



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana

Producción de las proteínas recombinantes α -lactoalbúmina y lactoferrina humanas y su
escalamiento a nivel piloto

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta:

I.Q. en A. Violeta López Calderón

Dirigido por:

Dr. Jorge Luis Rosado Loria

SINODALES

Dr. Jorge Luis Rosado Loria
Presidente

M. en C. Carlos Raúl García Ugalde
Secretario

M. en C. Beatriz Álvarez Mayorga
Vocal

Dr. Sergio de Jesús Romero Gomez
Suplente

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez
Suplente

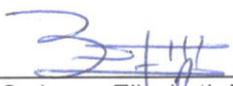

Firma

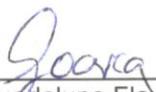

Firma


Firma


Firma


Firma


D.C.S. Juana Elizabeth Elton Puente
Directora de la Facultad


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro., México
Diciembre, 2018
México

RESUMEN

Las proteínas α -lactoalbúmina y lactoferrina humanas son dos glicoproteínas nativas de la leche materna que han demostrado múltiples beneficios nutricionales y como biofarmacéuticos. El objetivo del presente trabajo fue producir las proteínas recombinantes α -lactoalbúmina y lactoferrina humanas a nivel laboratorio (100 mL) y a nivel piloto (2 L). El sistema de expresión se conformó por la levadura *Pichia pastoris* como hospedero eucariota y el vector de expresión pGAPZ α A, y, como hospedero procariota la bacteria *E. coli* TOP10. La transformación de *E. coli* Top 10 se llevó a cabo por el método del CaCl₂/choque térmico, obteniéndose más de 25 transformantes/placa en medio selectivo con Zeocina™. La transformación de *P. pastoris* se llevó a cabo por electroporación, obteniéndose eficiencias de transformación entre 1.02 y 1.5 x 10⁶ UFC/ μ g de DNA para ambas proteínas recombinantes. El análisis por SDS-PAGE demostró la producción de las proteínas recombinantes a nivel laboratorio. La producción de ambas proteínas se logró producir en biorreactor en volúmenes de 1-2 L de medio de cultivo, las condiciones de producción fueron 200 rpm, T=30 °C, 20 % de saturación mínima de oxígeno y 10 % v/v de inóculo. Los rendimientos máximos de proteínas recombinantes obtenidas a nivel piloto fueron 17.53 mg/L para la lactoferrina y 16.9 mg/L para la lactoalbúmina después de 12 horas de fermentación. Las proteínas recombinantes α -lactoalbúmina y lactoferrina fueron expresadas en el sistema heterólogo de *P. pastoris* a nivel laboratorio y la expresión de las proteínas recombinantes a nivel piloto debe ser optimizada evaluando el efecto de otros factores tales como la fuente de carbono, pH, tipo de cultivo, entre otros.

(Palabras clave: Proteínas recombinantes, biorreactor, escalamiento, *Pichia pastoris*, fermentación).

SUMMARY

Both human α -lactalbumin and lactoferrin proteins are breast milk native glycoproteins that have shown multiple nutritional benefits and also as biopharmaceuticals. The aim of this job was to produce human recombinant α -lactalbumin and lactoferrin proteins at laboratory scale (100 mL) and at pilot scale (2 L). The expression system comprised the *Pichia pastoris* yeast as eukaryotic host and the pGAPZ α A expression vector, and the *E. coli* TOP10 bacterium as prokaryote host. The transformation of *E. coli* TOP10 was carried out by CaCl₂/heat shock method, obtaining more than 25 transformants/plate in selective medium with Zeocin™. The transformation of *P. pastoris* was carried out by electroporation, obtaining transformation efficiencies between 1.02 and 1.5 x 10⁶ UFC/ μ g of DNA for both recombinant proteins. The SDS-PAGE analysis demonstrated the recombinant proteins production at laboratory scale. Both proteins production was achieved using a bioreactor in volumes of 1-2 L of culture media, production conditions were: 200rpm, T=30 °C, 20 % minimal oxygen saturation and 10 % v/v inoculum. The maximum yields of recombinant proteins obtained at the pilot scale were 17.53 mg/L for lactoferrin and 16.9 mg/L for α -lactalbumin after 12 hours of fermentation. The recombinant α -lactalbumin and lactoferrin and proteins were expressed in the heterologous system of *P. pastoris* at the laboratory scale and the expression of the recombinant proteins at pilot scale must be optimized by evaluating the effect of other factors such as the carbon source, pH, and type of culture, among others.

(Key words: Recombinant proteins, bioreactor, *Pichia pastoris*, fermentation).

DEDICATORIAS

En primer lugar, quiero dedicar esta tesis a mi hijo César Alejandro, por ser la motivación que me lleva día con día a querer ser ejemplo de superación personal y profesional.

A Fernando, mi mamá Rocío, y a mis tres hermanos, Rafael, Uriel y Luis, por todo su apoyo incondicional, paciencia y amor en estos más de dos años de maestría.

Al Dr. Aldo Amaro Reyes quien me ha brindado su sincera amistad y siempre estuvo dispuesto a compartir su buen humor, conocimiento, recursos y tiempo conmigo.

A Marlén Torres, Karla Yunuen Silva, Luz del Carmen Becerril, Sergio Orduña, que a pesar del tiempo y la distancia me demuestran lo valioso de la amistad.

A mis compañeros y amigos de la maestría, que con apoyo mutuo logramos culminar nuestros estudios de posgrado.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el soporte institucional y monetario con la beca número 781924 para la realización de los estudios de Maestría presentados en este trabajo. Así como por los recursos económicos obtenidos por medio del PEI para la realización de los experimentos desarrollados en esta tesis.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales por permitirme cursar mis estudios de posgrado en una institución de alta calidad y que proporciona una excelente formación humana y profesional.

Al Dr. Jorge Luis Rosado Loria, por la oportunidad de unirme a su grupo de trabajo, por la confianza en la realización del presente proyecto de investigación.

A cada uno de los miembros del comité sinodal, cuya asesoría, confianza, conocimientos, experiencia y excelente disposición permitieron el desarrollo del trabajo experimental detallado en este trabajo.

A cada uno de los maestros docentes de la Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana, que colaboraron al desarrollo profesional, y, a su forma, apoyaron a la elaboración del presente trabajo, con consejos, recomendaciones y críticas pertinentes.

A cada uno de mis compañeros de laboratorio en la Facultad de Química de la UAQ que siempre estuvieron dispuestos a colaborar, a opinar, resolver dudas, y fomentar un buen ambiente de trabajo.

ÍNDICE

Contenido

RESUMEN	i
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1. Nutrición del infante.....	4
2.2. Sustitutos de alimentación infantil	5
2.3.1. α -lactoalbúmina.....	8
2.3.2. Lactoferrina	10
2.4 Tecnología del ADN recombinante.....	14
2.5 Sistemas de expresión disponibles para la producción de r α -LA y rhLF	16
2.6 <i>Pichia pastoris</i> como hospedero en el sistema de expresión	17
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
IV. JUSTIFICACIÓN	21
V. OBJETIVOS	22
6.1. Objetivo general	22
6.2. Objetivos específicos.....	22
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1. Materiales.....	23
7.1.1. Materiales biológicos	23
7.1.2. Materiales.....	23
7.2. Métodos.....	24
7.2.1. Construcción del vector de expresión.....	24
7.2.2. Propagación y conservación de los plásmidos	25
7.2.3. Transformación de <i>P. pastoris</i>	26
7.2.4. Genotipificación	28

7.2.5. Producción de las proteínas recombinantes a nivel laboratorio	29
7.2.6. Preparación de los pre-inóculos para el escalamiento en biorreactor ...	29
7.2.7. Producción de las proteínas recombinantes a nivel piloto.....	30
7.2.8. Determinación de proteína total soluble (PT) en el medio de cultivo.....	31
7.2.9 Purificación de las proteínas recombinantes	32
7.2.10. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE)	33
7.2.11. Determinación de la biomasa a nivel piloto	34
7.2.12. Manejo de desechos	34
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
8.1. Propagación y conservación de los plásmidos recombinantes pGZaLM.....	36
8.2. Cuantificación de los plásmidos purificados	39
8.3. Genotipificación de los plásmidos purificados	41
8.4 Transformación de <i>P. pastoris</i>	43
8.4.1. Pruebas de viabilidad y concentración del antibiótico	43
8.4.2. Digestión de los plásmidos.....	45
8.4.3. Electroporación	46
8.4.4. Genotipificación.....	49
8.5. Producción de las proteínas recombinantes a nivel laboratorio	52
8.6. Producción de las proteínas recombinantes a nivel piloto.....	55
8.6. Cuantificación de PT en medio de cultivo.....	60
8.7. Purificación de las proteínas recombinantes a nivel piloto	61
8.8. Análisis y cuantificación de las proteínas recombinantes a nivel piloto	62
8.9. Determinación de la biomasa a nivel piloto	65
VIII. CONCLUSIONES.....	67
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las fórmulas infantiles y algunas características.....	7
Tabla 2. Aplicaciones de la tecnología del ADN recombinante.	15
Tabla 3. Conteo de las muestras transformantes de <i>E. coli</i> TOP10 y sus controles en placa de medio selectivo con Zeocina™.....	36
Tabla 4. Ensayos de viabilidad y concentración del antibiótico Zeocina™ para la cepa nativa de <i>P. pastoris</i>	44
Tabla 5. Conteo en placa de las cepas presuntivas transformantes con hLALBA en medio selectivo con Zeocina™ en los cuatro volúmenes de inóculo probados.	47
Tabla 6. Conteo en placa de las cepas presuntivas transformantes con hLTF en medio selectivo con Zeocina™ en los cuatro volúmenes de inóculo probados.	48
Tabla 7. Cuantificación de ADN genómico de colonias transformadas con el gen hLTF.	52
Tabla 8. Cuantificación de ADN genómico de colonias transformadas con el gen hLALBA.	52
Tabla 9. Condiciones iniciales y finales de los parámetros pH y oxígeno disuelto (pO ₂) en el reactor a las cuales se llevó a cabo la fermentación para cada cepa.	55
Tabla 10. Cuantificación de PT en el sobrenadante del medio de cultivo de las cepas transgénicas de <i>P. pastoris</i> a nivel matraz y piloto.....	61
Tabla 11. Volúmenes de trabajo para la concentración del medio de cultivo obtenido de la fermentación en biorreactor para cada cepa.....	61
Tabla 12. Lecturas de la absorbancia a 280 nm y cuantificación de la fracción concentrada obtenida de la purificación por cromatografía de afinidad para cada cepa.	62
Tabla 13. Determinación de la biomasa por el método de peso seco en los cultivos de cada cepa fermentados en biorreactor.	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura cristalizada α -LA. RCSB - Protein Workshop Viewer for PDB ID: 1A4V. DOI: 10.2210/pdb1A4V/pdb.	9
Figura 2. Estructura cristalizada de LF humana. RCSB - Protein Workshop Viewer for PDB ID: 1FCK. DOI: 10.2210/pdb1FCK/pdb.	11
Figura 3. Reacción del ion Cu^{+2} con los enlaces peptídicos de las proteínas.	32
Figura 4. Crecimiento de las transformantes de <i>E. coli</i> TOP10 y sus controles en placas de medio selectivo con Zeocina™ después de 24 horas de incubación.	37
Figura 5. Curvas de cuantificación de los plásmidos recombinantes pGZaLM LF y pGZaLM α -LA obtenidos del Miniprep (1 y 2) y Maxiprep (3 y 4).	40
Figura 6. Análisis electroforético de los productos de PCR del Miniprep en gel de agarosa al 1 % p/v. Carriles: MPM: marcador de peso molecular, hLALBA: gen hLALBA, hLTF: gen hLTF, C+A: control+ hLALBA, C+L: control+ hLTF, C-: control negativo.	41
Figura 7. 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. MPM: marcador de peso molecular, p α -LA: plásmido purificado pGZaLM α -LA, pLF: plásmido purificado pGZaLM LF, C+A: control+ para pGZaLM α -LA, C+L: control+ para pGZaLM LF, C-: control negativo.	42
Figura 8. Análisis electroforético de los productos de PCR del Maxiprep en gel de agarosa al 1 % p/v. MPM: marcador de peso molecular, hLALBA: gen hLALBA, hLTF: gen hLTF, C+A: control+ hLALBA, C+L: control+ hLTF, C-: control negativo.	42
Figura 9. Pruebas de viabilidad y concentración Zeocina™ en placa y tubos con medio YPD. A: sin Zeocina™, B:150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, C:300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, D:500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, E: 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$, F: 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$	45
Figura 10. Análisis electroforético de los productos de la digestión con la enzima <i>Bsp</i> HI en gel de agarosa al 1 % p/v. MPM: marcador de peso molecular, pLFD:	

plásmido pGZaLM LF digerido, p α -LAD: plásmido pGZaLM α -LA digerido, C-control negativo.....	46
Figura 11. Presuntivas transformantes con hLALBA en placas de medio selectivo con Zeocina™ en los cuatro volúmenes de inóculo probados y después de 72 horas de incubación.	48
Figura 12. 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.	49
Figura 13. Análisis electroforético en geles de agarosa al 1% de los productos de PCR de las secuencias de nucleótidos que codifican para la proteína rh α -LA y rhLF. Carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2-10: muestras de los productos de PCR para hLALBA (A) y hLTF (B).	51
Figura 14. Cultivos en matraz de las cepas transgénicas de <i>P. pastoris</i> que contienen las secuencias optimizadas hLALBA y hLTF.	53
Figura 15. Análisis electroforético del medio de cultivo de las cepas transgénicas de <i>P. pastoris</i> transformadas con el gen hALBA (A) y con el gen hLTF (B) cultivadas en 50 mL de caldo YPD con Zeocina™ a 300 μ g/mL.....	54
Figura 16. Comportamiento de la temperatura, pH y oxígeno disuelto (pO ₂) durante la fermentación de <i>P. pastoris</i> α -LA 1 en biorreactor.	57
Figura 17. Comportamiento de la temperatura, pH y oxígeno disuelto (pO ₂) durante la fermentación de <i>P. pastoris</i> α -LA 2 en biorreactor.	57
Figura 18. Comportamiento de la temperatura, pH y saturación de oxígeno (pO ₂) durante la fermentación de <i>P. pastoris</i> LF 5 en biorreactor.....	58
Figura 19. Comportamiento de la temperatura, pH y oxígeno disuelto (pO ₂) durante la fermentación de <i>P. pastoris</i> LF 8 en biorreactor.....	59
Figura 20. Análisis electroforético de las fracciones concentradas de las cepas transgénicas de <i>P. pastoris</i> transformadas con el gen hALBA (A) y con el gen hLTF (B) a nivel piloto. MPM: marcador de peso molecular, E: estándar de las proteínas humanas, C: concentrado crudo, P: concentrado puro, LM: leche materna humana, PP: concentrado crudo <i>P. pastoris</i>	64

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, existe un consenso de los beneficios que proporciona al infante la alimentación exclusiva al seno materno. La evidencia muestra que la leche materna (LM) contiene un conjunto de nutrimentos y de compuestos bioactivos que tienen un efecto positivo en el desarrollo temprano y en el crecimiento de los infantes (Martin *et al.*, 2015), el cual trasciende hasta la etapa adulta disminuyendo el riesgo de padecer enfermedades crónicas como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares (Savino *et al.*, 2013). Por esta razón, la LM es considerada el estándar de oro de la nutrición infantil (Koletzko *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha reportado que una gran proporción de la población infantil mundial de 0 a 2 años de edad recibe una alimentación con algún tipo de fórmula infantil (FI). Particularmente en México, de acuerdo con los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) del 2012 cerca del 75 % de los niños menores que 5 meses son alimentados con algún tipo de FI. Es por ello que la Organización Mundial de la Salud y la Academia Americana de Pediatría reconocen que las FI son un alimento alternativo adecuado cuando las madres no pueden, tienen contraindicado o deciden no amamantar a sus bebés (AAP, 1997).

Las FI estándares están elaboradas a base de la fracción de las proteínas totales de la leche de vaca y aunque su composición ha sido ajustada mediante la adición de concentrados de suero de leche de vaca (Lien, 2003), se ha demostrado que la fracción de las proteínas totales solubles (PT) de las FI presenta diferencias sustanciales en comparación con la composición de la fracción de las PT de la LM (Lönnerdal, 2006). La LM madura proporciona de 8 a 9 g/L de PT (Lönnerdal, 2003) y su fracción sérica es rica en proteínas como la α -lactoalbúmina (α -LA) y la lactoferrina (LF) (Veloná, 1999). Las cuales no solo proveen aminoácidos esenciales sino que facilitan la absorción de nutrientes, estimulan la diferenciación de tejidos específicos, tienen una marcada actividad antimicrobiana y promueven la maduración del sistema inmune del infante

(Lönnerdal, 2010). Así mismo, se ha descrito que la actividad biológica de las proteínas de la LM depende directamente de la secuencia de sus aminoácidos y de su estructura, las cuales son particulares de la especie humana (Suzuki *et al.*, 2005). En contraste, las FI estándares tienen una mayor concentración de PT, de 14 a 15 g/L (Heine *et al.*, 1991), y su fracción de proteínas séricas presenta una escasa concentración de las proteínas α -LA (b α -LA) y LF (bLF) bovinas (Farrell *et al.*, 2004). Además, las FI estándares contienen proteínas antigénicas como la β -lactoglobulina (β -LG), la cual es la proteína más abundante del suero de leche de vaca (Lien, 2003) y podría representar un factor de riesgo para el infante en el desarrollo de alergias (Heine *et al.*, 1991). Estas diferencias tienen un impacto negativo en la salud del infante ya que se han asociado con el desarrollo de estrés metabólico, de enfermedades crónicas y de inmunoreacciones.

Por otro lado, en varios estudios clínicos, se ha reportado que los infantes alimentados con una FI enriquecida con bLF o con b α -LA tienden a ganar mayor peso manteniendo un nivel nutricional balanceado, aunado a esto tienen una menor incidencia de infecciones respiratorias y presentan un mayor nivel de ferritina plasmática y de hematocrito (nivel de hierro en suero) en comparación con los infantes alimentados con una FI estándar (Koletzko *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2008; Egashira *et al.*, 2007; King *et al.*, 2007; Trabulsi *et al.*, 2011). Sin embargo, los parámetros medidos en estos estudios clínicos siguen siendo inferiores de los que se observan en el grupo control de los infantes alimentados al seno materno. Más aún, la adición de las fracciones puras de b α -LA y bLF para la elaboración de las FI es una práctica muy poco frecuente, debido a su escasa concentración en el suero de la leche de vaca y aunado a que la tecnología involucrada para su extracción y purificación es cara (Kamau *et al.*, 2010).

Debido a las desventajas y a los efectos adversos que actualmente ocurren con el uso de las FI estándares para la alimentación infantil, a la baja actividad biológica que presentan las proteínas de la leche de vaca inherente a su secuencia de aminoácidos y a las limitaciones para obtener fracciones puras de

las proteínas séricas de la leche de vaca, desde hace más de 10 años, varios grupos de investigación alrededor del mundo están trabajando en el desarrollo de diferentes sistemas de expresión que les permita obtener las variantes recombinantes de las proteínas de la LM (Lönnnerdal, 2006). Sin embargo, debido a la complejidad de los sistemas que se utilizan, el uso de estas proteínas recombinantes se ha limitado a las aplicaciones a nivel laboratorio. El contar con un proceso para producir las proteínas recombinantes α -LA (rh α -LA) y LF (rbLF) humanas representa un importante avance tecnológico que permitirá obtener fracciones puras ambas proteínas recombinantes de interés (rHMP) con una actividad biológica muy similar a la de las proteínas nativas. Esto permitirá superar las desventajas de la contaminación con proteínas antigénicas de la leche de vaca y la baja bioactividad de los concentrados del suero de la leche de vaca.

En el presente trabajo se presenta la expresión de las proteínas rh α -LA y rhLF por medio de un sistema basado en la levadura *Pichia pastoris*. Las proteínas recombinantes humanas se produjeron a nivel laboratorio (100 mL) y posteriormente se realizó la evaluación de la producción en biorreactor en volúmenes de 1-2 L.

II. ANTECEDENTES

2.1. Nutrición del infante

El tema de la nutrición infantil es de gran relevancia dentro de la nutrición humana, ya que los infantes requieren consumos elevados de nutrientes y energía para abastecer la rápida tasa de crecimiento (Prell, 2016). La evidencia que demuestra que una adecuada alimentación temprana tiene efectos no solo en el corto plazo, sino también a largo plazo, va en aumento. Los estudios demuestran que la alimentación del infante es un factor determinante en la programación metabólica. Por ende, influye en enfermedades crónico-degenerativas en edades adultas, como son la obesidad, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, etc. (Koletzco, 2006; Turk, 2007; Robinson, 2012; Prell, 2016).

