

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**“Producción y purificación de una proteína de fase aguda
PigMap recombinante como herramienta de diagnóstico de
Bienestar Animal en cerdos”**

**TESIS
(IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS)**

**Que para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA:
MVZ. CARLOS ALFONSO CASTRO ROCA**

**COMITÉ TUTOR
DIRECTOR
DRA. ADELFA DEL CARMEN GARCÍA CONTRERAS**

**CODIRECTOR
DRA. YASMIN GUADALUPE DE LOERA ORTEGA
ASESOR**

DR. JOSÉ LUIS CERRITEÑO SÁNCHEZ

México, CDMX a 9 de octubre del 2023


**COMISIÓN ACADEMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UAM-XOCHIMILCO**

P R E S E N T E


Por este conducto informamos que el alumno **MVZ. Carlos Alfonso Castro Roca** con número de matrícula **2212801899**, estudiante de la Maestría en Ciencias Agropecuarias, ha entregado el documento correspondiente a la Idónea Comunicación de Resultados del trabajo titulado: **“Producción y purificación de una proteína de fase aguda PigMAP recombinante como herramienta de diagnóstico de Bienestar Animal en cerdos”**, el cuál ha sido revisado por el comité tutor, mismo que consideramos posee la calidad y elementos suficientes para ser evaluado y en su caso aprobado por el jurado de examen de grado que se nombre para tal efecto.

Sin más por el momento, agradecemos la atención que sirvan prestar a la presente.


Comité tutor.



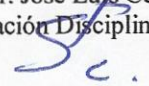
Directora
Dra. Adelfa Del Carmen García Contreras
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco



Codirectora
Dra. Yasmin Guadalupe De Loera Ortega
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.



Asesor
Dr. José Luis Cerriteño Sánchez
Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad. INIFAP



COMITÉ TUTORAL

Director (a): Dra. Adelfa Del Carmen García Contreras

Profesor(a) titular "C" Tiempo Completo. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Co-Director (a): Dra. Yasmin Guadalupe De Loera Ortega

Académico. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-Lic. MVZ. UNAM.

Asesor: Dr. José Luis Cerriteño Sánchez

Investigador titular C. Laboratorio de Epizootiología. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad. INIFAP CENID-SAI sede Palo Alto

Jurado

Director (a): Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira.

Profesor(a) titular “C” Tiempo Completo. Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán, UNAM.

Secretario (a): Dra. Julieta Sandra Cuevas Romero.

Investigador titular C. Laboratorio de Epizootiología. Centro Nacional de
Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad. INIFAP CENID-SAI sede
Palo Alto.

Vocal: Dr. José Luis Cerriteño Sánchez.

Investigador titular C. Laboratorio de Epizootiología. Centro Nacional de
Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad. INIFAP CENID-SAI sede
Palo Alto.

AGRADECIMIENTO INSTITUCIONALES

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco y al programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias por permitirme realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto. No. CVU: 1143807.

Al CENID-SAI INIFAP, institución de enorme calidad, que me brindo todo el apoyo durante mi estancia. Un agradecimiento especial al laboratorio de Epizootiología por la enseñanzas, amistades y confianza otorgada en mí. Agradezco de la misma forma al LABIMA-GA, UAM-X. por la dirección, apoyo y confianza que se me brindo desde el inicio del proyecto.

A mi codirectora de tesis, la Dra. Yasmin Guadalupe De Loera Ortega por haber confiado en mí, por su apoyo incondicional y amistad. Agradezco su paciencia, dedicación y guía durante el desarrollo de este proyecto.

A mi directora de tesis, la Dra. Adelfa Del Carmen García Contreras por su confianza y recibirme con los brazos abiertos en este equipo de trabajo. Por su asesoría, consejos y palabras que guardo con mucha estima.

A mi asesor de tesis, el Dr. José Luis Cerriteño Sánchez quien fue fundamental para la realización de este trabajo, agradezco la ayuda, apoyo, enseñanzas y confianza otorgada. Por los gratos momentos vividos en el laboratorio.

A la Dra. Julieta Sandra Cuevas Romero por su guía, confianza y consejos que me brindo en mi estadía en el laboratorio de Epizootiología. Al Dr. Eduardo García, al M. en B.E. Bryan García y al Dr. Francisco Castañeda por su amistad, apoyo y guía.

DEDICATORIA

A mi familia.

Mi papá Juan.

Mis tías Mari, Liz, Ana y Martha.

Arturo, Cony y Jesús.

Por su apoyo incondicional, las palabras no son suficientes para expresar el agradecimiento por estar a mi lado y apoyarme en cada etapa de mi vida.

A mis mejores amigos Gustavo, Carlos y Nicole por su enorme amistad, apoyo y palabras de aliento.

