochem Cell Biol.* 80: 95-102.
- Wong, D. W. Proteins. In D. W. S. Wong (Ed.) 2018. Mechanism and theory in food chemistry. Springer International Publishing. 2nd Edition, 55–122.
- Yang JT, Wu CS, Martinez HM. 1986. Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol.* 130:208-269
- Yang, Y., Zheng, N., Zhao, X., Zhang, Y., Han, R., Zhao, S., Yang, J., Li, S., Guo, T., Zang, C. Wang, J. 2017. N-glycosylation proteomic characterization and cross-species comparison of milk whey proteins from dairy animals. *Proteomics.* 17(9), 1600434. doi:10.1002/pmic.201600434
- Yemets, A. I., Tanasienko, I. V., Krasnylenko, Y. A., & Blume, Y. B. 2014. Plant-based biopharming of recombinant human lactoferrin. *Cell Biology International.* n/a–n/a. doi:10.1002/cbin.10304
- Zacharius, R. M., Zell, T. E., Morrison, J. H., Woodlock, J. J. 1969. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal Biochem.* 30: 148-152.
- Zaluzec, E. J.; Gage, D. A.; Watson, J. T. 1995. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry: Applications in Peptide and Protein Characterization. *Protein Expr. Purif.* 6, 109–123.
- Zeng, Q.; Liu, Y.; Sun, J.; Jin, Y. 2023. Providing New Insights on the Molecular Properties and Thermal Stability of Ovotransferrin and Lactoferrin. *Foods.* 12, 532.
- Zhang, L., van Dijk, A. D. J. and Hettinga, K. 2017. An interatomics overview of the human and bovine milk proteome over lactation. *Proteome Science.* 15:1.
- Zhongyun, J., Ruifeng, D., Qijing, D., Hongning, J., Rongbo, F., Dengpan, B., Jun, W., Zhongna, Y., Rongwei, H. and Yongxin, Y. 2024. Insight into differences in whey proteome from human and eight dairy animal species for formula humanization. *Food Chemistry.* 430:137076
- Zhu, J. and Dingess, K. A. 2019. The Functional power of the human milk proteome. *Nutrients.* 11(8):1834
- Zou, S., Huang, S., Kaleem, I., & Li, C. 2013. N-glycosylation enhances functional and structural stability of recombinant  $\beta$ -glucuronidase expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology,* 164(1), 75–81. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.12.015
- Zou. S, S. Guo, I. Kaleem, and C. Li. 2013. Purification, characterization and comparison of *Penicillium purpurogenum*  $\beta$ -glucuronidases expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88(7):1913-1919.