Actualmente la LM es considerada como el estándar de oro en la alimentación infantil, debido a su aporte nutrimental y a las ventajas fisiológicas que ésta proporciona al infante (Shamir, 2016). Desde hace ya varias décadas la LM se ha venido estudiando y relacionando con la salud de los infantes alimentados al seno materno (Newborg & Walker, 2007). Existe evidencia que demuestra que la LM disminuye la ocurrencia de enfermedades infecciosas, obesidad, alergias, asma bronquial, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus 1 y 2 (Shamir, 2016). Así mismo, la LM brinda beneficios al desarrollo cerebral y del tracto gastrointestinal del infante, lo cual es crucial ya que su sistema inmune, gastrointestinal y cerebral se encuentran inmaduros.

Aparte de todos los beneficios mostrados anteriormente, la lactancia materna es una forma más conveniente y barata para la alimentación del infante, sumado al vínculo de cercanía entre madre e hijo, sensación de plenitud y también beneficios a la salud aportados a la madre (Shamir, 2016).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) recomiendan que la lactancia materna se inicie

desde la primera hora de vida y que ésta se mantenga de manera exclusiva durante los primeros seis meses y con la posibilidad de continuarla hasta los dos años o más si así se desea. De la misma forma, la Academia Americana de Pediatría recomienda la alimentación al seno materno por al menos 12 meses (Eidelman, 2012) y éstas mismas recomendaciones se ven reflejadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999, para la atención a la salud del niño.

No obstante, el panorama a nivel mundial es que solo el 35 % de los infantes menores a 6 meses son alimentados con lactancia materna exclusiva (OMS, 2012). Para México la Encuesta Nacional de Salud (ENSANUT) para el año 2012 arroja a que solo un 14.4 % de niños menores a 6 meses son alimentados al seno materno. De acuerdo a estas cifras se ve que el consumo de otros alimentos para infantes, principalmente FI a nivel mundial está muy extendido, superando la cifra de los infantes que son amamantados.

2.2. Sustitutos de alimentación infantil

Las causas por las cuales una madre no amamanta a un infante son varias, ya sea por razones culturales, sociales, por contraindicación médica para la madre o para el infante (galactosemia o fenilcetonuria) en la que se requiera de alguna FI (Corkins & Shurley, 2016). De acuerdo a la Norma oficial mexicana NOM-131-SSA1-2012 se considera a las FI para lactantes como “sucedáneo de la leche materna especialmente fabricado para satisfacer, por sí solo, las necesidades nutrimentales de los lactantes durante los primeros meses de vida hasta la introducción de la ablactación o alimentación complementaria correspondiente”. Tomando en cuenta la Ley Federal para alimentos, drogas y cosméticos de los Estados Unidos (FDCA por sus siglas en inglés) una FI es un alimento para infantes que debe ser usado para uso dietario especial debido a que simula a la leche materna o porque es idóneo como un sustituto parcial o completo de la misma (Corkins & Shurley, 2016).

Las FI a base de leche de bovino o de algunas otras fuentes, son una opción adecuada para la alimentación infantil (Trabulsi, 2011), lo cual está reconocido por la Organización Mundial de la Salud y por la Academia Americana de Pediatría (OMS, 2012; AAP, 2006). Debido a esto las fórmulas infantiles son ampliamente reguladas y se consideran un alimento seguro.

Pero a pesar de los grandes esfuerzos que se han hecho para tratar de mimetizar la composición de la LM en las FI aún hay diferencias sustanciales en la composición de ambas. Estas diferencias son principalmente respecto a su contenido proteico, ya que la LM contiene de 9-11 g/L de proteína total (PT) y las FI contienen de 14-15 g/L de PT (Davis, 2007). La naturaleza de las proteínas también es distinta, ya que la LM tiene mayor porcentaje de proteínas séricas y menor porcentaje de caseínas (relación 60/40 respectivamente). En contraste las FI que contienen menor porcentaje de proteínas séricas y mayor porcentaje de caseínas (relación 20/80 respectivamente) (Lien, 2003). Comparado con la LM las FI tienen una biodisponibilidad más baja, por lo que son adicionadas con concentraciones mayores de nutrimentos (Kleinman & Greer, 2014). Las FI de continuación se recomiendan desde los 4 hasta los 36 meses y las de crecimiento desde los 12 meses de vida (Ferrer & Dalmau, 2005).

Existe una gran variedad de fórmulas infantiles en el mercado y tanto el consumidor como el médico que las utiliza o recomienda continuamente encuentran dificultades a la hora de escoger el producto apropiado. Las fórmulas se pueden clasificar dependiendo la edad del niño que las utiliza, su estado de salud o de enfermedad o dependiendo de la forma en que se presentan los productos, lo cual determina como se utilizan (Rosado & Pedroza, 2017). En la Tabla 1 que se muestra a continuación se describen las fórmulas infantiles dependiendo de cada una de estas variables.

Recientemente se han hecho mejoras a las FI convencionales, a las cuales se les han adicionado ácidos grasos de cadena larga los cuales han sido

Tabla 1. Clasificación de las fórmulas infantiles y algunas características.

Clasificación de la fórmula infantil	Características
Formulas infantiles considerando la edad del niño	<p>Etapa 1: para recién nacido hasta 6 meses de edad.</p> <p>Etapa 2: de 6 a 12 meses de edad.</p> <p>Alimento adicional o complementario: a partir de 1 año de edad.</p> <p>Estándar: para niños sanos.</p>
Formulas infantiles considerando el estado fisiológico y de salud del niño	<p>Especializadas: Niños con bajo peso al nacer, prematuros, con padecimientos del tracto gastrointestinal (reflujo, constipación o cólico), con alergia (a las proteínas de la leche o intolerancia a la lactosa), con incapacidad para digerir proteínas o algún problema metabólico.</p>
Formulas infantiles dependiendo de su utilización	<p>Polvo: es la presentación más económica y común de encontrar, fácil disolución en agua.</p> <p>Líquidos concentrados: existen pocos productos en el mundo, se evita el uso de empaques muy grandes, se requiere la adición de agua para su consumo.</p> <p>Líquidos listos para usarse: la presentación más cara de las fórmulas infantiles, no requiere mezclarse con agua antes de usarse, se comercializan en envases estériles.</p>

Fuente: Rosado & Pedroza, 2017.

relacionados con el desarrollo cerebral y ocular. Los más comunes son el ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (ARA), ya que éstos ácidos grasos se encuentran en la LM (O'Connor, 2009). También se han adicionado minerales como el hierro para prevenir anemia ferropénica, calcio, vitaminas como la D y C (Ferrer & Dalmau, 2005), no obstante, la fracción proteica ha sido la más difícil de mejorar.

2.3. Composición de la leche materna

Algunos de los beneficios de la leche materna que se describen en la literatura, principalmente sobre el sistema inmune, digestivo y respiratorio, son asociados principalmente las proteínas. Las proteínas son los compuestos más

abundantes de los cuales se forma el cuerpo humano después del agua, y destacando, que éstos compuestos bioactivos presentan actividad antipatogénica e inmunomoduladora (Newborg & Walker, 2007). Las proteínas tienen varias funciones en el cuerpo, principalmente como bloques de construcción, actividad enzimática, de transporte, fuente de energía, regulación ácido-base y como mensajeros químicos, entre otros (Nutten, 2016), lo cual es esencial para el crecimiento y desarrollo adecuados de los infantes.

La composición de la leche de cada especie es única (Hernell, 2011), en lo que respecta a la LM, ésta es una matriz compleja, y varía de acuerdo a las necesidades del infante en cada etapa de crecimiento. En general la LM tiene un 87 % de agua, 3.8 % de grasa, 1.0 % de proteína y 7.0 % de lactosa; donde los nutrimentos que proporcionan un mayor aporte calórico son las grasas y la lactosa con un 50 % y 40 % del total de la energía respectivamente (Martin *et al.*, 2016).

Los estudios actuales concuerdan en que la leche materna contiene proteínas de alta calidad y con muy diversas actividades biológicas como IgA, κ -caseína, lactoperoxidasa, haptocorrina, lactadherina, lactoferrina, α -lactoalbúmina, entre otras (Lönnerdal, 2004). La α -lactoalbúmina y lactoferrina son las proteínas en las cuales se centra el presente trabajo de investigación.

2.3.1. α -lactoalbúmina

La α -LA, es una proteína que se encuentra presente de forma natural en la leche de los mamíferos (Heine *et al.*, 1991). Tiene un peso molecular de 14.2 kDa, de cadena simple de 123 aminoácidos y su sitio de unión al sustrato consiste de un grupo de residuos aspártico altamente conservados (Permyacov, 2016). Tiene un 63 % de aminoácidos esenciales y un alto contenido de los aminoácidos ramificados leucina e isoleucina, los cuales están relacionados a la síntesis proteica en el músculo (Layman, 2003). Investigaciones muestran que esta proteína tiene un sitio estrecho de unión a Ca^{+2} y un sitio de unión más débil a Zn^{+2} , de esta forma la α -lactoalbúmina es la mayor proteína de unión a calcio presente en la leche (Fitzgerald, 1989). En la Fig. 1 se observa la estructura cristalizada de la α -LA con sus dos sitios de unión.

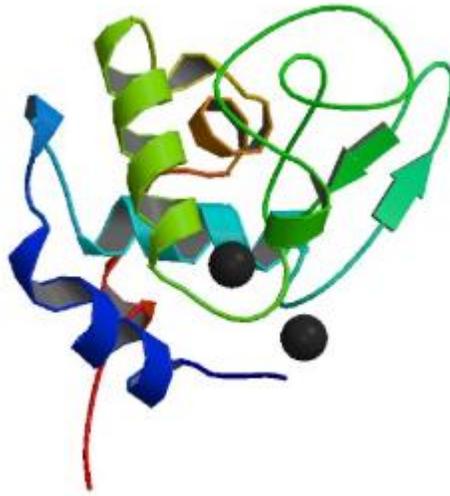


Figura 1. Estructura cristalizada α -LA. RCSB - Protein Workshop Viewer for PDB ID: 1A4V. DOI: 10.2210/pdb1A4V/pdb.

Funcionalmente forma parte del complejo enzimático lactosa-sintasa y participa en el proceso de producción de lactosa como un modificador de la β -galactosiltransferasa en la glándula mamaria (Wang, 2008).

La α -LA se encuentra en bajo contenido en la leche bovina respecto a la leche materna. En la LM equivale al 28 % de la PT y al 41 % de la fracción sérica, en contraste, en la leche de bovino representa del 2-5 % de la PT y del 17-22 % de la fracción sérica (Heine *et al.*, 1991). La $h\alpha$ -LA y la $b\alpha$ -LA comparten un 72 % de homología en la secuencia de aminoácidos y ambas proteínas contienen 6.0 % de triptófano, 5.0 % de cisteína y solo 0.9 % de metionina (Lønnerdal, 1994). Por lo tanto, las marcadas variaciones en el contenido de estos aminoácidos en las FI respecto a la LM se deben principalmente a las bajas cantidades de la α -LA en la leche de bovino, como se mencionó anteriormente. El triptófano también tiene relevancia al ser un precursor de la serotonina (Lien, 2003). Tomando en cuenta todos los esfuerzos tecnológicos que se han hecho para mejorar las FI el balance de aminoácidos aún no se ha logrado. La opción de agregar dichos aminoácidos en forma libre no es recomendable debido a su baja estabilidad y a que se daría una absorción preferente de éstos en lugar de otros aminoácidos también necesarios (Heine *et al.* 1991).

Aparte del beneficio nutricional que proporciona la α -LA, se han atribuido más beneficios, como un efecto prebiótico en la microbiota intestinal debido a los péptidos producto de la hidrólisis en el tracto gastrointestinal (Lönnerdal, 2010), efectos en el sistema nervioso como la regulación del estado de ánimo y la función cognitiva (Wang, 2008), así como que la estimulación del metabolismo en la mucosa intestinal y para prevenir infecciones gastrointestinales (Bruck *et al.* 2006). La α -LA es altamente digerible ya que no se encuentran remanentes de esta proteína en las heces de los infantes alimentados al seno materno (Shamir, 2016).

En un estudio multicéntrico realizado en Philadelphia, E. U. A, donde se evaluaron infantes saludables nacidos a término y alimentados con FI exclusivamente se demostró que el enriquecimiento con $\beta\alpha$ -LA de una FI experimental baja en proteínas (14.4 g/L de PT, 2.2 g/L de $\beta\alpha$ -LA) sí provee resultados comparables en lo que respecta al crecimiento y valores de albúmina sérica en los infantes alimentados con dicha fórmula experimental respecto a los que fueron alimentados con una FI estándar, así como también demostró ser segura y tener una mayor tolerancia por parte de los infantes (Lien, 2004). Lo anterior sugiere una nutrición proteica adecuada, incluso siendo esta fórmula experimental más baja en PT, así como mayor tolerancia, lo que hace que haya una mayor semejanza de ésta con la de la LM.

Si se contara con una fuente suficiente de esta proteína a un costo razonable, esta proteína sería un excelente suplemento para las fórmulas infantiles (Heine *et al.* 1991; Lönnerdal, 2010).

2.3.2. Lactoferrina

Respecto a la LF, ésta es una glicoproteína con peso molecular de 80 kDa perteneciente a la familia de las transferrinas (Brock, 1995), con punto isoeléctrico de 9 (García *et al.*, 2012) y que presenta alta resistencia a la proteólisis (Lönnerdal, 1995). Está conformada por una cadena polipeptídica simple con 700

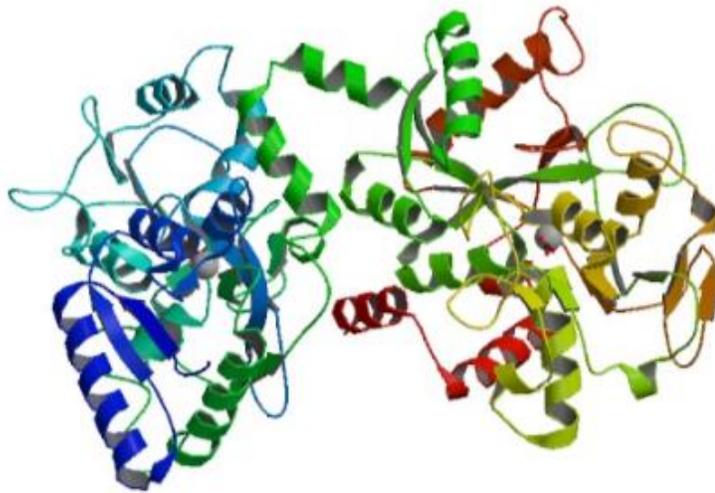


Figura 2. Estructura cristalizada de LF humana. RCSB - Protein Workshop Viewer for PDB ID: 1FCK. DOI: 10.2210/pdb1FCK/pdb.

aminoácidos y forma dos lóbulos unidos por una α -hélice (Fig. 2) que pueden unir un ión metálico (Fe^{+3} , Fe^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2}) en conjunto con el ión bicarbonato (García *et al.*, 2012). La homología de la secuencia de aminoácidos entre la LF humana y la de bovino es de 68 % (Lönnnerdal, 1995). Es secretada en la leche y otros fluidos de los mamíferos, como las lágrimas, saliva, semen, fluidos vaginales, moco, etc. (Cooper, 2015). Las concentraciones de LF van de 1-3 mg/L en la LM, y el promedio en leche de bovino es de 0.115 mg/L (Cooper, 2015).

La LF tiene actividades antimicrobianas, inmunomoduladoras, antiinflamatorias, como antioxidante (Wakabayashi *et al.*, 2006) y anticarcinogénicas (García *et al.*, 2012). Los mecanismos por los cuales realiza estas actividades son descritos por varios autores, comenzando por la actividad antimicrobiana en contra de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, donde el extremo N-terminal altamente catiónico interactúa con los lipopolisacáridos y con el ácido lipoteicoico presentes en las membranas de las respectivas bacterias lo que no permite el contacto de éstos con los cationes Ca^{+2} y Mg^{+2} (Yen *et al.*, 2009; García *et al.*, 2012).

La capacidad antimicrobiana no solo se limita a bacterias, sino también a virus, levaduras, hongos (Drago, 2006) y parásitos (Yamauchi *et al.*, 2006). De una forma indirecta, la LF secuestra el hierro disminuyendo su disponibilidad para ser utilizado por los microorganismos, lo que promueve el crecimiento de bacterias probióticas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, las cuales tienen bajos requerimientos de dicho mineral (Yen *et al.*, 2009). De la misma forma, al bajar la disponibilidad de hierro no permite el crecimiento de bacterias patógenas que requieren altas concentraciones del mineral (Rainard, 1986) y baja la expresión de sus factores de virulencia (García *et al.*, 2012).

Otro efecto positivo de la LF es la disminución de algunas citosinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-2, TNF α) llevando a una reducción del estrés oxidativo (Actor *et al.*, 2009). El mecanismo de inmunomodulación se da por la unión de la LF a varias moléculas cargadas negativamente en la superficie de las células del sistema inmune, lo cual tiene evidencia que desencadena rutas de señalización para activación, diferenciación y proliferación de dichas células (Bhatia, 2016; Baker, 2005) incrementando el sistema de defensa del cuerpo. La actividad anticarcinogénica se atribuye a que la LF puede inducir a apoptosis y bloquea el paso de la fase G1 a la S en el ciclo celular de las células malignas *in vitro* (Crouch, 1992; Öztaş & Özgüneş, 2005).

Otros autores mencionan experimentos *in vivo* donde se trataron tumores en ratones utilizando hLF recombinante y se vio el incremento de citosinas anticarcinogénicas como IL-18, así como la activación de células NK y linfocitos T CD8+ (Wang *et al.*, 2000; Shimamura *et al.*, 2004). La absorción de hierro por las células intestinales en cultivo se ve facilitada por el uso de LF, lo cual es mediado por receptores específicos de LF en el enterocito (Lönnerdal, 2003).

Producto de la hidrólisis enzimática de la LF se generan algunos péptidos bioactivos, como la lactoferricina Lfc-B, LFc_{in}, Lfampin 268–284 y Lfampin 265–

284, las cuales se ha visto que poseen diferentes capacidades antimicrobianas respecto a la molécula completa de LF (García *et al.*, 2012).

En un estudio realizado en Baltimore, E.U.A, se evaluó el efecto de una FI enriquecida con bLF (850 mg/L) versus una FI comercial a base de leche de vaca (102 mg/L de bLF) en infantes saludables con un periodo de gestación mínimo de 34 semanas y una edad menor o igual a 4 semanas, evaluados en un periodo de 12 meses. Se colectaron parámetros de crecimiento e información de enfermedades gastrointestinales, respiratorias y episodios de cólicos en los infantes durante el primer año de vida. De los 9 a los 12 meses se midieron anticuerpos para las inmunizaciones y parámetros hematológicos. Los resultados mostraron que la fórmula enriquecida con lactoferrina fue bien tolerada, así como que en los infantes que la consumieron hubo una disminución significativa de enfermedades del tracto respiratorio y un aumento significativo del hematocrito (King *et al.*, 2007).

En el 2016 la Universidad de Missouri-Columbia en conjunto con la Universidad del sur de California evaluaron los efectos del fármaco Talactoferrina (rh-TLF Agennix, Inc.) sobre el microbioma fecal y contrastaron esas influencias con el medio ambiente de la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (NICU por sus siglas en Inglés) en 121 infantes nacidos con muy bajo peso al nacer (menor o igual a 1500 g) repartidos en dos grupos, el grupo de tratamiento y el grupo control, evaluados en los primeros 28 días de vida dándoles una dosis de 150 mg/kg de peso vía enteral cada doce horas y simulando el consumo de LF en leche materna (aproximadamente 2 mg/mL). En este estudio se observó que la Talactoferrina si influenció la composición del microbioma fecal, y que junto con prácticas de cuidado estándar en la NICU modifica el microbioma fecal y reduce infecciones hospitalarias en los infantes nacidos con muy bajo peso al nacer. Esencialmente se vio una diferencia en los *phylum* en cada grupo, los tratados con Talactoferrina presentaron principalmente *Proteobacteriaceae* y *Firmicutes* versus los no tratados que presentaron *Enterobacteriaceae* y *Clostridiaceae* (Sherman *et al.* 2016).