Índice	
Resumen	iv
Abstract	vi
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1. Bienestar Animal	2
2.1.1. Bienestar animal y su relación con la producción animal	2
2.1.2. Biomarcadores de bienestar animal en cerdos	4
2.2. Proteínas	6
2.2.1. Generalidades	7
2.3. Proteínas de fase aguda	9
2.3.1. Generalidades de la fase aguda	10
2.3.2. Características fisiológicas	10
2.4. Proteína PigMap (ITIH4)	11
2.4.1. Características bioquímicas de PigMAP	12
2.4.2. Características fisiológicas	13
2.4.3. Uso de PigMap en la evaluación de bienestar animal	13
2.5. Proteínas Recombinantes	14
2.5.1. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes	15
2.5.1.1. Sistemas bacterianos: <i>Escherichia coli</i>	17
2.5.2. Vectores plasmídicos y de expresión	17
2.5.2.1. Vector plasmídico pJET 1.2 Blunt	18
2.5.2.2. Vector de expresión pET SUMO	19
2.6. Purificación de proteínas recombinantes	20
2.6.1. Cromatografía como herramienta de purificación de biomoléculas	22
2.6.1.1. Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC)	23
3. Planteamiento del Problema	24
4. Objetivos	25
4.1. Objetivo General	25
4.2. Objetivos específicos	25
5. Metodología	26
5.1. Estudio bioquímico de la proteína PigMAP	26

5.2.	Amplificación de los genes y subclonación al vector de expresión	26
pETSUMO		
5.3.	Preparación y transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .	29
5.4.	Preparación de precultivos.	30
5.5.	Ensayo de inducción.	31
5.6.	Análisis de proteínas de proteínas en SDS-PAGE y Western blot.	32
5.7.	Sobreproducción en grandes volúmenes	33
5.8.	Extracción y solubilización de cuerpos de inclusión	33
5.9.	Purificación mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos	34
(IMAC)		
5.10.	Cuantificación de proteína purificada.	34
5.11.	Evaluación de la antigenicidad de la proteína rPigMAP mediante	
inmunización de ratones		35
5.12.	Estandarización de la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA	
indirecto).		36
6.	Resultados y discusión	37
6.1.	Estudio bioquímico de la proteína PigMAP.	37
6.2.	Amplificación de PigMAP N-Terminal y C-Terminal a partir del vector	
de resguardo		39
6.3.	Subclonación de los genes de interés en el vector pETSUMO.	41
6.3.1.	Transformación en cepa de expresión BL21.	47
6.4.	Análisis de formación de cuerpos de inclusión	52
6.5.	Purificación de la proteína recombinante	55
6.6.	Cuantificación de proteína por Bradford	56
6.7.	Antigenicidad de la proteína rPIG-MAP	57
7.	Conclusiones	63
8.	Referencias	64
9.	Anexos	78
Anexo A.	índices complementarios	78
Anexo B	Abreviario	80
Anexo C.		82
Anexo D.	Actividades extras realizadas por el sustentante.	83

Resumen

Las proteínas de fase aguda (PFA) se pueden definir como proteínas plasmáticas secretadas en el hígado como respuesta de fase aguda, debido a infecciones, inflamación, daño tisular u otros factores inductores de estrés (O'Reilly et al., 2018). La respuesta de fase aguda se caracteriza por una serie de diferentes efectos sistémicos, actividades metabólicas y alteraciones en una amplia variedad de procesos bioquímicos.

La proteína PigMAP es una glicoproteína de fase aguda, la cual es secretada por los cerdos durante un proceso de estrés, daño tisular o bien por infección. Su función biológica aún es desconocida, sin embargo, se ha determinado que tiene un potencial importante como biomarcador de estrés en cerdos, llegando a elevarse de diez a veinte veces su concentración basal en torrente sanguíneo durante procesos de estrés en cerdos. Con esto PigMAP se convierte en una proteína para tener en cuenta para investigaciones que lleve a entender mejor a esta biomolécula y con ello poder tener un mejor panorama en su interacción con patógenos o en procesos fisiológicos de los cerdos (Tóthová et al., 2019; Gulhar et al., 2021). Es por ello el objetivo de este trabajo el producir la proteína PigMAP con base en un sistema de expresión recombinante (*E. coli*) y su posterior caracterización inmunogénica para su utilización como una herramienta de diagnóstico de bienestar animal.