2.4 Tecnología del ADN recombinante

Con el objetivo de mejorar la vida humana, en las últimas décadas se ha venido trabajando en los tres principales factores que afectan a esta: deficiencia de alimentos, problemas de salud y daños medioambientales. Dichos factores requieren atención debido al incremento de la población mundial, ya que actualmente esta es de 7,600 millones de personas y alcanzarán los 8,600 millones para el año 2030 (ONU, 2017). También de relevancia es el número de muertes anuales que son causadas debido a problemas de salud, como enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, VIH/SIDA, tuberculosis, malaria, entre otros, que suman un total de 36 billones de muertes anuales (Khan *et al.*, 2016).

A pesar de los esfuerzos que se han venido haciendo por tratar de mejorar estas condiciones por medio del uso de métodos tradicionales esto no ha sido suficiente, por lo que es necesario el uso de nuevas tecnologías, 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 *et al.*, 2016).

Dentro de la ingeniería genética, la tecnología del ADN recombinante está jugando un papel muy importante debido a que por medio de esta se están desarrollando muchas aplicaciones de relevancia en el mejoramiento de la salud de las personas. 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 *et al.*, 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 & 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 2).

Tabla 2. Aplicaciones de la tecnología del ADN recombinante.

Productos terapéuticos	Productos genéticamente modificados	Diagnosis	Energéticos
Vacunas Hormonas de crecimiento Anticuerpos	Frutas Vegetales	Terapia génica CRISPR	Biohidrógeno Bioetanol
Vectores	Cereales	Dispositivos de monitoreo Estrategias terapéuticas	Biometanol Biobutanol
Proteínas recombinantes Medicamentos anticancerígenos	Animales		

Fuente: Khan *et al.*, 2016.

Para el caso particular de las proteínas recombinantes su producción ha ido incrementando y sus usos van desde aplicaciones en laboratorio, diagnóstico, propósitos terapéuticos y materiales inteligentes. Las proteínas recombinantes forman un mercado multibillonario, ya que para el año 2016 estos productos lograron ventas por 50 billones de dólares, lo que equivale a un tercio de las ventas totales de biofarmacéuticos. Lo anterior debido a que la mayor parte del mercado biotecnológico corresponde a las proteínas recombinantes (Oliveira & Domingues, 2017).

El éxito en la aplicación de las proteínas recombinantes depende de un procesamiento exitoso, donde la purificación, la validación de la calidad, cuantificación y almacenamiento son puntos relevantes del proceso de producción. Por lo tanto, el desarrollo de una estrategia adecuada y refinada de purificación es el primer paso para obtener proteínas homogéneas y bien 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 *et al.*, 2016; Oliveira & Domingues, 2017).

De acuerdo con lo anterior, la tecnología del ADN recombinante ha sido una herramienta importante en el mejoramiento de la vida de las personas. Aunque

actualmente aún hay algunos inconvenientes con el uso de dicha tecnología el reto es el mejoramiento constante para mejores aplicaciones futuras.

2.5 Sistemas de expresión disponibles para la producción de rh α -LA y rhLF

Desde hace más de 20 años se ha venido trabajando en diferentes sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes de la leche materna. Por lo que en la actualidad se encuentran disponibles varios sistemas de expresión para la producción de las proteínas recombinantes humanas α -lactoalbúmina y lactoferrina.

Para el caso de la lactoferrina se encuentran reportados varios sistemas, tanto procariotas como eucariotas. En una revisión bibliográfica publicada en el año 2014 se mencionan las bacterias *Escherichia coli* y *Rhodococcus erythropolis*; las levaduras *Pichia pastoris* y *Sacharomyces cerevisiae*; los hongos filamentosos *Aspergillus oryzae*, *A. nidulans* y *A. awamori* (Yemets *et al.*, 2014).

También se encuentran disponibles organismos superiores como sistemas de expresión, como plantas y algunos mamíferos. Para la LF se reportan las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. y *N. bentamiana* Domin), trigo (*Triticum aestivum* L.), papa (*Solanum tuberosum* L. e *Ipomoea batatans*), de 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 *et al.*, 2016; Yemets *et al.*, 2014). Aunque estos últimos presentan algunas desventajas sobre los otros sistemas de expresión, ya que todavía existen preocupaciones bioéticas y políticas deficientes acerca del uso de organismos genéticamente modificados (OGM's). Aunado a que existe un riesgo mayor de contaminación, los ciclos de vida de los mamíferos son más largos y los métodos

de purificación son más caros, lo que en general aumenta el costo de obtención de las proteínas recombinantes de interés.

A pesar de que hay varios sistemas de expresión para dichas proteínas, solo algunos han sido aprobados para el mercado o introducidos en la práctica clínica. Por ejemplo, el fármaco Talactoferrina que se produce en *Aspergillus niger* se emplea para el tratamiento de tumores sólidos, 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>).

Con base a lo anterior, los sistemas de expresión basados en microorganismos como las levaduras y hongos filamentosos, así como plantas superiores, se consideran sistemas de expresión eucariotas más eficientes. La eficiencia de estos sistemas se basa en altos niveles de expresión de la proteína de interés, procedimientos de extracción y purificación más sencillos y económicos, facilidad de manipulación, entre otros (Cooper *et al.*, 2016; Yemets *et al.*, 2014).

2.6 *Pichia pastoris* como hospedero en el sistema de expresión

P. pastoris es una levadura metilotrófica que se ha venido empleando frecuentemente en sistemas de expresión para la producción de más de 400 proteínas para investigación básica y también con aplicación industrial (Bhataya *et al.*, 2009). La Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) ha aprobado biofarmacéuticos y enzimas industriales producidos en *P. pastoris* ya que el uso de este sistema es ampliamente reconocido como adecuado y seguro para el uso en humanos (Wang *et al.*, 2016).

En esta levadura se han hecho varias modificaciones genéticas, similares a las hechas en *S. cerevisiae*, pero *P. pastoris* presenta algunas ventajas respecto a esta. Tiene una fuerte preferencia por el metabolismo respiratorio por lo que

alcanza densidades celulares muy grandes sin la generación de etanol, puede escalarse con mayor facilidad de matraces a biorreactores, y aunque sea requerida una re-optimización de las condiciones de cultivo el proceso es altamente reproducible (Bhataya *et al.*, 2009).

Otras ventajas que presenta como sistema de expresión es su bajo costo comparado con sistemas de expresión bacterianos y sistemas eucariotas complejos, rápido crecimiento y manejo, carece de endotoxinas, realiza plegamiento adecuado de las proteínas así como modificaciones postraduccionales tales como puentes disulfuro y N-glicosilaciones (Bhataya *et al.*, 2009; Akbarzadeh *et al.*, 2015; Armanmehr *et al.*, 2016; Azoun *et al.*, 2017). Aunque éstas últimas presentan algunas diferencias comparadas con los organismos eucariotas superiores se dice que la función de la proteína no se vería afectada debido a que la conjugación sobre Asn de la proteína expresada es en promedio de 8-14 residuos de manosa (Zou *et al.*, 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 *et al.*, 2009; Cooper *et al.*, 2015; Armanmehr *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). El diseño de plásmidos se realiza bajo el mando de alguno de los dos promotores, para el caso de proteínas que se emplearán en alimentos es recomendable el uso del promotor constitutivo GAP que no requiere metanol para la inducción de la expresión.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe la necesidad de contar con alimentos especializados para la nutrición infantil temprana con una mejor composición nutrimental, que representen una alternativa adecuada a la LM cuando las madres no puedan, tengan contraindicado o decidan no amamantar a sus bebés. Para lo cual, se propone desarrollar fórmulas que contengan a las proteínas α -LA y LF, pero éstas y algunas otras proteínas presentes en la LM que proveen beneficios a la salud no se encuentran comercialmente disponibles en grandes cantidades, lo que dificulta adicionarlas a las FI (Shamir, 2016). En el mercado se encuentran disponibles las proteínas de origen bovino, pero debido a la tecnología implicada en el proceso de obtención a partir de suero, concentrados de suero, leche entera y algunos otros derivados los costos son muy elevados y las proteínas presentan una baja biodisponibilidad, así como contaminación con otras proteínas alergénicas como la β -LGB (Tomita *et al.*, 2008).

En la actualidad ya se cuenta con tecnología para poder obtener estas proteínas de forma recombinante, para lo cual existen varios sistemas de expresión para la producción tanto de rh α -LA como de rhLF (Rachmawati *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007; Wang, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Cooper, 2015). Esta tecnología aún implica costos muy elevados para la producción de las proteínas y/o bajos rendimientos. Por lo que se sigue trabajando en la obtención de tecnologías eficientes y de bajo coste. Para esto la tecnología de proteínas recombinantes usando microorganismos como sistemas de expresión y plantas con biorreactores juega un papel muy importante para obtener proteínas puras y seguras que puedan ser utilizadas con un fin terapéutico (Lønnerdal, 2010).

La producción de glicoproteínas recombinantes es un reto, debido a las diferencias en las glicosilaciones que se pudieran presentar, por lo que la adecuada elección de un huésped y el control de las condiciones de cultivo son puntos críticos. El sistema de expresión empleado para la producción de las rHMP

fue la levadura *P. pastoris* ya que dicha levadura es ampliamente utilizada para la producción heteróloga de proteínas y glicoproteínas (Guerrero *et al.*, 2004; Bhataya *et al.*, 2009; Kumari *et al.*, 2014).

La evidencia muestra que las condiciones a las cuales se producen las proteínas recombinantes a nivel laboratorio normalmente no son las mismas para la producción a una escala mayor (Bhataya *et al.*, 2009). Por lo que resulta de importancia determinar las condiciones de cultivo que afectan la producción de las rHMP a nivel piloto.

IV. JUSTIFICACIÓN

Debido a que en México un 75 % de los infantes menores a 6 meses son alimentados con algún tipo FI (ENSANUT, 2012) y aunado a los problemas que actualmente existen con el uso de fórmulas infantiles es importante proponer ingredientes funcionales que garanticen una mejora a las FI que actualmente se encuentran en el mercado. Lo cual tendrá un impacto positivo en la nutrición y desarrollo de los infantes, así como un menor riesgo de padecer ciertas enfermedades en la etapa adulta. Las opciones propuestas en este trabajo de investigación son la producción de dos proteínas que de acuerdo a la literatura tienen múltiples beneficios a la nutrición y salud de los infantes, la $\text{rh}\alpha\text{-LA}$ y la rhLF obtenidas por tecnología de ADN recombinante.

V. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Producir heterológamente las proteínas rh α -LA y rhLF y desarrollar un proceso de escalamiento para la producción de ambas proteínas a nivel piloto (2 L).

6.2. Objetivos específicos

1. Clonar vectores de expresión que contengan los genes humanos de lactoferrina y lactoalbúmina en cepas de *P. pastoris* mediante electroporación.
2. Producir heterológamente las proteínas rh α -LA y rhLF en un sistema basado en la levadura *Pichia pastoris* a nivel laboratorio.
3. Producir heterológamente las proteínas rh α -LA y rhLF a nivel piloto en cultivos de 12 horas de fermentación.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Materiales

7.1.1. Materiales biológicos

El sistema de expresión se compuso por la levadura *P. pastoris* como hospedero eucariota, así como la bacteria *E. coli* Top 10 (Invitrogen, Carlsbad, CA) como hospedero procariota y por los plásmidos recombinantes pGZαLM (Tib Mol Biol GmbH, Eresburgstrasse, BE, DE).

7.1.2. Materiales

Los siguientes materiales fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA): estándar de α-LA y de LF de bovino, medio de cultivo de levaduras a base de extracto de levadura, peptona y dextrosa (YPD). Las enzimas *Xho*I y *Xba*I utilizadas para la doble digestión del plásmido pGZαLM y el marcador de masa molecular para ácidos nucleicos Quick-Load™ 1 kb Extend se consiguieron con New England Biolabs (Ipswich, MA, EUA). Los geles TGX™ precast gels con gradiente de 4-20 %, la solución amortiguadora de carga de muestra de Laemmli 2X, la solución amortiguadora de corrida Tris-glicina-SDS 10X, el QC Colloidal Coomassie Stain, agarosa (grado biología molecular), la solución amortiguadora Tris-ácido bórico-EDTA 10X y el marcador de masa molecular para proteínas Precision Plus™ Protein fueron comprados de Bio-Rad (Hercules, CA, EUA). 2-mercaptoetanol, glicina, etanol absoluto y ácido acético glacial fueron adquiridos de Avantor Performance Materials (Parkway Center Valley, PA, EUA). El PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, la mezcla para la PCR de punto final Platinum™ SuperFi Master Mix, el sistema de cromatografía por afinidad Probond™ Purification Kit, el antibiótico Zeocina™ y el colorante de geles de ácidos nucleicos SYBR Gold™ fueron obtenidos de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). El sistema para la extracción del ADN plasmídico QIAGEN Plasmid Mini Kit se consiguió de Qiagen GmbH (Hilden, NW, DE).

7.2. Métodos

7.2.1. Construcción del vector de expresión

Los plásmidos recombinantes pGZaLM empleados como vectores de expresión se sintetizaron en un laboratorio comercial (Invitrogen) y fueron producto de la clonación del plásmido pGAPZ α A (Invitrogen) y los genes con secuencias de nucleótidos optimizadas. Las secuencias de nucleótidos optimizadas que codifican a cada una de las proteínas de la LM recombinantes se sintetizaron *in vitro* utilizando como referencia las secuencias del ARNm de las proteínas de la LM que están publicadas en el GenBank. A continuación, se describen las referencias: LACTOFERRINA | Gen LTF, REFSEQ: AY165046.1. ALFA LACTOALBÚMINA | Gen LALBA, REFSEQ: NM_002289.2.

El plásmido pGZaLM está compuesto de la secuencia de nucleótidos codificante optimizada que se menciona arriba fusionada “en marco” a una región promotora GAP (pGAP) del plásmido. La cual permite la expresión constitutiva y estable de las proteínas recombinantes en la levadura *P. pastoris*. La secuencia de nucleótidos codificante optimizada está flanqueada “en marco” por una región codificante del factor de secreción α , el cual permite secretar la proteína al medio de cultivo de la levadura. Además, el plásmido contiene una región que codifica un motivo de polihistidinas que permite la purificación específica de la proteína recombinante. Así mismo, este plásmido contiene una región de terminación de la transcripción (AOX1) que incrementa la estabilidad de la proteína recombinante. Por otro lado, el plásmido utilizado en el presente método 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.

7.2.2. Propagación y conservación de los plásmidos

Con el objetivo de obtener plásmidos en cantidad y calidad apropiadas, así como para la conservación de los mismos, se realizó la transformación de *E.coli* OneShot™ Top 10 por el método químico de CaCl₂/choque térmico. Esta transformación se fundamenta en la generación de células competentes con el CaCl₂, ya que los iones de Ca⁺² tienen la capacidad de unirse a la membrana plasmática, lo que facilita la unión del ADN plasmídico cargado negativamente. Posteriormente, el choque térmico permite la permeabilización de la membrana y el ADN unido a la membrana se puede internalizar (Sambrook, *et al.*, 1989).

Para cada transformación, se descongeló en hielo un vial de la cepa de *E. coli* ultracompetente One Shot™ Top10. Después, a cada vial se le agregaron 2 µL de ADN plasmídico 5 µg/mL y se mezcló con cuidado. A continuación, los viales se incubaron en hielo por 30 min y pasando este tiempo, se metieron en un baño de agua a 42 °C/30 s sin agitar. Luego, se retiraron los viales del baño de agua e inmediatamente se colocaron en hielo por 2 min. Pasando los 2 min de incubación en hielo, se agregó a cada vial 250 µL de medio S.O.C (2 % p/v de triptona, 0.5 % p/v de extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa) acondicionado previamente a 25 °C. Posteriormente se taparon los viales para así agitarlos verticalmente a 150 rpm/1 h en una incubadora con agitación a 37 °C. Luego de la incubación, para verificar la correcta transformación se realizó un cultivo selectivo, en el cual se agregaron y extendieron 200 µL del medio de cultivo de las células de *E. coli* transformadas sobre las placas con agar LB bajo en sales con 50 µg/mL de Zeocina™ y se incubaron a 37 °C por 24 horas.

La purificación de los plásmidos se realizó por el método de lisis alcalina empleando kits comerciales QIAGEN® Plasmid Mini y Maxi Kit. Para verificar la correcta transformación de *E. coli* se emplearon dos métodos: 1) una doble digestión con las enzimas de restricción *Xho*I y *Xba*I y 2) PCR de punto final.

La cuantificación de cada uno de los plásmidos recombinantes se realizó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™2000 (ThermoFisher Scientific), el cual proporciona la concentración de DNA plasmídico por μL de solución de resuspensión.

7.2.3. Transformación de *P. pastoris*

La transformación de *P. pastoris* se realizó con el objetivo de obtener cepas capaces de producir las proteínas recombinantes de interés. Para lo cual se empleó el método físico de electroporación por pulsos de decaimiento exponencial, por medio del cual se pueden alcanzar altas eficiencias de transformación (en promedio 10^4 transformantes/ μg 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. De esta forma las células son permeables para tomar solutos del medio ambiente que las rodea, como ADN plasmídico y otras moléculas más pequeñas (Ausubel *et al.*, 2002).

7.2.3.1. Pruebas de viabilidad y concentración del antibiótico

Se llevaron a cabo pruebas para verificar que la cepa nativa de *P. pastoris* se encontrara viable y que no desarrollara en medio selectivo con Zeocina™. Dichas pruebas se realizaron en placas con medio YPD (2 % p/v glucosa, 2 % p/v peptona, 1% p/v extracto de levadura) por la técnica de extensión en superficie, sin Zeocina™ para el caso de la viabilidad, y con distintas concentraciones de Zeocina™ para determinar la concentración a la cual *P. pastoris* nativa no desarrolla.

7.2.3.2. Digestión de los plásmidos

El primer paso fue la digestión del ADN plasmídico, donde se tomaron 10 μg de cada plásmido y se digirieron con la enzima *Bsp* HI, que corta una vez en la región del promotor GAP (356pb) para linearizar el vector, siguiendo el protocolo de digestión descrito por el fabricante. La completa digestión de cada plásmido se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v teñido con SYBR Gold™.

Debido a que los plásmidos digeridos deben estar libres de sales para poder realizar la electroporación, estos se limpiaron por medio de una precipitación del ADN plasmídico con 0.7 volúmenes de isopropanol y un lavado con etanol al 70 %, la resuspensión se hizo en 10 μ L de agua desionizada estéril y se mantuvieron a 4 °C hasta la electroporación.

7.2.3.3. Preparación de las células competentes

Para la preparación de las células, primeramente, se hizo la activación de la levadura *P. pastoris* en 5 mL de medio YPD en tubo cónico de 50 mL e incubando a 30 °C/150 rpm toda la noche. Posteriormente se inocularon 500 mL de medio fresco YPD en un matraz de 2 L con 100 μ L del cultivo ya activado de *P. pastoris* y se incubó toda la noche a 30 °C/150 rpm. Pasado el tiempo de incubación se centrifugaron las células a 1500 rpm/5 min a 4 °C. Con la finalidad de lavar las células se resuspendió el pellet en 500 mL de agua estéril fría (0 °C), se centrifugó nuevamente y se resuspendió en 250 mL de agua estéril fría. Hechos los lavados se volvieron a centrifugar las células y se resuspendieron en 20 mL de sorbitol 1 M frío (0 °C). Se centrifugan las células y el pellet se resuspendió en 5 mL de sorbitol 1 M, las células resultantes eran electrocompetentes por lo que se mantuvieron en hielo y se utilizaron el mismo día.

7.2.3.4. Electroporación

Con las células y los plásmidos preparados se procede a realizar la electroporación, para lo cual en celdas de electroporación de 0.2 cm previamente enfriadas en hielo (0 °C) se mezclaron 80 μ L de las células de *P. pastoris* electrocompetentes con 5 μ g de ADN plasmídico linearizado correspondiente a cada proteína. Las celdas con la mezcla se incubaron 5 minutos en hielo y posteriormente se colocaron en el electroporador (Gene Pulser Xcell, Bio-Rad) para pulsar con los parámetros de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* sugeridos por el fabricante del electroporador (25 μ 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. Pasado el tiempo de incubación se extendieron 10, 25, 100 y 200 µL en placas de medio YPD con sorbitol al 1 M y conteniendo 300 µg/mL de Zeocina™. Las placas se incubaron a 30 °C/72 h. La electroporación para cada plásmido se hizo por duplicado. Pasado el tiempo de incubación se eligieron colonias aisladas y de mayor tamaño para realizar la genotipificación.

Se utilizó la ecuación 1 y 2 para calcular la eficiencia de transformación:

$$\text{UFC transformadas} = \frac{(\text{conteo en placa}) \times (\text{factor de dilución}) \times (\text{volumen electroporado})}{\text{volumen de inóculo en placa}} \quad (1)$$

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\text{UFC transformadas}}{\mu\text{g de ADN}} \quad (2)$$

7.2.4. Genotipificación

Para asegurar que las cepas de interés de la levadura *P. pastoris* incorporaron los genes recombinantes hLTF y hLALBA en su genoma, se realizó la amplificación de la región que abarca el promotor GAP y la región AOX del plásmido pGZaLM mediante PCR de punto final.

El ADN genómico se extrajo mediante el Kit PureLink® Genomic DNA. Para dicha extracción se utilizaron cultivos de 3 mL con 16 h de incubación a 30 °C y 150 rpm. Para la preparación del lisado se tomaron 1.5 mL del cultivo y se cosecharon las células a 6000 rpm/10 min. El pellet se resuspendió en 500 µL de buffer de CTAB (100 mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 2 % p/v CTAB, 1.4 M NaCl, pH=8.0) y se adicionaron 180 µL del buffer de digestión PureLink® Genomic más 20 µL de proteinasa K, la digestión se incubó a 55 °C por 2.5 h. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron 20 µL de RNAasa y se incubó a temperatura ambiente por 2 min para posteriormente adicionar 200 µL del buffer de lisis PureLink® Genomic, se centrifugó a 14000 rpm/5 min y se recuperó el sobrenadante. Al sobrenadante se adicionaron 200 µL de etanol al 96 % v/v y se homogeneizó en vortex. Terminada la lisis celular se procedió a hacer la unión del

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

Luego, 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 AOX-antisentido. 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 (15 s para α -LA y 45 s para 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™.

7.2.5. Producción de las proteínas recombinantes a nivel laboratorio

Primeramente, se hizo la producción en matraz, con la finalidad de evaluar la producción de las rHMP por las cepas transgénicas seleccionadas de *P. pastoris*. Dicha producción se realizó primeramente en un volumen de 50 mL de medio YPD y posteriormente en 100 mL utilizando matraces Erlen Meyer de 250 mL y 500 mL respectivamente para permitir una buena aireación y con 100 μL de las células en conserva a -70 °C (en medio YPD con 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Zeocina™ y 15 % p/v de glicerol) de cada cepa como inóculo. Los matraces se incubaron a 30 °C por 48 h y con agitación de 150 rpm. Posteriormente se procedió a realizar el análisis de las proteínas producidas en matraz por SDS-PAGE y la determinación de PT en el medio de cultivo.

7.2.6. Preparación de los pre-inóculos para el escalamiento en biorreactor

El primer paso para el escalamiento en biorreactor es la preparación de los pre-inóculos de las cepas transgénicas de *P. pastoris*. Para ello se tomaron 100 μL

de las conservas a -70 °C de cada cepa para inocular medio YPD en matraces Erlen Meyer y a concentración de 300 µg/mL de Zeocina™. El volumen de inóculo representó del 5-10 % del volumen total en el reactor y 1/5 del volumen en el matraz Erlen Meyer, lo último para permitir una buena aireación del medio de cultivo. Los matraces se incubaron a 30 °C por 24 h y 150 rpm. Estos medios de cultivo se utilizaron para los ensayos de transferencia a nivel piloto.

7.2.7. Producción de las proteínas recombinantes a nivel piloto

Una condición necesaria para la producción adecuada de las proteínas recombinantes de interés es la expresión eficiente de los genes recombinantes hLTF y hLALBA en las cepas transgénicas de *P. pastoris*. Se ha descrito en la literatura que las condiciones adecuadas para el crecimiento de las cepas transgénicas son diferentes a las condiciones que se requieren para inducir la producción de las proteínas recombinantes (Sanders, 1990; Palomares *et al.*, 2004). Por esta razón, para la transferencia del cultivo de las cepas transgénicas de interés de *P. pastoris* se llevó a cabo un escalamiento ascendente. En este escalamiento, se trató de reproducir las condiciones en matraz y se evaluaron los cambios más apropiados para el cambio de escala, principalmente el suministro de aire para incrementar el oxígeno disuelto en el medio de cultivo.

Para la producción a nivel piloto se hicieron cultivos en lote donde se utilizó un biorreactor de capacidad de 4 L (Applikon biotechnology 4L) para producir la rhLF, y un biorreactor de capacidad de 5 L (BIOSTAT® Aplus, Sartorius stedim biotech) para producir la rh α -LA. Primeramente, se corrieron las pruebas para rhLF y posteriormente las de rh α -LA. En la primera corrida, el volumen de trabajo fue de 1 L de medio YPD, y en las 3 corridas siguientes se trabajó a un volumen de 2 L para tener mejor control de la temperatura. En caso necesario se adicionó polietilenglicol (PEG) a concentración final de 0.9 % p/v en el medio de cultivo como antiespumante (Holmes *et al.*, 2006).

La polarización del electrodo de oxígeno se realizó por 12 h a 700 rpm y con el flujo máximo de aire (>10 L/min). Terminada la polarización se realizó la calibración al 100 % de saturación de oxígeno y se inoculó el reactor con el 5 % y el 10 % del volumen de inóculo para la lactoferrina y la lactoalbúmina respectivamente. Las condiciones de cultivo se realizaron sin control de pH, flujo de aire superior a 10 L/min para mantener un mínimo de 20 % de saturación de oxígeno en el medio de cultivo agitación y temperatura constantes de 200 rpm y 30 °C respectivamente. La fermentación bajo estas condiciones se llevó a cabo por 12 h. Estas condiciones se obtuvieron de un protocolo general disponible en la literatura para el cultivo de *P. pastoris* (Pichia Fermentation Process Guidelines, Invitrogen) y no se realizó ninguna actividad de optimización.

Terminada la fermentación se procedió a realizar la purificación y el análisis de las proteínas producidas a nivel piloto por SDS-PAGE, así como las determinaciones de peso seco y determinación de PT al final de la fermentación.

7.2.8. Determinación de proteína total soluble (PT) en el medio de cultivo

La proteína soluble presente en el sobrenadante del medio de cultivo se cuantificó mediante el método de Lowry (Olson y Markwell, 2007). Se preparó una solución estándar de proteínas con seroalbúmina bovina a una concentración de 20 mg/L. A los estándares y las muestras se determinó la absorbancia con un espectrofotómetro a 595 nm (iMark, Bio Rad). El reactivo de Biuret se preparó disolviendo 3.8 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 6.7 g NaEDTA en 700 ml de H_2O . Mientras se agitaba se añadieron 200 ml de NaOH 5N y luego 1g de KI como estabilizante y se guardó en un frasco de vidrio ámbar.

Entre los métodos para la cuantificación de proteínas totales destaca el método de Lowry por las reacciones coloreadas específicas de las proteínas. En el método se cuantifica la formación de un complejo estable, producto de la reacción entre los enlaces peptídicos de las proteínas (grupos NH) y el ion Cu^{+2} en un medio fuertemente alcalino (pH >12) dando lugar a un color violeta cuya intensidad depende de la concentración de proteínas en la muestra Fig.3.

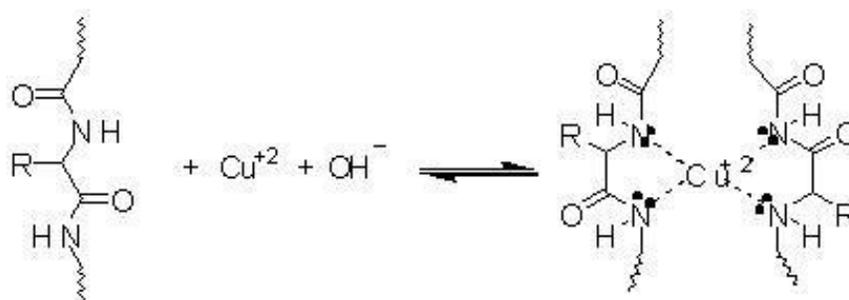


Figura 3. Reacción del ion Cu^{+2} con los enlaces peptídicos de las proteínas.

7.2.9 Purificación de las proteínas recombinantes

La purificación de las proteínas recombinantes se efectuó mediante cromatografía de afinidad a metal (níquel) inmovilizado (IMAC), tomando en cuenta que las rHMP contienen un TAG de polihistidinas que permite la purificación específica por dicho método. La purificación de las proteínas recombinantes por afinidad se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes utilizando el kit ProBond® Purification System.

7.2.9.1. Concentración del medio de cultivo

Se partió centrifugando el medio de cultivo a 10000 rpm/10 min para eliminar las células y emplear el sobrenadante para hacer la purificación. Posteriormente se hizo una concentración del sobrenadante vaciándolo en las unidades de concentración Amicon® Ultra de 10,000 NMWL (tamaño molecular nominal límite por sus siglas en inglés) y se centrifugó a 5000 rpm/15 min, para obtener sobrenadante concentrado de las proteínas de interés.

7.2.9.2. Cromatografía de afinidad

Las columnas de cromatografía de afinidad se prepararon de acuerdo a las indicaciones del fabricante (ThermoFisher Scientific). El primer paso de la purificación es la unión, para lo cual se adicionó el sobrenadante concentrado a la columna, se dejó 30 min a temperatura ambiente, agitando por inversión

esporádicamente para mantener resuspendida la resina. Pasado el tiempo se centrifugaron las columnas a 800 rpm/1 min y se aspiró el sobrenadante cuidadosamente. Posteriormente se realizaron lavados con 4 mL de los buffers de unión, de lavado a pH=6.0 y de lavado a pH=5.3, centrifugando a 800 rpm/1 min y descartando el sobrenadante en cada paso.

La elución se realizó con 5 mL del buffer de elución. Después se hizo la diálisis y concentración de las proteínas. Para lo cual se colocaron los 5 mL eluidos en unidades Amicon® Ultra de 10,000 NMWL y se lavó 3 veces en una proporción 1:1 (v/v) con un amortiguador 10 mM de Tris, 0.1 % p/v de Tritón a pH=8 y centrifugando a 5000 rpm/10 min para eliminar la urea.

Finalmente se realizó la lectura de la absorbancia a 280 nm de la fracción pura de proteínas recombinantes en un espectrofotómetro UV/Vis (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific). La cuantificación se realizó dividiendo la lectura de la absorbancia a 280 nm entre el coeficiente de extinción calculado para cada una de las proteínas. El coeficiente de extinción se calculó por medio del portal ExPasy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) y utilizando las secuencias aminoacídicas de la lactorrina (P02788 TRFL_HUMAN) y lactoalbúmina (P00709 LALBA_HUMAN) reportadas en la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

7.2.10. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)

Tanto el medio de cultivo crudo de las levaduras transgénicas como las fracciones purificadas mediante cromatografía por afinidad fueron analizados mediante SDS- PAGE para determinar la expresión y la secreción de las rHMP.

Las muestras del medio de cultivo crudo y de las fracciones puras de las rHMP se mezclaron 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.

Las soluciones de trabajo se calentaron a 90 °C/10 min y se cargaron en un gel de poliacrilamida con un gradiente de 4 % a 20 %. En los geles se inyectaron también el marcador de masa molecular Precision Plus Protein y los estándares de la LF y de la a-LA de bovino como referencias para identificar las rHMP 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. A continuación, los geles fueron teñidos con el QC Colloidal Coomassie Stain (Bio-Rad). Finalmente, los geles fueron fotodocumentados con el GelDoc EZ (Bio-Rad) y las imágenes se analizaron con el software ImageLab 5.2.1 (Bio-Rad).

7.2.11. Determinación de la biomasa a nivel piloto

Se centrifugaron 90 mL del medio de cultivo obtenido del biorreactor de cada una de las cepas seleccionadas a 6000 rpm/10 min para obtener una pastilla celular. Se realizaron 3 lavados con agua estéril a la pastilla para retirar el exceso de medio de cultivo. La pastilla se secó a 80 °C /48 h en una estufa de secado por convección de aire (Froilabo, Air Performance Dynamica AP60). Pasado el tiempo de secado se pesó la pastilla seca. La biomasa se calculó dividiendo el peso de la pastilla seca entre el volumen total de medio de cultivo centrifugado (90 mL). El procedimiento se realizó por triplicado para cada cepa.

7.2.12. Manejo de desechos

A los residuos generados del cultivo de las cepas transgénicas de *P. pastoris* se les dió un tratamiento por medio de esterilización en autoclave, ya que de esta forma se garantiza la muerte de todos los microorganismos. Para dicha esterilización los desechos generados a partir de las pruebas experimentales deberán ser colocados en frascos de cristal o matraces Erlenmeyer tapados y del volumen necesario para su posterior colocación en el autoclave y bajo las condiciones requeridas (15 min a 121 °C, 15 lb de presión). Los residuos estériles

ya fríos se vertieron en bolsas RPBI rojas para su posterior disposición de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Propagación y conservación de los plásmidos recombinantes pGZaLM

En la Tabla 3 y en la Fig. 4 se muestran los resultados de la transformación de la cepa de *E.coli* Top10 con los plásmidos pGZaLM α -LA y pGZaLM LF (Fig.1 panel 1 y panel 2 respectivamente). Donde el control negativo fueron cepas de *E.coli* ultracompetente OneShot™Top10 sin plásmido (Fig. 1 panel 3), el control positivo fue el plásmido pPUC19 (Fig.1 panel 4), para la viabilidad se estriaron células de *E.coli* ultracompetente OneShot™Top10 placa sin Zeocina™ (Fig. 1 panel 5) y la funcionalidad del antibiótico Zeocina™ se verificó estriando una placa con cepas de *Salmonella* Thompson ATCC 8391 y *Staphylococcus aureus* ATCC 89213 no resistentes a Zeocina™ (Fig. 1 panel 6).

Tabla 3. Conteo de las muestras transformantes de *E. coli* TOP10 y sus controles en placa de medio selectivo con Zeocina™.

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

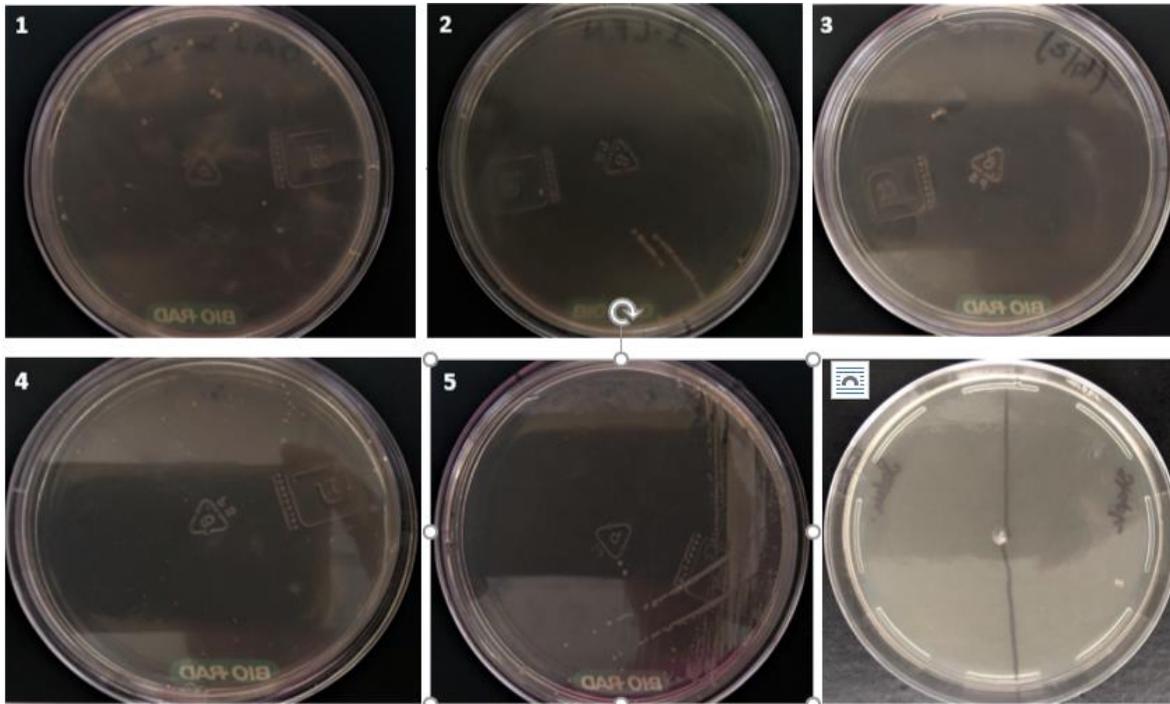


Figura 4. Crecimiento de las transformantes de *E. coli* TOP10 y sus controles en placas de medio selectivo con Zeocina™ después de 24 horas de incubación.

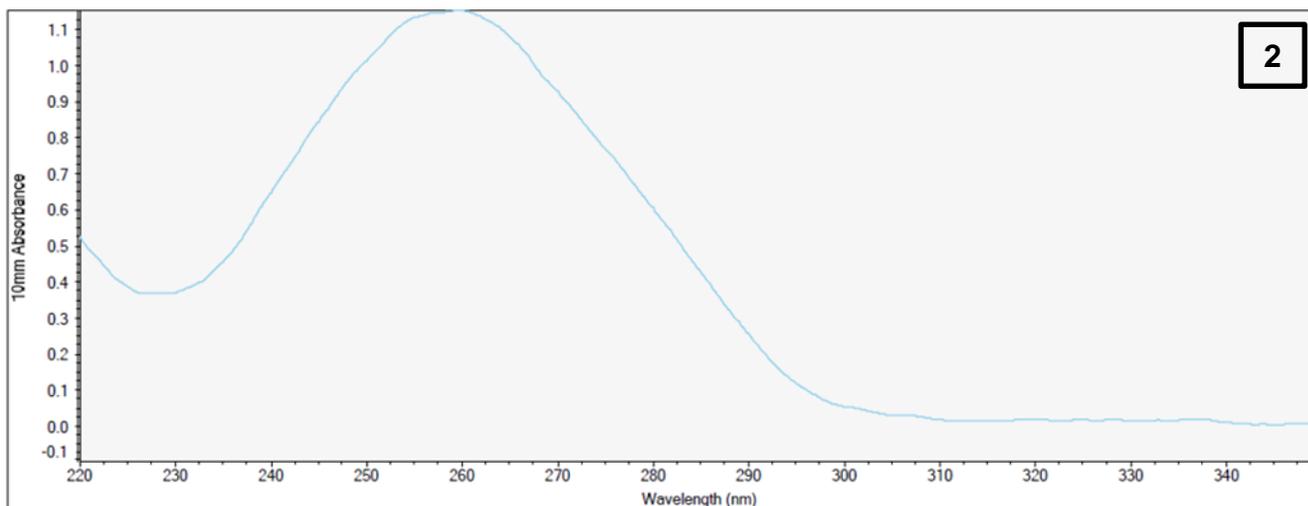
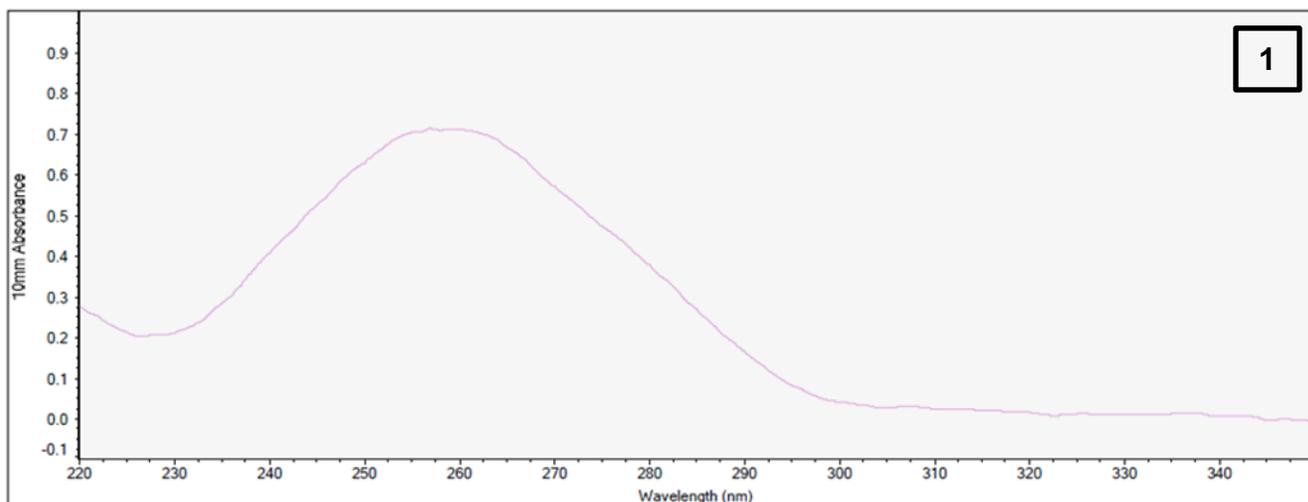
De acuerdo a la Tabla 3 se observa que hubo crecimiento en las placas en medio selectivo con Zeocina™, por lo que en primera instancia se dice que el proceso de transformación de *E. coli* sí se llevó a cabo con los plásmidos recombinantes pGZaLM LF (Fig. 1 panel 1) y pGZaLM α -LA (Fig. 1 panel 2). Como control negativo se utilizaron las cepas de *E. coli* ultracompetente OneShot™Top10 sin agregar el plásmido recombinante correspondiente al proceso de transformación, por lo tanto se esperaba que no hubiera crecimiento ya que las cepas de *E. coli* no contarían con el plásmido pGZaLM que confiere la característica de resistencia al antibiótico Zeocina™ (Fig.1 panel 3). Como control positivo de la transformación se empleó el plásmido pPUC19 contenido en el kit de *E. coli* OneShot™Top10 el cual también mostró transformación en *E. coli* (Fig.1 panel 4). La viabilidad de las cepas ultracompetentes fue verificada en placa sin Zeocina™, al haber crecimiento no selectivo se comprueba que las células ultracompetentes siguen viables (Fig.1 panel 5). Para verificar la funcionalidad del antibiótico se estrió una placa con cepas de *Salmonella* Thompson ATCC 8391 y

Staphylococcus aureus ATCC 89213 no resistentes a Zeocina™, por lo que el resultado fue el esperado al no tener crecimiento en placa (Fig. 1 panel 6).