Se realizó la predicción del peso molecular y la estructura terciaria de PigMAP (número de acceso: 7VFRB5X3016) obteniéndose mediante el software PyMol y DNASTar, (DNASTAR), la hidrofobicidad mediante el algoritmo de Kyte-Doolittle, las regiones antigénicas se predijeron mediante el algoritmo de Jameson-Wolf y las regiones transmembranales con el servidor TMHMM Server v. 2.0. Se diseñaron oligos específicos para recuperar los genes correspondientes al N- y C-terminal de PigMAP, estos contenían los epítomos más inmunogénicos y mejores candidatos para clonación y expresión de manera recombinante. Fueron amplificados a partir de cDNA de un bazo de cerdo clínicamente sano y fueron clonados en el vector de resguardo pJET1.2/blunt para su mantenimiento en el laboratorio. La porción que corresponde al N-terminal fue clonado en el vector de resguardo pJET1.2/blunt. A partir de este vector se amplificó y se realizó la ligación al vector de expresión pET SUMO y se efectuó la transformación en células competentes de *E. coli*. para su caracterización por PCR.

Se transformó la cepa de *E. coli* BL21(DE3) para su inducción por medio de IPTG y su consecuente expresión de la proteína de interés. Finalmente se realizó un SDS-PAGE y Western Blot para su detección en un peso molecular esperado de 37 kDa. La purificación de la proteína fue realizada por medio de cromatografía de afinidad IMAC, detectándose por medio de un SDS-PAGE y Western Blot. La proteína purificada se utilizó como antígeno para inocular ratones de 21 días de la cepa CF-1 divididos de forma aleatoria en tres grupos: grupo inoculado solo con la proteína; otro con la proteína más un adyuvante y el tercer grupo inmunizado por con solución PBS, realizando dos inmunizaciones en día 0 y 14. Se tomaron muestras de suero sanguíneo y se realizó el estudio de inmunogenicidad de dichos sueros por medio de la prueba ELISA. El análisis estadístico se realizó por medio del paquete estadístico NCSS (NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA) y la construcción de los gráficos por medio del programa SygmaPlot 12.5. Mostrando como resultado una respuesta humoral específica inducida por la proteína con una diferencia estadística entre los grupos evaluados.

Palabras clave: Proteína recombinante, ITIH4, Proteínas de fase aguda, bienestar animal

Abstract

Acute phase proteins (PFAs) can be defined as plasma proteins secreted in the liver as an acute phase response to infections, inflammation, tissue damage, or other stress-inducing factors (O'Reilly et al., 2018). The acute-phase response is characterized by several systemic effects, metabolic activities, and alterations in a wide variety of biochemical processes.

PigMAP is an acute phase glycoprotein secreted by pigs during stress, tissue damage, or infection. Its biological function is still unknown; however, it has been determined that it has important potential as a biomarker of stress in pigs, reaching ten to 20 times its basal concentration in the bloodstream during stress processes in pigs. With PigMAP becoming a protein to consider for research that leads to a better understanding of this biomolecule and thus to a better picture of its interaction with pathogens or in the physiological processes of pigs (Tóthová et al., 2019; Gulhar et al., 2021). Therefore, the aim of this work was to produce PigMAP based on a recombinant expression system (*E. coli*) and its subsequent immunogenic characterization for use as a diagnostic tool for animal welfare.

The prediction of the molecular weight and tertiary structure of PigMAP (access number:7VFRB5X3016) was performed using PyMol and DNASTAR software (DNASTAR), hydrophobicity was predicted using the Kyte-Doolittle algorithm, and antigenic regions were predicted using the algorithm from Jameson-Wolf and transmembrane regions with the TMHMM Server v. 2.0. Specific oligos were designed to recover genes corresponding to the N- and C-termini of PigMAP, which contained the most immunogenic epitopes and the best candidates for cloning and expression in the recombinant system. They were amplified from the cDNA of a clinically healthy pig spleen and cloned into the pJET1.2/blunt stock vector for laboratory maintenance. The portion corresponding to the N-terminus was cloned into the pJET1.2/blunt backup vector. This vector was amplified, ligated into the pET SUMO expression vector, and transformed into competent *E. coli* cells. was used for characterization by PCR.

E. coli strain BL21(DE3) was transformed for its induction by means of IPTG and its consequent expression of the protein of interest. Finally, SDS-PAGE and western blotting were performed for detection at the expected molecular weight of 37 kDa. Protein purification was carried out using IMAC affinity chromatography, which was detected by SDS-PAGE and western

blotting. The purified protein was used as an antigen to inoculate 21-day-old mice of the CF-1 strain, randomly divided into three groups: one inoculated only with the protein, the other with the protein plus an adjuvant, and the third group immunized with PBS solution, carrying out two immunizations on days 0 and 14. Blood serum samples were collected, and the immunogenicity study of the sera was carried out by ELISA. Statistical analyses were performed using the NCSS statistical package (NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA) and the construction of graphs using the SygmaPlot 12.5 program. Showing, as a result, A specific humoral response was induced by the protein, with a statistical difference between the groups evaluated.