Al igual que lo mencionan varios autores (Islam *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017) la bacteria *E. coli* resultó ser un buen hospedero procariota para la propagación de plásmidos por contar con las características principales de ser deficiente en endonucleasa A, presentar recombinación deficiente y síntesis constitutiva de desoxirribosa. Las modificaciones hechas al método del CaCl₂/choque térmico descrito por Ausubel (2002) incluyeron, disminuir el tiempo del choque térmico de 2 minutos a 30 segundos, en segundo lugar, se agregó una incubación en hielo posterior al choque térmico por 2 minutos, lo que disminuye el tiempo de exposición celular a alta temperatura (42 °C). La etapa de choque térmico es una etapa crucial en el proceso de transformación, por lo que definir la temperatura y el tiempo de incubación es de vital importancia, y esto a su vez deberá definirse dadas las condiciones particulares de experimentación (Im, 2011). Incluso, en optimizaciones hechas al método para transformar *E. coli* han mostrado que menores tiempos de incubación en la etapa de choque térmico arrojan mejores eficiencias de transformación (Nakata *et al.*, 2008). Finalmente, la etapa de recuperación celular se hizo con medio S. O. C a 150 rpm, en lugar de usar solo medio LB, esto debido a que el primero funciona como osmoprotector al contener iones divalentes, del mismo modo, se encuentra reportado que la agitación ayuda a incrementar la eficiencia de transformación (Im, 2011). Como mencionan algunos autores, dichas 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 *et al.*, 2017; Im, 2011).

8.2. Cuantificación de los plásmidos purificados

A continuación, en la Fig 5 (panel 1-3) se muestran las curvas de la cuantificación de la extracción/purificación de los plásmidos pGZaLM LF y pGZaLM α -LA a escala miniprep y maxiprep:



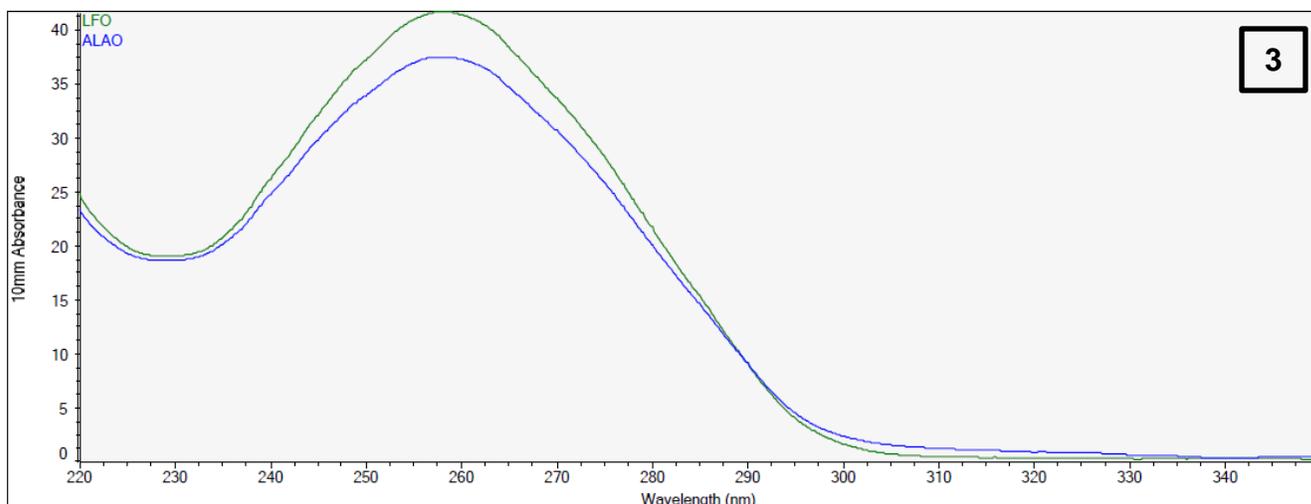


Figura 5. Curvas de cuantificación de los plásmidos recombinantes pGZaLM LF y pGZaLM α -LA obtenidos del Miniprep (1 y 2) y Maxiprep (3 y 4).

De acuerdo con las gráficas del miniprep se tienen concentraciones de 57.4 ng/ μ L para el plásmido pGZaLM LF (Fig. 2 panel 1) y de 36.7 ng/ μ L para el plásmido pGZaLM α -LA (Fig. 2 panel 2). Para las purificaciones por maxiprep se tienen concentraciones de 2,062.9 ng/ μ L para pGZaLM LF (Fig. 2 panel 3) y 1,856.6 ng/ μ L para pGZaLM LF (Fig. 2 panel 3).

La extracción/purificación de los plásmidos llevada a cabo por el método de lisis alcalina permitió obtener concentraciones de 57.4 ng/ μ L para el plásmido que contiene la secuencia de nucleótidos optimizada hLTF y 36.7 ng/ μ L para el plásmido que contiene la secuencia de nucleótidos optimizada hLALBA a escala de miniprep y concentraciones de 2.062 μ g/ μ L y 1.856 μ g/ μ L respectivamente para el maxiprep. Dichas concentraciones son suficientes, ya que la extracción hecha a escala miniprep sirve para verificar la correcta transformación, por lo que se requieren concentraciones de 1 pg a 1 ng. Para la extracción a escala de maxiprep, esta tiene como objetivo proveer de plásmidos para la transformación de *P. pastoris* por electroporación, donde se requieren concentraciones de 1 μ g/ μ l. Para el maxiprep se corrobora que hay puntos clave en el método que son necesarios llevar a cabo para obtener rendimientos máximos, como es el hecho de contar con soluciones buffer de reciente preparación y hacer la elución con amortiguador TE a una temperatura de 65 °C en lugar de usarlo a temperatura

ambiente, dichos puntos ya son mencionados por algunos autores (Ausubel, 2002; Sambrook, 2001).

Para el maxiprep se reafirma que es necesario optimizar el método de extracción, ya que hay puntos clave para obtener rendimientos máximos. Como es el hecho de contar con soluciones buffer de reciente preparación para la extracción/purificación de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina, y hacer la elución con amortiguador TE a una temperatura de 65 °C en lugar de usarlo a temperatura ambiente, dichos puntos ya son mencionados por algunos autores (Sambrook, 2001; Ausubel, 2002).

8.3. Genotipificación de los plásmidos purificados

La genotipificación de los plásmidos por PCR y la digestión con las enzimas de restricción *Xho*I y *Xba*I fueron analizados por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v.

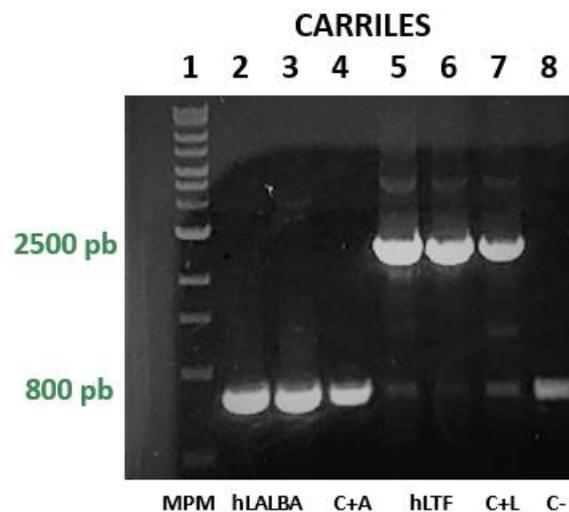


Figura 6. Análisis electroforético de los productos de PCR del Miniprep en gel de agarosa al 1 % p/v. Carriles: MPM: marcador de peso molecular, hLALBA: gen hLALBA, hLTF: gen hLTF, C+A: control+ hLALBA, C+L: control+ hLTF, C-: control negativo.

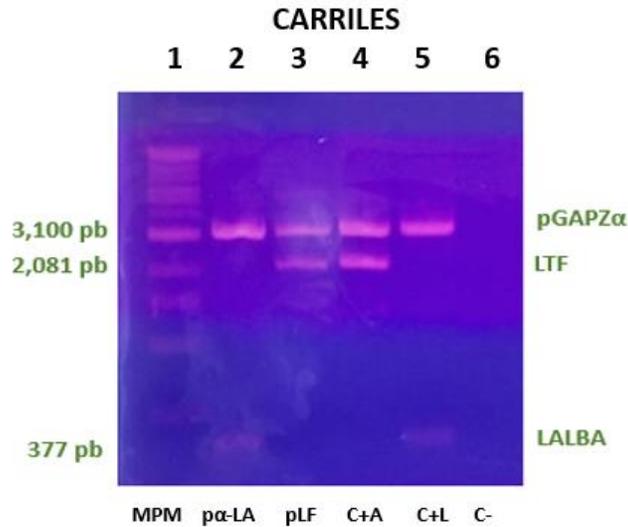


Figura 7. Análisis electroforético de los productos de la digestión doble con las enzimas de restricción *Xho*I y *Xba*I en gel de agarosa al 1 % p/v. MPM: marcador de peso molecular, pα-LA: plásmido purificado pGZaLM α-LA, pLF: plásmido purificado pGZaLM LF, C+A: control+ para pGZaLM α-LA, C+L: control+ para pGZaLM LF, C-: control negativo.

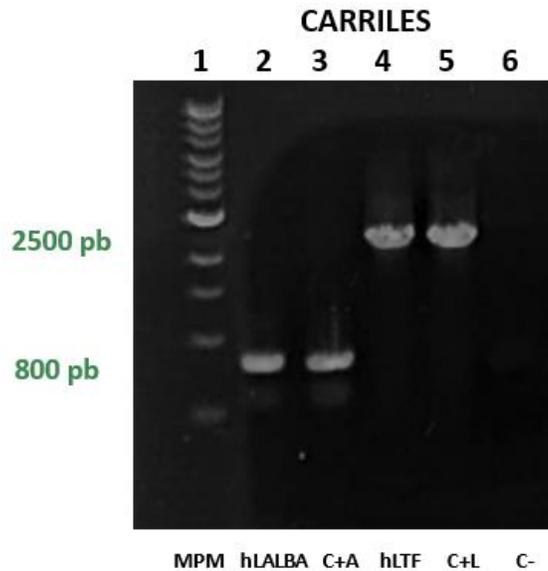


Figura 8. Análisis electroforético de los productos de PCR del Maxiprep en gel de agarosa al 1 % p/v. MPM: marcador de peso molecular, hLALBA: gen hLALBA, hLTF: gen hLTF, C+A: control+ hLALBA, C+L: control+ hLTF, C-: control negativo.

Los geles de electroforesis donde se analizaron los productos de la digestión con las enzimas de restricción *Xho*I y *Xba*I así como los productos de

PCR (Fig. 6) muestran fragmentos correspondientes a los genes que codifican para las proteínas rh α -LA (800 pb) y rhLTF (2,500 pb) respectivamente, los cuales se corresponden con sus respectivos controles positivos. En la Fig. 7 se muestra el gel correspondiente a la digestión con las enzimas de restricción, donde se comparan las muestras con sus respectivos controles positivos y con el marcador de peso molecular. Se ven bandas a los 3100 pb, que corresponden al plásmido PGAPZ α A y bandas a los 2,081 pb y 377 pb para los fragmentos hLTF y hLALBA que codifican a las proteínas hLF y h α -LA respectivamente. Las endonucleasas de restricción generan productos más pequeños porque cortan casi exactamente en los límites de las secuencias de nucleótidos optimizadas hLTF y hLALBA mientras que los oligonucleótidos abarcan secuencias propias del promotor GAP y del factor de secreción α , así como las secuencias codificantes del c-myc y de la cola de polihistidinas. Como controles positivos se emplearon los plásmidos recombinantes pGZaLM originales mandados a sintetizar.

De acuerdo con lo anterior se confirma por dos métodos la correcta transformación de las células de *E. coli* para ambos plásmidos recombinantes. En la Fig. 8 se genotipificaron los plásmidos extraídos por maxiprep, donde también se corrobora que son los plásmidos de interés al compararlos con su respectivo control positivo.

8.4 Transformación de *P. pastoris*

8.4.1. Pruebas de viabilidad y concentración del antibiótico

En la tabla 4 se muestran las distintas concentraciones de Zeocina™ a las cuales se probó la cepa nativa en placa, notándose que la cepa está viable y la concentración de 150 μ g/mL de Zeocina™ no es suficiente para inhibir el desarrollo de *P. pastoris* nativa. En la Fig. 9 se presentan las placas de medio YPD a concentraciones de 150-700 μ g/mL de Zeocina™ y tubos con medio YPD líquido a 150 μ g/mL. Donde se observa que en el medio líquido es suficiente la concentración de 150 μ g/mL (panel F) pero en las placas a concentración de 150 μ g/mL (panel B) se logra identificar desarrollo de la cepa nativa, sobre todo en las orillas de la placa, y en las placas con concentraciones de 300-700 μ g/mL

(paneles C-E) ya no se observa desarrollo, por lo cual, es la concentración a la cual se siguió trabajando para el proceso de transformación y de activación de cepas. Ya que, aunque el fabricante del kit del sistema de expresión reporta que la concentración del antibiótico Zeocina™ debe estar entre 100 y 150 µg/mL en la práctica se encuentra que estas concentraciones no son suficientes para inhibir el desarrollo de *P. pastoris* nativa.

En la literatura se encontró reportado que para la producción de otras proteínas recombinantes como la proteína humana C reactiva donde se emplea *P. pastoris* como sistema de expresión se llegan a utilizar concentraciones desde 200 hasta 500 µg/mL de Zeocina™, para poder realizar la selección de transformantes en placa (Li *et al.*, 2017). Incluso, para la expresión y producción de lactoferrina bovina recombinante en *P. pastoris* se utilizaron 175 mg/mL (Iglesias-Figueroa *et al.* 2016). Lo anterior debido a que la Zeocina™ es un antibiótico que se degrada rápidamente en condiciones de luz o incremento de la temperatura.

Tabla 4. Ensayos de viabilidad y concentración del antibiótico Zeocina™ para la cepa nativa de *P. pastoris*.

Concentración de Zeocina™ (µg/mL)	Desarrollo +/-
Sin Zeocina™	+
150	+
300	-
500	-
700	-

+ positivo, - negativo

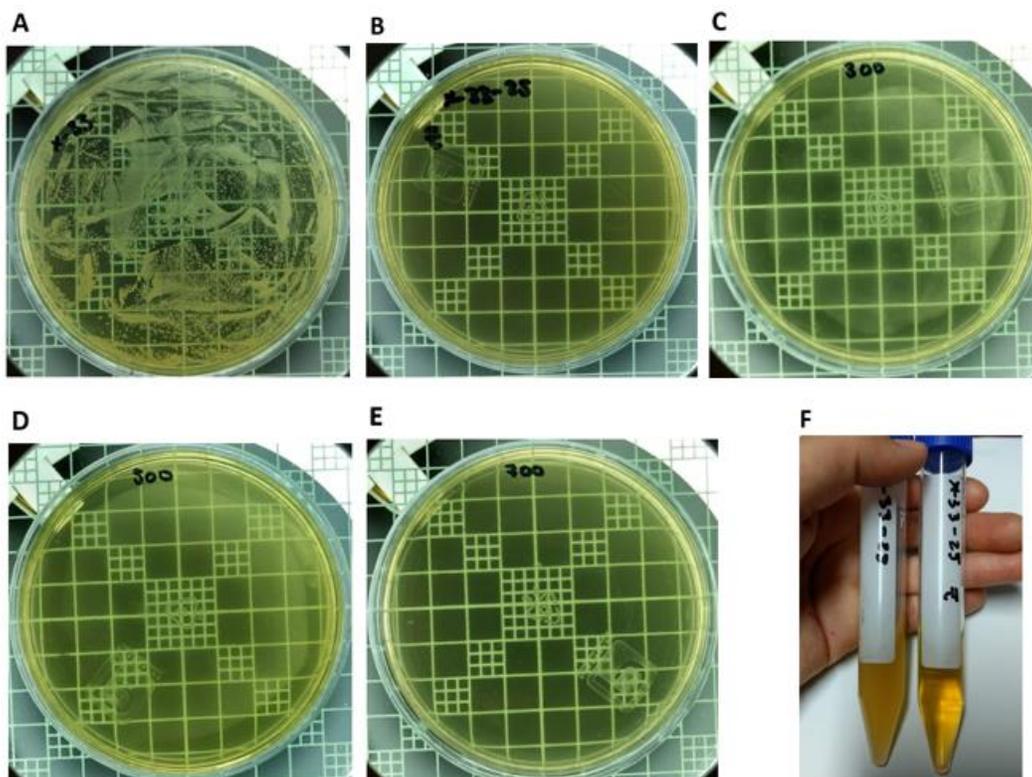


Figura 9. Pruebas de viabilidad y concentración Zeocina™ en placa y tubos con medio YPD. A: sin Zeocina™, B:150 µg/mL, C:300 µg/mL, D:500 µg/mL, E: 700 µg/mL, F: 150 µg/mL.

8.4.2. Digestión de los plásmidos

Previo al proceso de electroporación es necesario linealizar cada uno de los plásmidos, para lo cual se empleó la enzima de restricción *Bsp*HI que corta en una región cercana al promotor GAP. En la Fig. 10 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 diferido y sin digerir respectivamente. Los carriles 4 y 5 corresponden a los plásmidos de α -LA 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 10. Análisis electroforético de los productos de la digestión con la enzima *Bsp*HI en gel de agarosa al 1 % p/v. MPM: marcador de peso molecular, pLFD: plásmido pGZaLM LF digerido, pα-LAD: plásmido pGZaLM α-LA digerido, C- control negativo.

8.4.3. Electroporación

En las Tablas 5 y 6 se muestran los resultados de los conteos en placa de las presuntivas transformantes con las secuencias de nucleótidos optimizadas hLTF y hLALBA, en los distintos volúmenes de inóculo y por duplicado. Así como el control negativo, donde se electroporó empleando agua estéril en lugar de plásmido y un volumen de 25 μ L por placa.

En las Fig. 11 y 12 se muestran las placas de medio YPD con Zeocina™ con las colonias presuntivas transformantes para hLALBA y hLTF respectivamente. En dichas placas las colonias presentan una morfología típica de *P. pastoris* (colonias cremosas y redondeadas), notando que las colonias en las orillas de las cajas son más pequeñas que las colonias del centro de la placa. Las primeras colonias aparecieron a las 48 horas de incubación a 30 °C en el centro de la placa, por lo que a las 72 horas presentaban un mayor tamaño. Esas características se tomaron en consideración para posteriormente hacer la selección de las colonias.

En la literatura se encuentra 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 μL , mientras que para las placas con 100 y 200 μL 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 μL que es donde se presenta el máximo conteo en placa tanto para las cepas de α -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 & 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 extrañas 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 *et al.*, 2005).

Tabla 5. Conteo en placa de las cepas presuntivas transformantes con hLALBA en medio selectivo con Zeocina™ en los cuatro volúmenes de inóculo probados.

Cepa	10 μL	25 μL	100 μL	200 μL
	UFC/placa	UFC/placa	UFC/placa	UFC/placa
α -LA 1	24	18	25	15
α -LA 2	23	41	25	17
Media	24	30	25	16
Control negativo	NA	0	NA	NA
Eficiencia de transformación	1×10^6 UFC/ μg de ADN			

NA: No aplica.

Tabla 6. Conteo en placa de las cepas presuntivas transformantes con hLTF en medio selectivo con Zeocina™ en los cuatro volúmenes de inóculo 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
Eficiencia de transformación	1.02×10^6 UFC/ µg de ADN			

NA: No aplica.

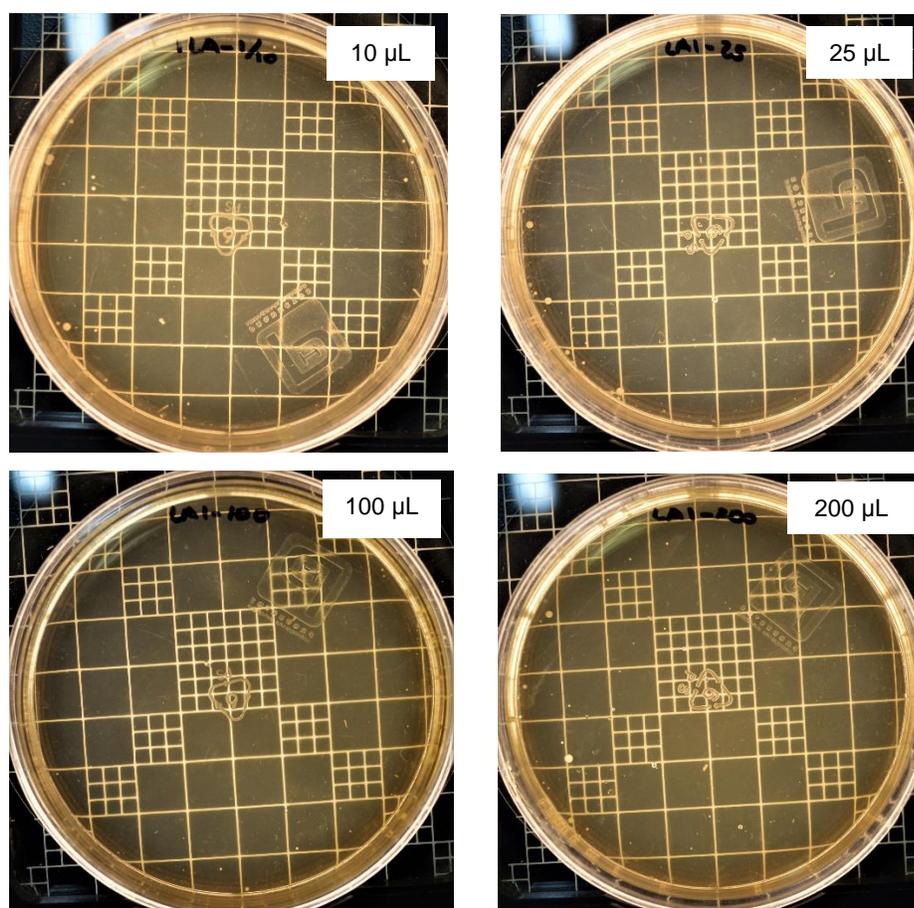


Figura 11. Presuntivas transformantes con hLALBA en placas de medio selectivo con Zeocina™ en los cuatro volúmenes de inóculo probados y después de 72 horas de incubación.

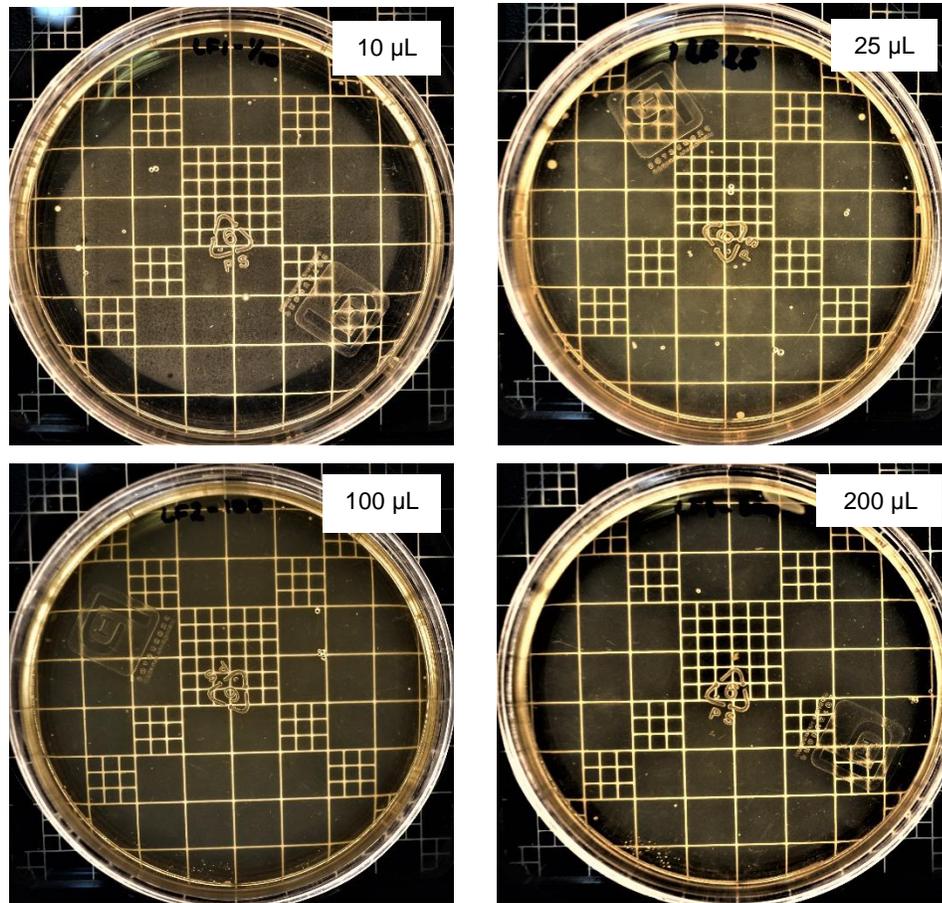


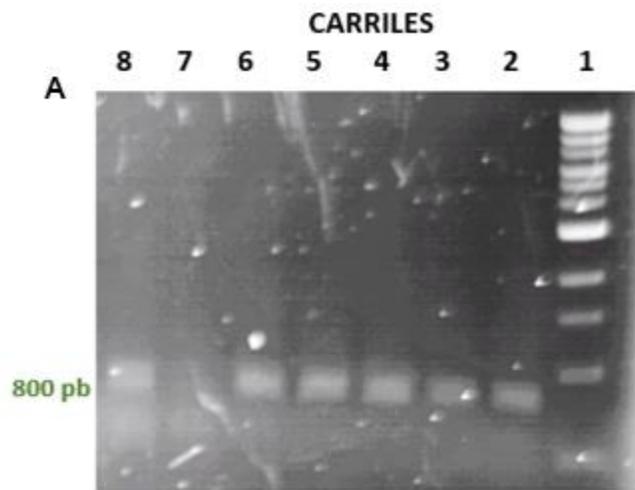
Figura 12. Presuntivas transformantes con hLTF en placas de medio selectivo con Zeocina™ en los cuatro volúmenes de inóculo probados y después de 72 horas de incubación.

8.4.4. Genotipificación

A continuación, se presentan los resultados de la amplificación de la región que comprenden los oligonucleótidos sentido pGAP y antisentido AOX1 generados por PCR de punto final de aquellas colonias seleccionadas de las placas en medio selectivo con Zeocina™ considerando las de mayor tamaño que se encontraran en la parte central de la placa y con morfología característica de *P. pastoris* (cremosas y con bordes regulares). En la Figura 13 se observa que los fragmentos amplificados por PCR se corresponden con el tamaño teórico de 2,500 pb y 800 pb esperados para las secuencias de nucleótidos optimizadas hLALBA (A) y hLTF (B) respectivamente. No obstante, no todas las cepas transgénicas de *P. pastoris*

resistentes a Zeocina™ tienen el genotipo hLTF o hLALBA ya que el ADN genómico de algunas de ellas no genera los productos de PCR correspondientes.

En la Fig. 13 se observa que 6 de 7 cepas probadas están transformadas con el gen hLALBA. (A) y que 8 de 9 cepas probadas están transformadas con el gen hLTF, (B). Para la cuantificación de ADN genómico extraído de las cepas transformadas se observa que la concentración y 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 para las cepas transformadas con el gen hLTF (Tabla 7) y valores desde 3.4 hasta 34.2 ng/μL y pureza entre 1.44 y 2.1 para las cepas transformadas con el gen hLALBA (Tabla 8).



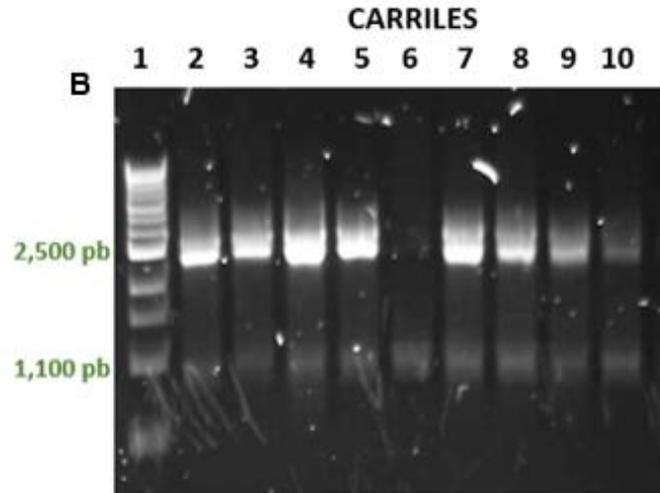


Figura 13. Análisis electroforético en geles de agarosa al 1% de los productos de PCR de las secuencias de nucleótidos que codifican para la proteína rh α -LA y rhLF. Carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2-10: muestras de los productos de PCR para hLALBA (A) y hLTF (B).

Tabla 7. Cuantificación de ADN genómico de colonias transformadas con el gen hLTF.

Colonia	Concentración ng/μL	Relación 260/280
1	14.3	1.86
2	24.4	1.93
3	17	1.96
4	16.4	3.19
5	19.3	1.80
6	37.4	1.81
7	33.5	1.54
8	23.2	1.93

Tabla 8. Cuantificación de ADN genómico de colonias transformadas con el gen hLALBA.

Colonia	Concentración ng/μL	Relación 260/280
1	34.2	1.76
2	28	1.98
3	4.1	2.1
4	3.6	1.98
5	3.4	1.44
6	8.1	2.08

8.5. Producción de las proteínas recombinantes a nivel laboratorio

En la Fig. 14 se observan los cultivos en matraz de cada una de las cepas transgénicas de *P. pastoris*, en donde el volumen de medio de cultivo representó 1/5 del volumen total del matraz, necesario para que haya una adecuada aireación del medio de cultivo. Lo anterior porque *P. pastoris* 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 reportado que para el caso de 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 *et al.*, 2002; Pichia Fermentation Process Guidelines, Invitrogen).

En esta parte también 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 y hLALBA. Las flechas en rojo señalan la presencia de la rhLF (Fig. 15-A) y las flechas en blanco señalan la presencia de la rh α -LA (Fig. 15-B), las cuales presentan una movilidad relativa similar a la de los estándares de bovino, lo anterior 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. Para el caso de la rh α -LA solo las cepas a-LA 1, a-LA 2 y a-LA 6 expresaron la proteína. Tampoco se detectó la presencia de la rh α -LA en el medio de cultivo de las demás cepas transformadas de la levadura.



Figura 14. Cultivos en matraz de las cepas transgénicas de *P. pastoris* que contienen las secuencias optimizadas hLALBA y hLTF.

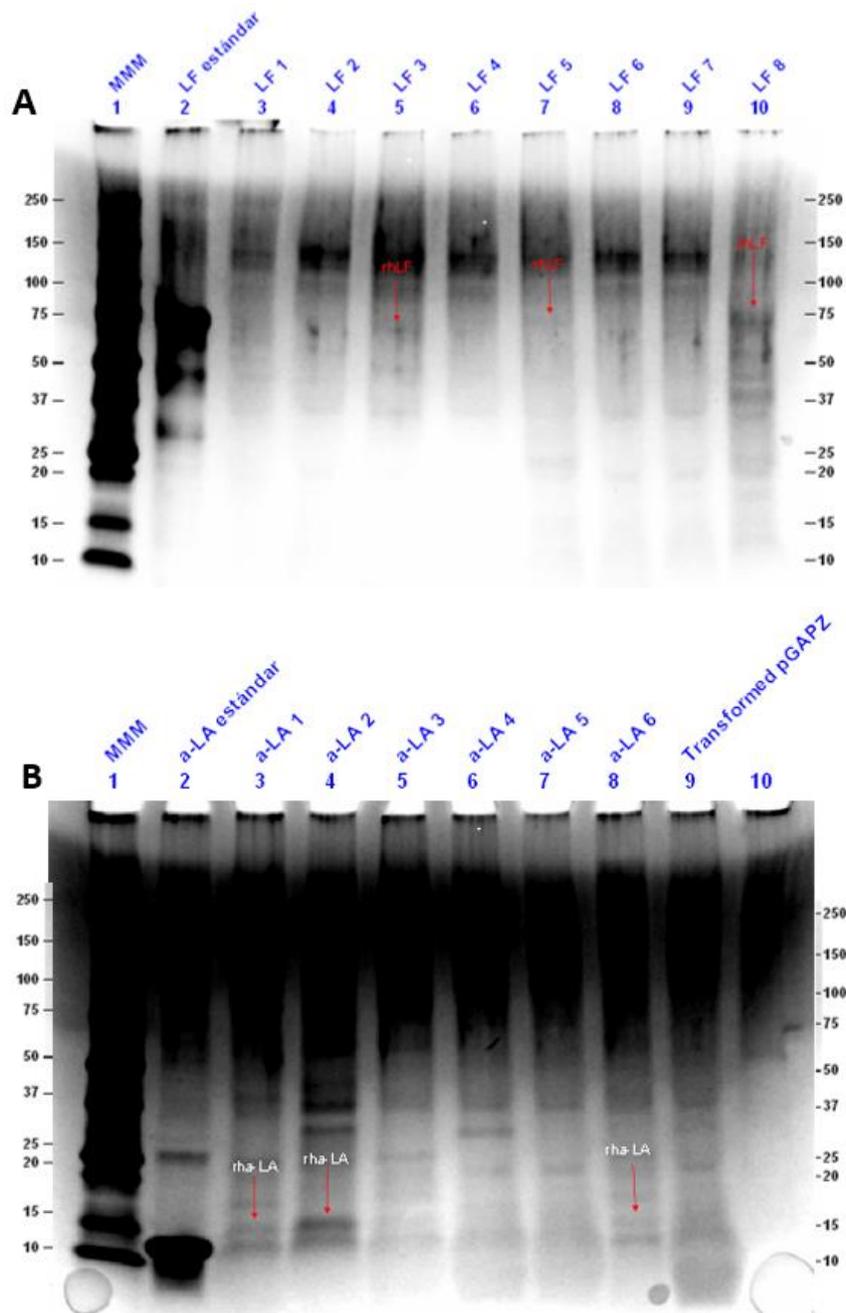


Figura 15. Análisis electroforético del medio de cultivo de las cepas transgénicas de *P. pastoris* transformadas con el gen hALBA (A) y con el gen hLTF (B) cultivadas en 50 mL de caldo YPD con Zeocina™ a 300 µg/mL.

Se han desarrollado varios promotores para la expresión de proteínas heterólogas utilizando el sistema *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 degradación 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 (Choi *et al.*, 2008). Por otro lado, Chen *et al.* (2007) sugieren optimizar el pH y la concentración de Fe³⁺ para la expresión de lactoferrina recombinante.

8.6. Producción de las proteínas recombinantes a nivel piloto

En la Tabla 9 se presentan los resultados iniciales y finales de las condiciones a las cuales se llevó a cabo la fermentación a nivel piloto en cada una de las cepas probadas. Para el caso de la producción de lactoferrina no fue necesario adicionar antiespumante, pero para el caso de la lactoalbúmina sí fue necesario agregar polietilenglicol (PEG) a concentración de 0.9 % p/v en el medio de cultivo para controlar la formación excesiva de espuma (Holmes *et al.*, 2006).

En la Fig. 16 se observa el comportamiento de la temperatura, pH y oxígeno disuelto durante la fermentación de 11 h en biorreactor usando la cepa *P. pastoris* a-LA 1. La temperatura del cultivo inicia en 29 °C y disminuye conforme pasa el tiempo de fermentación hasta terminar en 26 °C a las 11 h.

Tabla 9. Condiciones iniciales y finales de los parámetros pH y oxígeno disuelto (pO₂) en el reactor a las cuales se llevó a cabo la fermentación para cada cepa.

Cepa/Parámetro	pH		pO ₂		Volumen de trabajo	
	Inicial	Final	Inicial (%)	Final (%)	Inicial (L)	Final (L)
LF 5	7.23	5.6	99	82.3	2.0	1.8
LF 8	6.84	5.6	100	85	1.0	0.75
a-LA 1	6.1	4.92	103.7	108.2	2.0	1.85
a-LA 2	5.9	4.9	99.3	36.5	2.0	2.0

Temperatura de 30 °C, agitación de 200 rpm y 11-12 horas de fermentación.

Aunque se estableció una temperatura de 30 °C en el programa controlador del biorreactor, es probable que el volumen de trabajo de 1 L fuera la causa de un control no adecuado de este parámetro. Este efecto posiblemente se debió a que la mantilla de calentamiento no estaba en contacto directo con el medio de fermentación. El valor de pH cuantificado al inicio de la fermentación fue de 6.1, este valor se comportó inversamente proporcional respecto al tiempo de la fermentación hasta llegar a un valor de pH de 4.95 a las 11 h. Se observa un comportamiento similar de disminución proporcional respecto al tiempo en el oxígeno disuelto durante las primeras 7 h de la fermentación alcanzando un valor mínimo de 50 %. Esta caída en el oxígeno disuelto se correlaciona con la demanda creciente de este nutriente por el desarrollo celular. Al inicio de la fermentación el oxígeno disuelto se estableció al 100 % mediante el suministro constante de aire estéril al biorreactor, sin embargo, el modelo del biorreactor sólo permite el censado de oxígeno disuelto. A las 7 h de fermentación se ajustó manualmente el suministro de aire estéril para permitir una mayor cantidad de oxígeno disuelto y que este no tuviera efecto negativo en el crecimiento de la levadura.

En la Fig. 17 se observa el comportamiento de la temperatura, pH y oxígeno disuelto durante 12 h de fermentación en biorreactor usando la cepa *P. pastoris* a-LA 2. La temperatura del cultivo se mantiene constante a 30 °C durante las 12 h de fermentación. El valor de pH inicial fue de 5.7, este valor fue disminuyendo de manera proporcional respecto al tiempo de la fermentación hasta llegar a un valor de pH de 4.7 a las 12 h. El oxígeno disuelto presentó una tendencia similar al pH. El valor de oxígeno disuelto comenzó a disminuir de manera proporcional durante el transcurso del tiempo hasta un valor de 50 % a las 12 h de la fermentación.

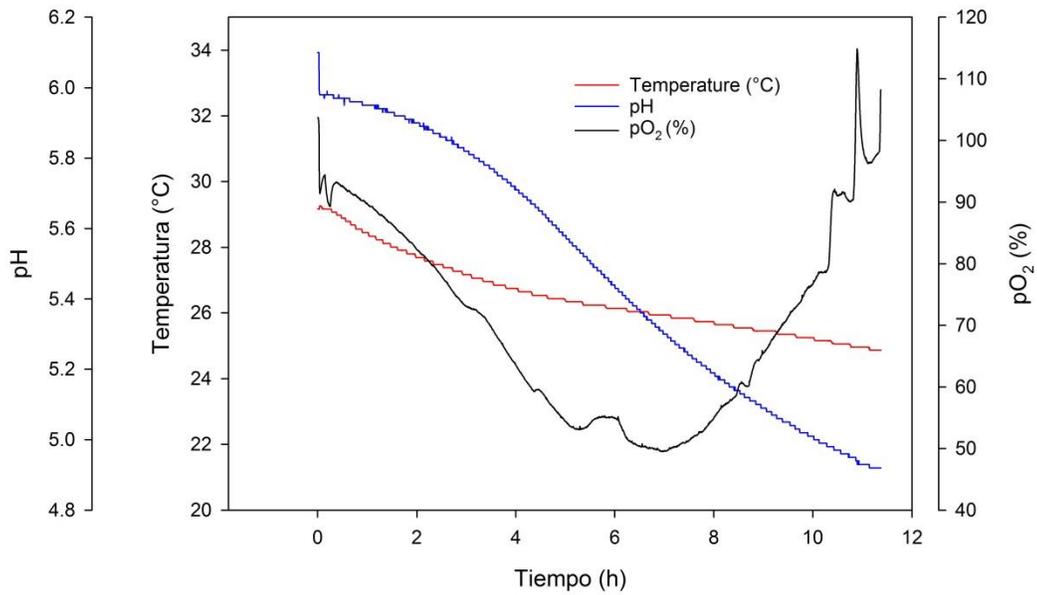


Figura 16. Comportamiento de la temperatura, pH y oxígeno disuelto (pO_2) durante la fermentación de *P. pastoris* α -LA 1 en biorreactor.