Keywords: Recombinant protein, ITIH4, acute-phase proteins, animal welfare

1. Introducción

Las proteínas de fase aguda (PFA) son proteínas plasmáticas sintetizadas mayoritariamente por el hígado, cuya concentración se altera en respuesta principalmente a procesos inflamatorios, infecciones, traumas y estrés (Alava *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2003; Sorensen *et al.*, 2006; Pallarés *et al.*, 2008; Eckersall y Bell, 2010; Saco, 2013; Pomorska-Mól *et al.*, 2013; Tóthová *et al.*, 2019). Los cerdos que son criados en sistemas de producción intensivos hacen frente a lapsos intermitentes de estrés, lo cual afecta su bienestar, teniendo una repercusión en la calidad del producto final (Damian *et al.*, 2012; Mota *et al.*, 2014; Betancur y Sierra, 2017; Bottegal, 2018).

Durante las últimas décadas se ha generado información que ha permitido contar con diferentes metodologías para cuantificar y evaluar el bienestar de los animales, encontrando métodos de observación directa para evaluar el comportamiento, utilizando sistemas de calificación; por otra parte, se puede recurrir a la utilización de biomarcadores, los cuales reflejan la fisiopatología de la respuesta al estrés (Te Pas *et al.*, 2011; Martínez-Miro *et al.*, 2016), ya que identifican los metabolitos que se liberan en el organismo. Un ejemplo de estos biomarcadores son las PFA (Eckersall y Bell, 2010; Saco, 2013; Gondek *et al.*, 2020). PigMap es una PFA producida por los cerdos, la cual es considerada como un indicador de un proceso fisiológico alterado, con presencia de posibles estados patológicos, o de estrés, producto de un manejo (mezcla de animales, transporte, procesos de vacunación) o por el cambio de instalaciones (Piñeiro *et al.*, 2009).

El área de la biotecnología ha presentado un avance durante las últimas décadas, y este avance se ha visto reflejado en la rama de la producción de proteínas heterólogas. Se han desarrollado diversos sistemas de expresión y escalamiento de procesos que han podido contribuir en generar proteínas de mejor calidad; reduciendo costos y llevando a producirlas en mayor cantidad. Con ello la demanda de biomoléculas heterólogas en diversos campos se ha podido cubrir desde el campo médico hasta el campo pecuario, utilizando estas proteínas de forma terapéutica, así como de diagnóstico, ayudando a generar investigaciones y nuevos tratamientos en estas áreas (Young *et al.*, 2011; Gopal y Kumar, 2013; Alvarado-Madrigal, 2019; Cerriteño 2020). Es por ello el objetivo de este trabajo el producir la proteína PigMAP con base en un sistema de expresión recombinante (*E. coli*) y su posterior caracterización inmunogénica para su utilización como una herramienta de diagnóstico de bienestar animal.

2. Marco teórico

2.1. Bienestar Animal

El bienestar animal se puede denominar como el sinónimo de buen manejo en los animales. El desarrollo de técnicas, manejo, instalaciones y diagnóstico para determinar que los animales tienen bienestar ha ido avanzando a nivel mundial, ayudando a separar lo científico o netamente biológico, de los juicios morales (Yáñez *et al.*, 2014; Jensen, 2018). El término de bienestar animal se designa como el estado físico y mental de un animal en relación con las condiciones en las que vive y muere (OIE, 2019). Este se logra al cumplir condiciones en las que se satisfacen las necesidades tanto físicas como de comportamiento en los animales; con ello garantizando que las condiciones de alojamiento, nutrición, reproducción y de sanidad son adecuadas (Jar, 2014; OIE, 2019; Narayan *et al.*, 2021).

Para lograr estos objetivos, se puede aplicar el modelo de “cinco dominios del bienestar animal”. Este modelo, incluye los dominios de nutrición, salud, medio ambiente, comportamiento y estados mentales, y permite evaluar el estado de bienestar animal de forma integrada.

Se logra al utilizar una serie de implicaciones prácticas para evaluar el estado de bienestar de un animal utilizando este enfoque. Al observar cómo un problema la relación humano-animal y su influencia en uno o más de los "cinco dominios del bienestar animal". Por ejemplo, cuando el manejo de los animales se realiza de forma agresiva, situación que puede caracterizarse como un desafío ambiental (dominio ambiental), se espera un aumento en la reactividad de los animales (promoviendo un cambio en el dominio de comportamiento), Con ello se genera una dificultad en el manejo de los animales, llevando a un desafío ambiental. Esta situación se traduce invariablemente en un mayor estrés y, dependiendo de la intensidad de este desafío, existe un mayor riesgo de que los animales resulten heridos, poniendo en riesgo su salud (dominio salud) (Paranhos y Ceballos, 2021).

2.1.1. Bienestar animal y su relación con la producción animal

Las prácticas que promueven un bienestar a los animales no deberían ser vistas como un obstáculo, o como una carga financiera en el proceso de producción, ya que están orientadas a eliminar pérdidas y reducir el riesgo de accidentes del ganado, para obtener beneficios como menor

morbilidad y gasto en medicamentos, una menor mortandad, mejor ganancia de peso en los animales, y una reducción de los días a mercado; animales con pesos más homogéneos, menor inversión y mantenimiento de instalaciones (**Bustos, 2018; COMECARNE, 2021; Narayan *et al.*, 2021**).

Si bien el manejo y técnicas para proveer de bienestar a los animales tuvieron un origen ético (**Gómez, 2019**), hoy en día su aplicación y adopción sistematizada ha generado un aumento en las ganancias económicas. Actualmente la sociedad ha observado con gentileza las acciones que los propietarios y técnicos han realizado, desencadenando una evaluación social positiva y con ello contribuyendo tanto a nivel cultural como religioso un efecto promisorio para la porcicultura (**Hernández, 2016**).

La producción animal en diversas regiones geográficas representa los ingresos totales de familias y comunidades, así como de fuentes de empleo en grandes unidades de producción. Es por esto, que esta parte económica depende de los valores de productividad y de la salud de los animales criados para este fin. Por lo tanto, el bienestar animal está ligado a la economía, ya que grandes sectores a nivel mundial dependen directa o indirectamente de esta industria (**McInerney, 2004; FAO, 2009**). Comprobándose que animales manejados de forma inadecuada presentan una ganancia de peso menor a lo esperado, con ello teniendo repercutiendo en la calidad de la carne. De la misma forma, los daños que reciben los animales durante el transporte repercuten de forma negativa en las canales dando como resultado pérdidas económicas para los productores (**de Aluja, 2011; Hernández, 2016**).

Es importante aclarar que, en materia de bienestar animal, no existe una ley la cual aplique en todo el territorio nacional, no obstante, durante los últimos años se han presentado diversas iniciativas las cuales han quedado en estatus de pendiente en la cámara de diputados y senadores. Es, por tanto, imperativo el contar con una ley en materia de bienestar animal, para mejorar la producción animal, salud y conservación, favorece la actividad productiva y de crianza en animales. Además, fomenta la tenencia responsable de animales de compañía y el favorecimiento de la conservación de especies, mejora la calidad de los productos y subproductos de origen pecuario e impulsa la sostenibilidad bioeconómica en los sistemas de producción (**Arvizú, 2018; COMECARNE, 2021**).

2.1.2. Biomarcadores de bienestar animal en cerdos

El término biomarcador, es un acrónimo de “marcador biológico” y se refiere a una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos y como respuestas farmacológicas (Strimbu y Tavel, 2010). Esto a partir de la detección de moléculas a través de secreciones, o directamente en el plasma sanguíneo. Siendo estas biomoléculas de cualquier naturaleza como: ARN, proteínas, metabolitos o puede constar de un perfil de varias moléculas. Con frecuencia el nivel del biomarcador se asocia con aspectos cuantitativos del rasgo (Martínez-Miró *et al.*, 2011; Te Pas *et al.*, 2011).

En resumen, estos tienen como función el identificar aquellas moléculas que elabora y libera el organismo, un ejemplo de estos son las Proteínas de Fase Aguda (PFA) que permiten identificar condiciones subclínicas, e inclusive calidad en el manejo de los animales. Con dichas PFA se puede detectar el momento en que se están produciendo problemas en los animales y así convertirse en una herramienta útil y práctica para evaluar periodos de transporte de estos, la inspección ante mortem y el estado sanitario de los animales de abasto (Piñeiro *et al.*, 2009; Marco-Ramell *et al.*, 2016). Es por ello, que el uso de estas PFA como biomarcadores para la evaluación de bienestar animal durante diferentes eventos dentro del ciclo productivo pueden dar información puntual de los momentos específicos en que estas son liberadas por los animales y con ello buscar la mejora en aquellos manejos que están generando su presentación (Čobanović *et al.*, 2020).

Cabe mencionar que no existe un procedimiento totalmente preciso para evaluar el nivel de bienestar animal, y el estrés en los cerdos. El uso de ciertas metodologías para cuantificar el estrés es: la observación directa del comportamiento, utilizando sistemas de puntuación. Otro, es el uso de los biomarcadores que ayudan a referir una fisiopatología, como respuesta del estrés. En cerdos son diversos los metabolitos que pueden ser detectados como respuesta a un estímulo de estrés (Cuadro 1) y cada uno de esto posee diferentes características, que permiten a ciertas biomoléculas sobresalir sobre de otras; esto por su naturaleza misma o tiempos de expresión. En este sentido las PFA una opción muy viable en este tipo de diagnóstico serológico (Tóthová *et al.*, 2011; Marco-Ramell *et al.* 2016; Čobanović *et al.*, 2020).