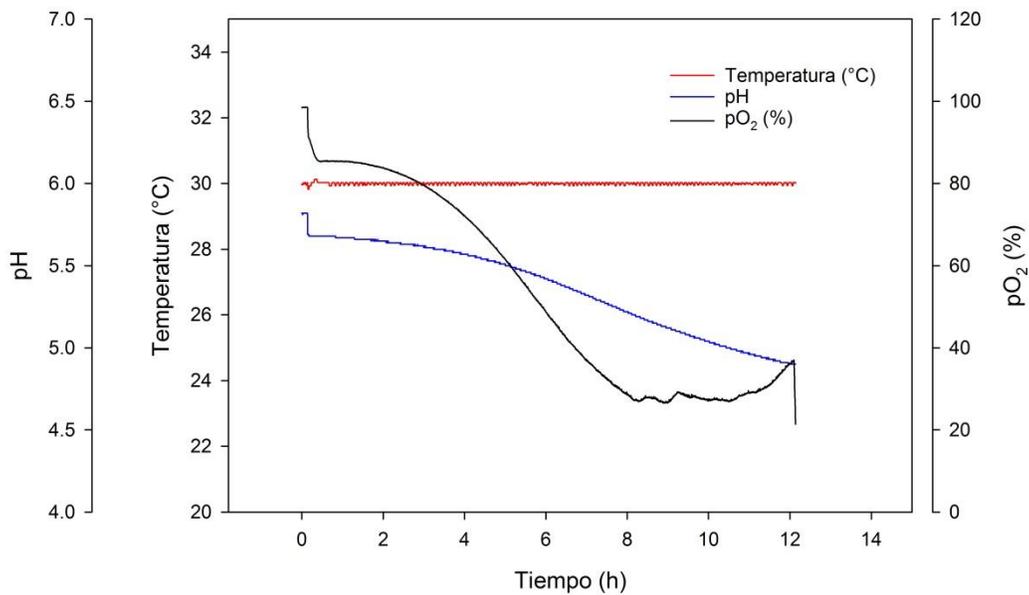


Figura 17. Comportamiento de la temperatura, pH y oxígeno disuelto (pO_2) durante la fermentación de *P. pastoris* α -LA 2 en biorreactor.

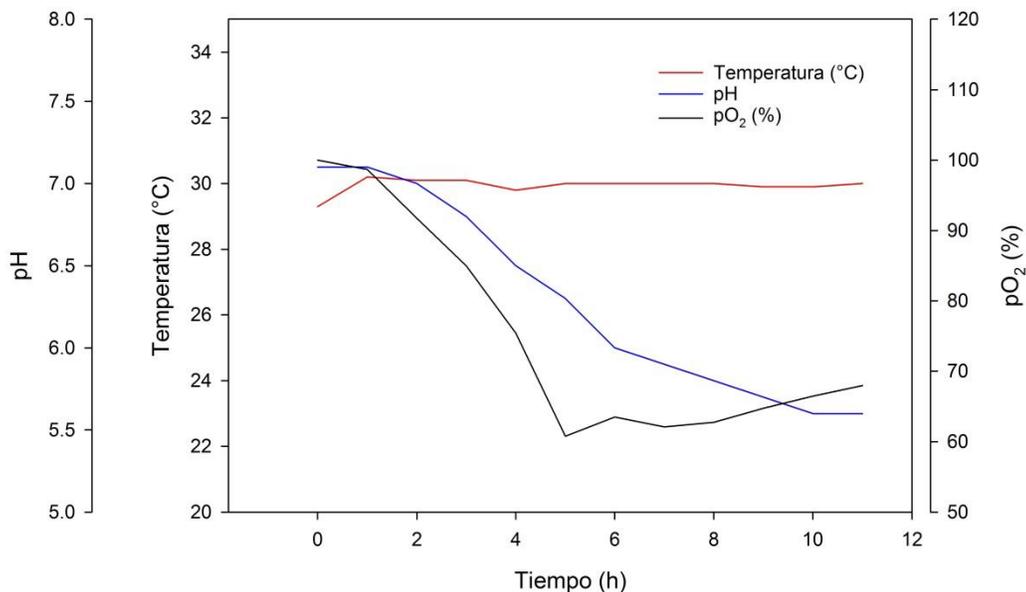


Figura 18. Comportamiento de la temperatura, pH y saturación de oxígeno (pO₂) durante la fermentación de *P. pastoris* LF 5 en biorreactor.

En la Fig. 18 se observa el comportamiento de la temperatura, pH y oxígeno disuelto durante 12 h de fermentación en biorreactor usando la cepa *P. pastoris* LF 5. La temperatura del cultivo se mantiene constante a 30 °C durante las 11 h de fermentación. El valor de pH inició en 7.1 y fue bajando de manera constante hasta alcanzar un valor de 5.6 al finalizar las 11 h de fermentación. El oxígeno disuelto presentó una tendencia similar al pH, presentó una tendencia a disminuir de manera constante las primeras 6 h hasta un valor de 62 %, posteriormente se aumentó el flujo de aire para que se mantuviera por encima de este valor hasta el final de la fermentación.

En la Fig. 19 se observa el comportamiento de la temperatura, pH y oxígeno disuelto durante 11 h de fermentación en biorreactor usando la cepa *P. pastoris* LF 8. La temperatura del cultivo se mantiene constante a 30 °C durante las primeras 5 h de fermentación, posterior a este tiempo la temperatura disminuyó a 25 °C hasta finalizar la fermentación. El valor de pH inició en 6.7 y fue bajando de manera constante hasta alcanzar un valor de 5.6 al finalizar las 11 h de fermentación. El

oxígeno disuelto pasó de la saturación del 100 % hasta un 41 % en las primeras 5 h de la fermentación. A partir de este tiempo, se aumentó el flujo de aire estéril al biorreactor para aumentar el valor de oxígeno disuelto arriba del 80 %. Este aumento en el suministro de aire se relaciona con la disminución de la temperatura en el caldo de cultivo.

Por su parte, Dong and Zhang, 2006 y Wang y col., 2007 concluyen que los factores a considerar para en el diseño de una producción óptima de proteínas recombinantes incluyen: número de copia del gen, sitio y modo de Integración cromosómica del casete de expresión, 5' y 3' región de traducción (UTR) del ARNm, contexto de traducción codón de inicio (AUG), composición A + T de ADNc, bloques de transcripción y traducción, naturaleza de la señal de secreción, actividad proteasa endógena, fisiología de la cepa huésped, medios y condiciones de crecimiento, así como los parámetros de fermentación.

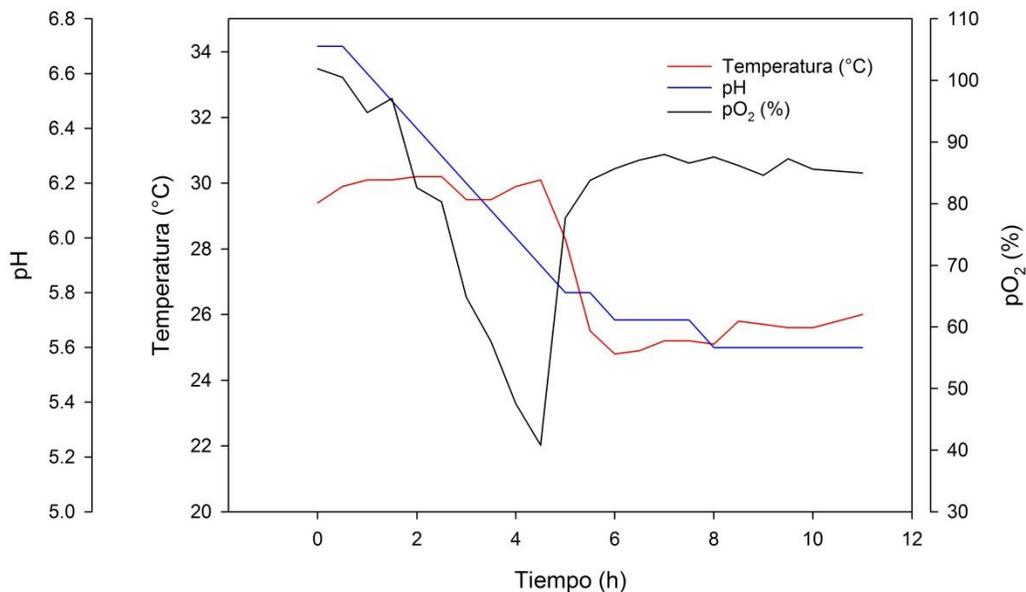


Figura 19. Comportamiento de la temperatura, pH y oxígeno disuelto (pO₂) durante la fermentación de *P. pastoris* LF 8 en biorreactor.

8.6. Cuantificación de PT en medio de cultivo

La cuantificación de PT realizada por el método de Lowry al sobrenadante del medio de cultivo arrojó los resultados reportados en la Tabla 10. Donde se puede ver que las cepas transformadas que contienen las secuencias de nucleótidos optimizadas hLTF y hLALBA produjeron al menos 1.4 veces más PT que la cepa nativa de *P. pastoris*. Las cepas transformadas produjeron entre 7.52 y 7.87 g/L de proteína total a nivel matraz. Además, se observó una producción de al menos 1.2 veces más PT en los cultivos a nivel piloto comparada con los cultivos en matraz. A nivel piloto se observó 1.10 veces más producción de PT en la cepa a-LA 2 comparada con la cepa a-LA 1. Por otro lado, la cepa LF 8 a nivel piloto produjo 1.25 veces más PT comparada con la cepa LF 5. El pH del medio puede tener un impacto en la producción general de la proteína de interés al aumentar la actividad de las proteasas específicas secretadas por la cepa huésped, así como influir en la estabilidad de la proteína (Choi y col., 2007). Por otro lado, Iglesias-Figueroa y col., 2016 discuten que los niveles de acumulación de proteínas heterólogas en la levadura se ven alterados por una variedad de factores genéticos y fisiológicos: el uso del codón, el número de copias del gen y el tipo de promotor, las señales de traducción y el destino final de las proteínas.

Tabla 10. Cuantificación de PT en el sobrenadante del medio de cultivo de las cepas transgénicas de *P. pastoris* a nivel matraz y piloto.

Cepa	Nivel	Abs 595 nm	Concentración de PT (g/L)
a-LA 1	Matraz	0.271	7.87
a-LA 2	Matraz	0.269	7.81
LF 5	Matraz	0.260	7.52
LF 8	Matraz	0.241	7.92
<i>P. pastoris</i>	Matraz	0.189	5.28
a-LA 1	Piloto	0.320	9.42
a-LA 2	Piloto	0.351	10.40
LF 5	Piloto	0.345	10.21
LF 8	Piloto	0.427	12.81

PT: Proteína total

8.7. Purificación de las proteínas recombinantes a nivel piloto

Producto del primer paso se obtuvieron fracciones concentradas del medio de cultivo para poder realizar la purificación. En la Tabla 11 se muestran los volúmenes de sobrenadante del medio de cultivo que se concentraron en los tubos Amicon® para cada una de las cepas.

Tabla 11. Volúmenes de trabajo para la concentración del medio de cultivo obtenido de la fermentación en biorreactor para cada cepa.

Cepa	Volumen permeado (mL)	Volumen retenido (mL)	Volumen total (mL)
LF 5	90	6	96
LF 8	68	9	77
a-LA 1	66.5	8	74.5

a-LA 2	55.5	8.5	64
---------------	------	-----	----

Derivado del proceso de purificación se obtuvieron 750 μ L de cada una de las proteínas recombinantes concentradas. La purificación por cromatografía de afinidad es un método específico para proteínas marcadas con un motivo de polihistidinas, por lo que se esperaba que los rendimientos fueran más bajos a comparación del concentrado de medio de cultivo crudo. En esta sección queda a perspectiva el poder realizar una optimización del proceso de purificación.

8.8. Análisis y cuantificación de las proteínas recombinantes a nivel piloto

En la Tabla 12 se presentan los resultados de la lectura de la absorbancia a 280 nm (Abs_{280}) y el cálculo de la concentración en mg/L de la fracción concentrada de las rHMP. En la Tabla 12 se observa que para las 4 cepas probadas se obtuvieron concentraciones desde 12.40 mg/L hasta 17.53 mg/L, donde la concentración más baja corresponde a la cepa de LF5 y la más alta a la cepa de LF8. Lo anterior es consistente ya que observando la Tabla 11 se ve que para dicha cepa fue necesario pasar un volumen grande de sobrenadante (96 mL) para poder obtener 6 mL de sobrenadante concentrado y utilizarlo para las pruebas de electroforéticas y de cuantificación.

Tabla 12. Lecturas de la absorbancia a 280 nm y cuantificación de la fracción concentrada obtenida de la purificación por cromatografía de afinidad para cada cepa.

Cepa	Abs₂₈₀	Coefficiente de extinción (g/L)	Proteína recombinante purificada (mg/L)
LF 5	1.754	1.104	12.40
LF 8	1.981	1.104	17.53
a-LA 1	1.993	1.384	14.5
a-LA 2	1.997	1.384	16.9

En el análisis electroforético no se lograron detectar las bandas esperadas para ambas rHMP en la fracción purificada concentrada (Fig. 20). Para el caso de la r α -LA se logró observar una banda característica en el concentrado crudo del sobrenadante de la cepa LA 2, pero no así para el caso de la cepa LA 1 (Fig. 10 panel A). En la Fig. 10 panel B se ve de forma muy ligera una banda característica para la rLTF en el carril 3, que es la muestra del concentrado crudo del sobrenadante de la cepa LF8. Dichas bandas se corresponden muy cercanamente con las correspondientes al estándar de h α -LA y hLF respectivamente, pero considerando que las rHMP presentan un peso molecular mayor por la presencia del epítome myc y el motivo de polihistidinas.

Las bandas detectadas no presentan alguna correspondencia con el concentrado crudo de la cepa nativa (Fig. 20 carril 8), pero posteriormente se trabajará con las muestras para realizar una inmunodetección y así identificar de forma específica las bandas correspondientes a las rHMP, para de esta forma confirmar la producción a nivel piloto.

En la literatura se encuentra que en algunos otros estudios se ha llegado a reportar que incluso se pueden tener fracciones purificadas por cromatografía de afinidad y no detectar bandas en el análisis electroforético, como es el caso del presente estudio de investigación. Para el caso de la producción de la proteína C reactiva también se logró obtener una fracción pura de 3 mg/L y a pesar de la concentración no se logró detectar la banda por SDS-PAGE (Li *et al.*, 2017).

Respecto a otros reportes se encuentra que para la producción de una lactoferrina bovina recombinante en *P. pastoris* KM71-H bajo el control del promotor AOX1, por fermentación en lote se obtiene un rendimiento de 3.5 g/L después de un proceso de optimización (Iglesias-Figueroa *et al.*, 2016). Otros autores mencionan que el rendimiento de la lactoferrina de yak en *P. pastoris* es de aproximadamente 40 mg/L (Dong & Zhang, 2006). Lo que sugiere que cultivos de la cepa de *P. pastoris* sin optimización de las condiciones de cultivo presentan

rendimientos del orden de mg/L, mientras que cultivos a los que se les realizó un proceso de optimización a las condiciones de cultivo pueden llegar a producir rendimientos del orden de g/L. Dicho esto, se pretende en futuros estudios realizar una optimización de las condiciones de cultivo para evaluar el incremento en el rendimiento de las rHMP.

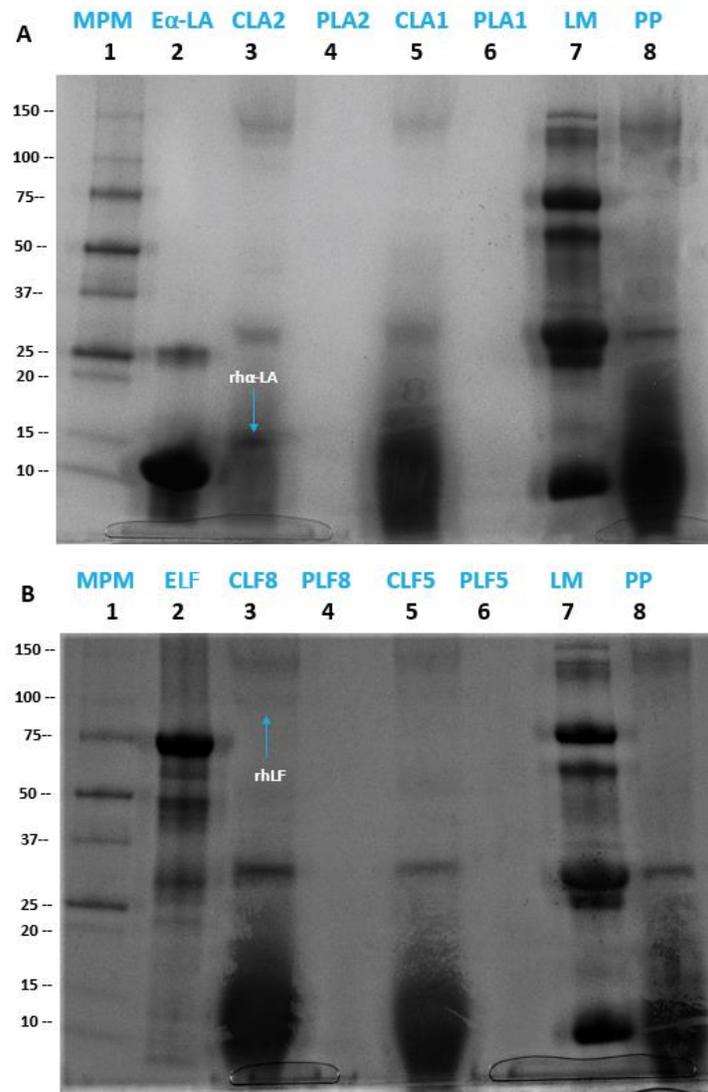


Figura 20. Análisis electroforético de las fracciones concentradas de las cepas transgénicas de *P. pastoris* transformadas con el gen hALBA (A) y con el gen hLTF (B) a nivel piloto. MPM: marcador de peso molecular, E: estándar de las proteínas humanas, C: concentrado crudo, P: concentrado puro, LM: leche materna humana, PP: concentrado crudo *P. pastoris*.

8.9. Determinación de la biomasa a nivel piloto

Dicha determinación se realizó por medio de la estimación del peso seco, considerándose un buen método ya que se trabajó con el cultivo puro de las levaduras transgénicas de *P. pastoris* y proporcionó la determinación directa de la biomasa.

En la Tabla 13 se presentan los resultados correspondientes a la determinación de la biomasa en g/L que se obtuvieron de los cultivos a nivel piloto. Para los estudios de producción de proteínas recombinantes se reporta que un factor importante a considerar es la biomasa, ya que a mayor biomasa habrá más producción de las proteínas recombinantes de interés. En la tabla 13 se observa que la cepa LF 8 desarrolló más biomasa y es la cepa que también muestra la mayor concentración de proteína en la fracción purificada y respecto a la PT. La cepa LF 5 muestra la concentración más baja respecto a la fracción purificada y a la PT en matraz, pero es la segunda cepa con más biomasa. Para las cepas de a-LA se observa que la cepa 1 presentó más biomasa a pesar de un menor tiempo de fermentación, y la cepa 2 con 12 horas de fermentación presentó menos biomasa, pero aun así muestra concentraciones más altas de proteínas en la fracción purificada y respecto a la PT que la cepa 1. Para el caso de la cepa a-LA 2 se tuvo que re-inocular con 5 % del volumen total en reactor, esto debido al bajo desarrollo de la levadura durante la fermentación, por lo que eso podría ser un factor por lo cual se observa menos biomasa.

Debido a lo anterior la productividad volumétrica obtenida por la cepa LF 8 fue la mayor, y la cepa a-LA 2 fue la que presentó menor productividad volumétrica, por lo que se puede deducir que el porcentaje de inóculo inicial también tuvo influencia sobre el desarrollo de la biomasa en el medio de cultivo. Las productividades volumétricas obtenidas son adecuadas, ya que comparando en otros estudios donde se emplea *P. pastoris* para producir otras proteínas recombinantes éstas son menores. Para la producción de interleucina-3 en *P. pastoris* se reporta una productividad volumétrica de 27.31 mg/L/h y obteniendo

475 mg/L de la proteína de interés después de la optimización de las condiciones de cultivo (Dagar & Khasa, 2017).

Tabla 13. Determinación de la biomasa por el método de peso seco en los cultivos de cada cepa fermentados en biorreactor.

Cepa	Peso seco (g)	Biomasa (g/L)	Tiempo de fermentación (h)	Productividad volumétrica (mg/L/h)
LF5	0.1161 ± 0.0010	1.29	12	107.5
LF8	0.2120 ± 0.0002	2.36	12	196.7
a-LA 1	0.0861 ± 0.0008	0.9567	11	87.0
a-LA 2	0.0467 ± 0.0011	0.5111	12	42.6

Los datos representan la media ± la desviación estándar de 3 réplicas.

VIII. CONCLUSIONES

La inserción de los plásmidos recombinantes pGZ α LM por medio del método CaCl₂/choque térmico en la cepa de *E. coli* TOP10 resultó ser adecuada.

Por el método de electroporación se lograron obtener cepas transgénicas de *P. pastoris* que contenían las secuencias de nucleótidos optimizadas hLTF y hLA, con una eficiencia de transformación alta.

Las proteínas rhLF y rh α -LA fueron expresadas en el sistema heterólogo de *P. pastoris* a nivel laboratorio (100 mL), pero la expresión de las proteínas rhLF y rh α -LA a nivel piloto (2 L) debe ser optimizada evaluando el efecto de otros factores tales como la fuente de carbono, pH, tipo de cultivo, entre otros.

Consistentemente, las cepas que presentaron mayor producción de proteína recombinante a nivel matraz y piloto fueron las cepas α -LA 2 y LF 8 para la rh α -LA y rhLF respectivamente. Por lo tanto, dichas cepas se considerarán para futuras pruebas de optimización en biorreactor.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1982. Guidelines on infant nutrition III. Recommendations for infant feeding. *Acta Paediatrica*. 71(S302):1-27.
- AAP. 1997. Breast feeding and the use of human milk. *American Academy of Pediatrics*. 100:1035-1039.
- AAP. 2006. Comité de Nutrición. Manual de nutrición pediátrica (5ta ed). Academia Americana de Pediatría.
- Actor J. K., S. A. Hwang, M. L., and Kruzel. 2009. Lactoferrin as a natural immune modulator. *Curr. Pharm. Des.* 15:1956-1973.
- Akbarzadeh, A., E. Dehnavi, M. Aghaeepoor, and J. Amani. 2015. Optimization of recombinant expression of synthetic bacterial phytase in *Pichia pastoris* using response surface methodology. *Jundishapur J. Microbiol.* 8:1-12.
- Alimentación del lactante y del niño pequeño. Disponible en línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs342/es/> (acceso el 03 de octubre de 2016).
- Armanmehr, S., H. R. Kalhor, and A. Tabarraei. 2016. Production of a soluble and functional recombinant apolipoproteinD in the *Pichia pastoris* expression system. *Protein Expr. Purifi.* 121:157-162.
- 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., and H. Kallel. 2017. Investigating the effect of carbon source on rabies virus glycoprotein production in *Pichia pastoris* by a transcriptomic approach. *MicrobiologyOpen*. 6:(4).
- Baker, E.N., and H. M. Baker. 2006. Lactoferrin molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell Mol. Life Sci.* 62:2531-2539.
- Bhataya, A., C. Schmidt-Dannert, and P. C. Lee. 2009. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* X-33 for lycopene production. *Process Biochem.* 44:(10), 1095-1102.
- Bhatia, J., R. Shamir, and Y. Vandenplas. 2016. Protein in neonatal and infant nutrition: Recent updates. Karger: Nestlé Nutrition Institute. Basel, Switzerland.
- Bruck, W. M., S. L. Kelleher, G. R. Gibson, G. Graverholt, and B. L. Lonnerdal. 2006. The effects of α -lactalbumin and glycomacropeptide on the association of CaCO_2 cells by enteropathogenic *Escherichia coli*,

Salmonella typhimurium and *Shigella flexneri*. FEMS Microbiol. Lett. 259:158-162.

- Cereghino G. L., J. L. Cereghino, C. Ilgen & J. M. Cregg. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Current Opinion in Biotechnology. 13:329–332.
- Chahardooli, M., A. Niazi, F. Aram, and S. M. Sohrabi. 2016. Expression of recombinant Arabian camel lactoferricin-related peptide in *Pichia pastoris* and its antimicrobial identification. J. Sci. Food Agric. 96:569–575.
- 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, G. H., L. J. Yin, I. H. Chiang, and S. T. Jiang. 2007. Expression and purification of goat lactoferrin from *Pichia pastoris* expression system. J. Food Sci. 72:67–71.
- 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.
- Cooper, C. A., E. A. Maga, and J. D. Murray. 2015. Production of human lactoferrin and lysozyme in the milk of transgenic dairy animals: Past, present, and future. Transgenic Res. 24(4):605-614.
- Corkins, K. G., and T. Shurley. 2016. Whats in the Bottle? A review of infant formulas. Nutr. Clin. Pract. 31:(6)723-729.
- Cregg, J. M., and K. A. Rusell. 1998. “Transformation”, in Methods in Molecular Biology, vol. 103, Higgins D. R., and J. M. Cregg (eds). Humana Press, Totowa, NJ. Pp. 27
- Crouch, S. P. M., K. J. Slate, and J. Fletcher. 1992. Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. Blood. 80(1):235-40.
- Davis, A. M., B. J. Harris, E. L. Lien, K. Pramuk, and J. Trabulsi. 2007. α -Lactalbumin-rich infant formula fed to healthy term infants in a multicenter study: Plasma essential amino acids and gastrointestinal tolerance. Eur. J. Clin. Nutr. 62(11):1294-1301.

- Dong, Z. Y., and Y. Z. Zhang. 2006. Molecular cloning and expression of yak (*Bos grunniens*) lactoferrin cDNA in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* 28:1285–1292.
- Drago, S. M. E. 2006. Actividades antibacterianas de la lactoferrina. *Enferm. Infecc. Microbiol.* 26:58-63.
- Egashira, M., T. Takayanagi, M. Moriuchi, and H. Moriuchi. 2007. Does daily intake of bovine lactoferrin-containing products ameliorate rotaviral gastroenteritis? *Acta Paediatr.* 96:1242.
- Eidelman, A. I. 2012. Breastfeeding and the use of human milk: An analysis of the American Academy of Pediatrics 2012 breastfeeding policy statement. *Breastfeeding Med.* 7(5):323-324.
- Farrell, H. M. Jr., R. Jimenez-Flores, G. T. Bleck, E. M. Brown, J. E. Butler, L. K. Creamer, C. L. Hicks, C. M. Hollar, K. F. Ng-Kwai-Hang, and H. E. Swaisgood. 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *J Dairy Sci.* 87:1641-74.
- FDA. Food safety for moms-to-be. US Food and Drug Administration. Disponible en:
<http://www.fda.gov/food/resourcesforyou/healtheducators/ucm081785.htm>. Consultado el 29 de noviembre 2016.
- Ferrer, Lorente, B., and J. Dalmau Serra. 2005. Fórmulas de continuación y fórmulas de crecimiento. *Acta Pediatr. Esp.* 63:471-475.
- Fitzgerald, R. J., and H. Swaisgood. 1989. Bindings of ions and hydrophobia probes to a-lactalbumin and K-casein as determined by analytical affinity chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.* 268: 239-248.
- García-Montoya, I. A., T. S. Cendón, S. Arévalo-Gallegos, and Q. Rascón-Cruz. 2012. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1820(3):226-236.
- Guerrero-Olazarán, M., E. Cab Barrera, L. Galán-Wong, and J. Viader-Salvadó. 2004. Biotecnología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura. In: Cruz Suárez, L. E., D. Ricque Marie, M. G. Nieto López, D. Villarreal, U. Scholz, and M. González. 2004. *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- Gutiérrez, J. P., J. Rivera-Dommarco, T. Shamah-Levy, S. Villalpando-Hernández, A. Franco, L. Cuevas-Nasu, M. Romero-Martínez, and M. Hernández-Ávila. 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX).

- Han, Z.S., Q. W. Li, Z. Y. Zhang, B. Xiao, D. W. Gao, S. Y. Wu, H. W. Zhao, Z. L. Jiang, and J. H. Hu. 2007. High-level expression of human lactoferrin in the milk of goats by using replication-defective adenoviral vectors. *Protein Expr. Purif.* 53:225-231.
- Heine, W. E., P. D. Klein, and P. J. Reeds. 1991. The Importance of [alpha]-Lactalbumin in infant nutrition. *J. Nutr.* 121:277-283.
- Holmes, W., R. Smith and R. Bill. 2006. Evaluation of antifoams in the expression of a recombinant FC fusion protein in shake flask cultures of *Saccharomyces cerevisiae* & *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories* 5(Suppl 1):P30.
- Iglesias-Figueroa, B., N. Valdiviezo-Godina, T. Siqueiros-Cendón, S. Sinagawa-García, S. Arévalo-Gallegos, and Q. Rascón-Cruz. 2016. High-level expression of recombinant bovine lactoferrin in *Pichia pastoris* with antimicrobial activity. *Int. J. Mol. Sci.* 17. doi:10.3390/ijms17060902.
- Im, H. 2011. The inoue method for preparation and transformation of competent e. coli: "ultra competent" cells. *Bio-protocol* Bio.101:e143.
- Infant and Young Child Nutrition. Available online: http://apps.who.int/gb/archive/pdf_files/WHA55/ea5515.pdf (consultado en 15 noviembre 2016).
- 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., L. Chen, S. Jia, L. Chen, and Y. Ma. 2008. High-level expression and production of human lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Dairy Sci. Technol.* 88:173–181.
- Kamau, S. M., S. C. Cheison, W. Chen, X-M. Liu, and R-R. Lu. 2010. Alpha-lactalbumin: Its production technologies and bioactive peptides. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9:197-212.
- 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.
- King, J. C. Jr., G. E. Cummings, N. Guo, L. Trivedi, B. X. Readmond, V. Keane, S. Feigelman, R. and de Waard. 2007. A double-blind, placebo-controlled, pilot study of bovine lactoferrin supplementation in bottle-fed infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 44:245-251.
- Kleinman, R. E., and F. R. Greer. 2014. *Pediatric Nutrition*. 7th ed. American Academy of Pediatrics. Elk Grove Village, IL.

- Koletzko, B. 2006. Infant feeding and later obesity risk: What is the relationship? *Scandinavian J. Food Nutr.* 50(1):30-31.
- Koletzko, B., R. von Kries, R. Closa, J. Escribano, S. Scaglioni, M. Giovannini. 2009. Lower protein in infant formula is associated with lower weight up to age 2: a randomized clinical trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 89:1836-1842.
- Koletzko, B., S. Baker, G. Cleghorn, U. F. Neto, S. Gopalan, O. Hernell, Q. S. Hock, P. Jirapinyo, B. Lönnerdal, P. Pencharz, H. Pzyrembel, J. Ramirez-Mayans, R. Shamir, D. Turck, Y. Yamashiro, and D. Zong-Yi. 2005. Global standard for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 41:584–99.
- Kumari, A., and R. Gupta. 2014. Novel strategy of using methyl esters as slow release methanol source during lipase expression by mut *Pichia pastoris* X33. *PLoS ONE.* 9(8):e104272.
- Labiner-Wolfe, J., S. B. Fein, and K. R. Shealy. 2008. Infant formula-handling education and safety. *Pediatrics.* 122(2):S85-90.
- Layman, D. K. 2003. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. *J. Nutr.* 133:261S-267S.
- Leyra, C. A. (n.d.). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Consultada 8 de octubre 2016, from <http://ensanut.insp.mx/>
- Li, J., W. Zhu, M. Luo, H. Ren, L. Tang, H. Liao, and Y. Wang. 2015. Molecular cloning, expression and purification of lactoferrin from Tibetan sheep mammary gland using a yeast expression system. *Protein Expr. Purif.* 109:35–39.
- Lien, E. L. 2003. Infant formulas with increased concentrations of alpha-lactalbumin. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:1555S-1558S.
- Lien, E. L., A. M. Davis, and A. R. Euler. 2004. Growth and safety in term infants fed reduced-protein formula with added bovine alpha-lactalbumin. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* 38(2):170-176.
- Lönnerdal, B. 1995. Lactoferrin: Molecular structure and biological function. *Annu. Rev. Nutr.* 15(1):93-110.
- Lönnerdal, B. 2003. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:1537S-1543S.
- Lönnerdal, B. 2006. Recombinant human milk proteins. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program.* 58:207-215.
- Lönnerdal, B. 2010. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. *J. Pediatr.* 156(2 Suppl):S26-30.

- Martin, C., P. Ling, and G. Blackburn. 2016. Review of infant feeding: Key features of breast milk and infant formula. *Nutrients*. 8(5):279.
- Martinez, J. A., and M. P. Ballew. 2011. Infant formulas. *Pediatr Rev.* 32(5):179-189.
- 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.
- Newburg, D. S., and W. A. Walker. 2007. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatr. Res.* 61(1):2-8.
- NOM-031-SSA2-1999, para la atención a la salud del niño. México.
- NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
- Nutten, S. 2016. Proteins, peptides and amino acids: Role in infant nutrition. Nestlé Nutrition Institute Workshop Series Protein in Neonatal and Infant Nutrition: Recent Updates, 1-10.
- O'Connor, N. R. 2009. Infant formula. *American Family Physician*. 79(7):565-570. Recuperado de <http://www.aafp.org/afp/20090401/565-s1>
- Oliveira, C., & L. Domingues. 2018. Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins. *App. Microbiol. Biotechnol.* 102: 81-92.
- Öztaş, Yeşim, E. R., N. Özgüneş. 2005. Lactoferrin: a multifunctional protein. *Adv. Mol. Med.* 1:149–154.
- Palomares, L. A., S. Estrada-Mondaca, and O. T. Ramírez. 2004. Production of Recombinant Proteins: Challenges and Solutions. In: Balbás P., A. Lorence (eds). *Recombinant Gene Expression. Methods in Molecular Biology*. vol 267. Humana Press. New Jersey.
- Paramasivam, M., K. Saravanan, K. Uma, S. Sharma, T. P. Singh, and a Srinivasan. 2002. Expression, purification, and characterization of equine lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 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.
- Permyakov, E., S. Permyakov, L. Breydo, E. Redwan, H. Almehdar, and V. Uversky. 2016. Disorder in milk proteins: α -Lactalbumin. Part A. Structural

- properties and conformational behavior. *Curr. Protein Pept. Sci.* 17(999):352-367.
- 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.
- Rachmawati, D., T. Mori, T. Hosaka, F. Takaiwa, E. Inove, and H. Anzai. 2004. Expression and localization of recombinant human lactoferrin in transgenic Javanica rice cv rojolele, *Milk Sci.* 53(2004):247–249.
- Rainard P. 1986. Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitic bacteria. *Vet. Microbial.* 1(1):387-392.
- Robinson, S., and C. Fall. 2012. Infant nutrition and later health: A review of current evidence. *Nutrients.* 4(12):859-874.
- Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY.
- Savino, F., S. Bebeti, S. A. Lignori, M. Sorrenti, D. Cordero, and L. Montezemolo. 2013. Advances on human milk hormones and protection against obesity. *Cell. Mol. Biol.* 59:89-98.
- Shamir, R. 2016. The benefits of breast feeding. Nestlé Nutrition Institute Workshop Series Protein in Neonatal and Infant Nutrition: Recent Updates. 67-76.
- Sherman, M. P., J. Sherman, R. Arcinue, and V. Niklas. 2016. Randomized control trial of human recombinant lactoferrin: A substudy reveals effects on the fecal microbiome of very low birth weight infants. *J. Pediatr.* 173 Suppl:S37-42.
- Shimamura, M., Y. Yamamoto, H. Ashino, T. Oikawa, T. Hazato, H. Tsuda, and M. Ligo. 2004. Bovine lactoferrin inhibits tumor-induced angiogenesis. *Int. J. Cancer* 111:111-116.
- Spier, R. E., and J. B. Griffiths. 1990. *Animal cell biotechnology.* Pp. 15-70. Academic Press. London.
- Stevens, E. E., T. E. Patrick, and R. Pickler. 2009. A history of infant feeding. *J. Perinat. Educ.* 18(2):32-39.
- Suzuki Y. A., V. Lopez, B. Lönnerdal. 2005. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell Mol. Life Sci.* 62:2560-2575.
- Tomita, M., H. Wakabayashi, K. Shin, K. Yamauchi, T. Yaeshima, and K. Iwatsuki. 2009. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie*,91(1):52-57.

- Trabulsi J., R. Capeding, J. Lebumfacil, K. Ramanujam, P. Feng, S. McSweeney, B. Harris, and P. DeRusso. 2011. Effect of an α -lactalbumin-enriched infant formula with lower protein on growth. *Eur. J. Clin. Nutr.* 65:167-174.
- Turck, D. 2007. Later effects of breastfeeding practice: The evidence. *Issues in Complementary Feeding Nestlé Nutrition Workshop Series: Pediatric Program.* 31-42.
- Velonà, T., L. Abbiati, B. Beretta, A. Gaiaschi, U. Flaúto, P. Tagliabue, C. L. Galli, P. Restani. 1999. Protein profiles in breast milk from mothers delivering term and preterm babies. *Pediatr. Res.* 45:658-663.
- Wakabayashi, H., K. Koji Yamauchi, and M. Takase. 2006. Lactoferrin research, technology and applications. *Int. Dairy J.* 16:1241-1251.
- Wang, H., X. Zhao, R. Liu, Q. Wei, and F. Lu. 2008. Heterologous expression of bovine lactoferricin in *Escherichia coli*. 2nd Int. Conf. Bioinforma. Biomed. Eng. iCBBE 2008. 72:395–398.
- Wang, J., P. Yang, B. Tang, X. Sun, R. Zhang, C. Guo, G. Gong, Y. Liu, R. Li, L. Zhang, Y. Dai, and N. Li. 2008. Expression and characterization of bioactive recombinant human α -lactalbumin in the milk of transgenic cloned cows. *J. Dairy Sci.* 91(12):4466-4476.
- Wang, M., S. Jiang, and Y. Wang. 2016. Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*. *Bioengineered* 7(3):155-165.
- Wang, S. H., T. S. Yang, S. M. Lin, M. S. Tsai, S. C. Wu, and S. J. T. Mao. 2002. Expression, characterization, and purification of recombinant porcine lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 25:41–49.
- 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, W. P., M. Ligo, J. Sato, K. Sekine, I. Adachi, and H. Tsuda. 2000. Activation of mucosal intestinal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin. *J. Cancer Res.* 91:1022-1027.
- Yamauchi, K., H. Wakabayashi, K. Shin, and M. Takase. 2006. Bovine lactoferrin: benefits and mechanism of action against infections. *Biochem. Cell Biol.* 84(2006):291-296.
- Yemets, A. I., I. V. Tanasienko, Y. A. Krasylenko, and Y. B. Blume. 2014. Plant-based biopharming of recombinant human lactoferrin. *Cell Biol. Int.* (38):989-1002. *Cell Biol Int.* 38(9):989-1002.

- Yen C. C., C. Y. Lin, K. Y. Chong, T. C. Tsai, C. J. Shen, M. F. Lin, C. Y. Su, H. L. Chen, and C. M. Chen . 2009. Lactoferrin as a natural régime for selective decontamination of the digestive tract: recombinant porcine lactoferrin expressed in the milk of transgenic mice protects neonates from pathogenic challenge in the gastrointestinal tract. *J. Infect. Dis.* 199:590-598.
- Zhang, J., L. Li, Y. Cai, X. Xu, J. Chen, Y. Wu, H. Yu, G. Yu, A. Zhang, J. Chen, G. Cheng. 2008. Expression of active recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats. *Protein Expr. Purif.* 57:127–135.
- Zou. S, S. Guo, I. Kaleem, and C. Li. 2013. Purification, characterization and comparison of *Penicillium purpurogenum* b-gluconidases expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88(7):1913-1919.