Cuadro 1. Metabolitos usados como biomarcadores de bienestar animal en cerdos.

Metabolito	Característica
Alfa amilasa	Enzima detectable en saliva de los cerdos, sin embargo, no es un biomarcador confiable por el poco nivel de respuesta ante estímulos estresantes.
Cromogranina A (CgA)	Proteína secretada por vesículas de células endocrinas, neuroendocrinas y neuronales, esta es liberada durante periodos de estrés y se ha encontrado en saliva de cerdos después del manejo de animales, movilización o periodos de privación de alimentos. Esta proteína no se ve afectada por la edad, el sexo o ritmos circadianos (Ciclo natural de cambios biológicos y físicos que experimenta un organismo en un ciclo de 24 horas). Siendo esta una ventaja frente a otros biomarcadores como el cortisol y las IgA.
Cortisol	A pesar de su variabilidad y corta vida es uno de los biomarcadores más usados en cerdos, su aumento se relaciona con la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA). Su desventaja es que los niveles de producción son 40 % más altos en la mañana que en las tardes y se ve afectado por la edad ya que en cerdos jóvenes su producción es menor, de la misma forma no es un biomarcador confiable ya que en ciertas condiciones no cambian los niveles.
Inmunoglobulina A (IgA)	Es el anticuerpo más abundante en las membranas mucosas. Tiene como función proteger frente a agentes infecciosos, proteínas ajenas al organismo y alérgenos. Se ha observado un aumento en la expresión y liberación de IgA durante la movilización cerdos

Proteínas de Fase Aguda (PFA)	Son proteínas que circulan en sangre y su concentración se modifica en respuesta de inflamación, infecciones o estrés. Sirven como herramientas de diagnóstico de enfermedades en cerdos, sin embargo, se han estudiado como biomarcadores de estrés en plasma.
Interleucina-18 (IL-18)	Es una citoquina: pequeñas proteínas responsables de la comunicación intercelular, desarrollando un papel en la respuesta inflamatoria e inductora de otras moléculas de actividad inmunológica. Se ha descrito un aumento en la concentración de esta citoquina en la saliva de cerdos después de 1 hora de movilización.

Fuente: Piñeiro *et al.*, 2009; Saco, 2013; Martínez-Miró *et al.*, 2016; Čobanović *et al.*, 2020.

2.2. Proteínas

Son las moléculas orgánicas más complejas y abundantes que constituyen más de un 50 % del peso seco de las células (Viguera, 2003; Gutiérrez, 2006). Desempeñan un rol biológico muy importante, por ejemplo, sí el DNA contiene la información necesaria para construir una célula; las proteínas proporcionan los instrumentos moleculares para su ejecución (Viguera, 2003; Moradi, 2021). Asimismo, las proteínas son biopolímeros, constituidos por aminoácidos. La formación de estas en la célula consiste principalmente de tres etapas: 1) Biosíntesis de la cadena polipeptídica; 2) Su plegamiento en una estructura tridimensional; 3) En algunos casos su modificación postraduccional (Dagget y Fersht, 2003). Dentro de este proceso se encuentran funciones como la de regulación, actividad enzimática, transporte, protección, actividad estructural y hormonal (Gutiérrez, 2006).

2.2.1. Generalidades

Las proteínas tienen la capacidad de conformación desordenada conocida como estado desplegado, y posteriormente cambiar a una estructura tridimensional con características como estabilidad, estado definido y funcionalidad a través de este proceso denominado plegamiento. Gracias a este plegamiento las proteínas poseen una alta diversidad estructural (Figura 1) que les permite desempeñar prácticamente la totalidad de los procesos internos de la célula (Cuadro 2). La estructura de las proteínas se puede describir en cuatro niveles, pasando desde la estructura primaria a la cuaternaria (Dagget y Fersht, 2003; Nelson y Cox, 2008; Lowe, 2021).

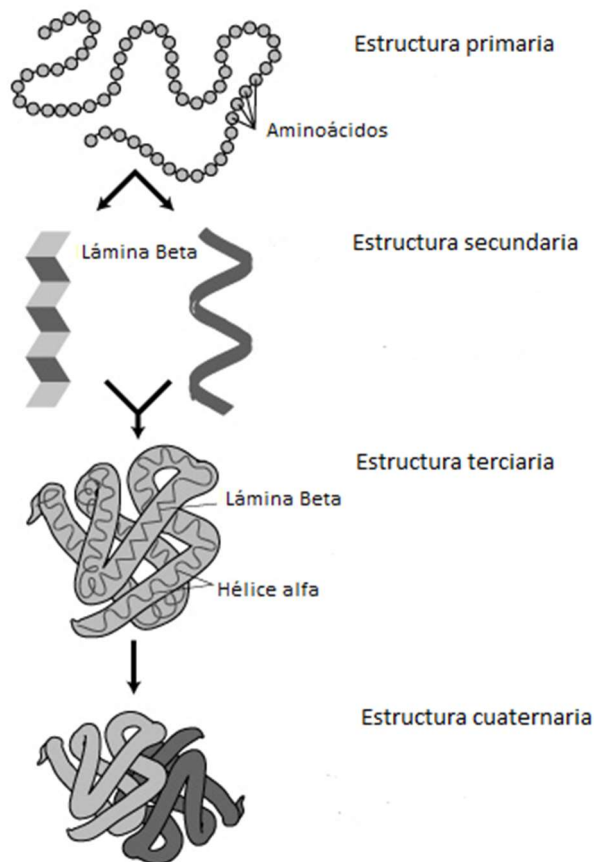


Figura 1. Niveles estructurales de las proteínas. **Fuente:** NHGRI, 1999.

Cuadro 2. Niveles de estructura de las proteínas

Nivel de estructura	Característica
Estructura primaria	Esta se caracteriza por la formación de la secuencia de aminoácidos que la componen, estos ordenados del primero al último. Esta secuencia lineal de aminoácidos va a determinar las propiedades de la molécula proteica y la conformación tridimensional que adoptará esta.
Estructura secundaria	Es la organización que alcanza la proteína, esto a partir de factores como la rigidez de los enlaces, la capacidad de estos a dar giros establecidos con el carbono y a su interacción de los radicales de los aminoácidos con la disolución en la que se encuentran. Esto resulta en estructuras alfa-hélice y Beta-laminar.
Estructura terciaria	Esta estructura se manifiesta en el espacio de una proteína, siendo esto a partir del plegamiento de las cadenas polipeptídicas, originando una configuración tridimensional compleja.
Estructura cuaternaria	La unión de varias cadenas polipeptídicas a través de enlaces covalentes.

Fuente: Gutiérrez, 2006; Carbajal, 2018; Yousefi, 2020.

Otras características que hace referencia a su estructura primaria, es la integridad de la cadena polipeptídica, la cual puede apoyar en fenómenos biológicos como injertos biológicos; compatibilidad o no de trasplantes de órganos y sueros sanguíneos, además de permitir llevar a cabo estudios filogenéticos y establecer el parentesco evolutivo entre especies (Moreno, 2015; Yousefi, 2020).

De la misma forma, las proteínas pueden desnaturalizarse y perder su estructura original, implicada directamente en la función de esta. La desnaturalización puede ser por la ruptura de enlaces, diferencia de temperatura, presión, agentes físicos como la radiación, y variaciones en el medio donde se encuentra la proteína como concentración salina o variaciones en el pH, es importante mencionar que este puede ser reversible o irreversible (Moreno, 2015; Cardona, 2020).

Los polipéptidos presentan una actividad amortiguadora, esto debido al principio de que los aminoácidos son anfóteros, ósea que pueden actuar como bases o como ácidos, liberando o captando protones del medio. De esta forma pueden neutralizar cambios en el pH del medio acuoso donde estén presentes, generando una capacidad tamponadora. Otra característica es la solubilidad, las proteínas globulares son generalmente solubles en agua, sin embargo, esto también dependerá de factores como lo son la concentración salina, el pH o la temperatura (**Cardona, 2020**).

2.3. Proteínas de fase aguda

Durante la última década, se han realizado numerosos estudios para evaluar las condiciones de bienestar animal durante los procesos de producción, de transporte y de sacrificio de los animales para abasto (**Damian et al., 2012**), dichos estudios, han generado una gran cantidad de información que han permitido hoy en día contar con diferentes metodologías para cuantificar y evaluar el bienestar de los animales, encontrando métodos de observación directa, para evaluar el comportamiento, utilizando sistemas de calificación, por otra parte, se puede recurrir a la utilización de biomarcadores, los cuales reflejan la fisiopatología de la respuesta al estrés (**Martínez-Miro et al., 2016; Hernández-Poblete, 2016**). Partiendo de ello, una posibilidad practica y con buenos resultados es la utilización de estos biomarcadores que cubren la función de identificar aquellos metabolitos que se liberan en el organismo y que repercutirán tanto en la salud, como en el bienestar animal. Un ejemplo de ello, son las Proteínas de Fase Aguada (PFA), las cuales se considera que pueden tener una función importante, no solo en la clínica veterinaria, sino también en la producción animal (**Eckersall et al., 2004**).

Los animales que experimentan un desafío externo o interno a su estado de salud desarrollan una respuesta vigorosa que incluye la activación del sistema inmunológico tanto innato, como adquirido (**Panichi et al., 2000; Carpintero et al., 2007; Jain et al., 2011**). El sistema inmunológico innato que cubre aquellos aspectos de los mecanismos de defensa del hospedador que no dependen de una respuesta específica, como la producción de anticuerpos, no solo estimula la actividad de los leucocitos, sino que también afecta distintos aspectos de los procesos metabólicos del hospedador. Las variadas reacciones del huésped a la infección, inflamación o

trauma se conocen colectivamente como respuesta de fase aguda (RFA) (Pepys, 1998; Skovgaard *et al.*, 2009; Jain *et al.*, 2011; Ackermann, 2017).

2.3.1. Generalidades de la fase aguda

Las PFA se pueden definir como proteínas plasmáticas secretadas en el hígado, como respuesta de fase aguda (RFA), debido a infecciones, inflamación, daño tisular u otros factores inductores de estrés (Martínez-Subiela *et al.*, 2001; Ackermann, 2007; Tthov *et al.*, 2013; Gómez, 2015; O'Reilly *et al.*, 2018). La RFA se caracteriza por una serie de efectos sistémicos, actividades metabólicas y alteraciones en una amplia variedad de procesos bioquímicos (Heegaard *et al.*, 2011; Tóthová *et al.*, 2013). Un cambio metabólico importante es la producción y secreción de algunas proteínas plasmáticas del hígado (PFA). La RFA es una respuesta muy rápida, que se desarrolla con concentraciones aumentadas de PFA en unas pocas horas, que permanecen elevadas mientras persiste el estímulo estresante o inflamatorio (Tóthová *et al.*, 2013; Ackermann, 2017). La concentración de estas PFA aumenta en condiciones de estrés inducido, por lo que puede ser utilizada como biomarcadores de estrés que impliquen pérdida de rendimiento en la granja (Murata, 2007; Gómez, 2015; Martínez- Miró *et al.*, 2016).

2.3.2. Características fisiológicas

La síntesis de las PFA es a través de las citoquinas proinflamatorias liberadas principalmente por macrófagos activados o monocitos a causa de infecciones y daño tisular (Hsin-Hsin *et al.*, 2003; Murata, 2007; Saco, 2017 Khalil y Khalil, 2020). Las responsables de activar la síntesis de PFA en hígado son las citoquinas IL-1- β , IL-6 y TNF- α (Figura 2) (Panichi *et al.*, 2000; Hsin- Hsin *et al.*, 2003; Murata, 2007; Saco, 2013; Tóthová *et al.*, 2013; Ehlting *et al.*, 2021). Esta activación se produce por medio de mecanismos que comprenden receptores de citoquinas, vías de señalización e inducción de transcripción de ARNm específicos (Martínez-Subiela *et al.*, 2001; Ackermann, 2017; Saco, 2017).

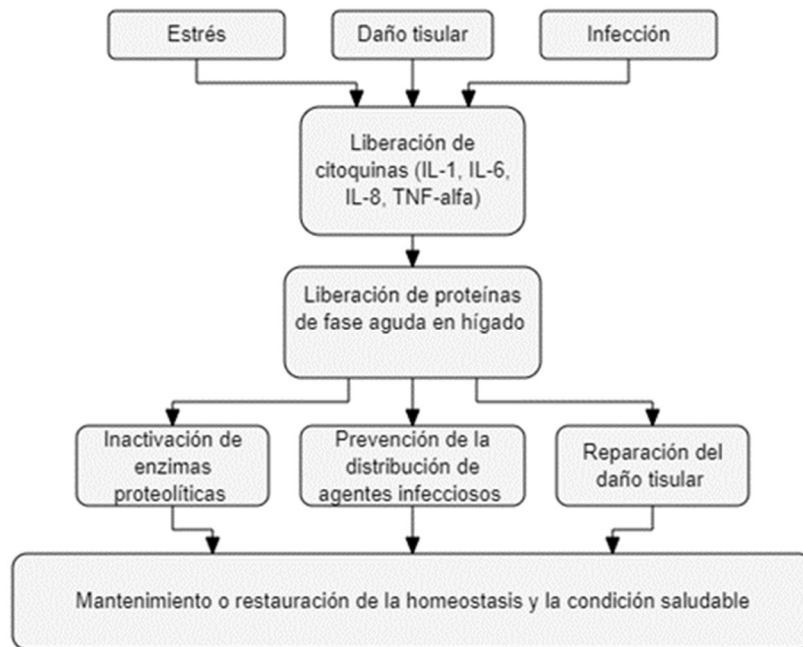


Figura 2. Síntesis de las proteínas de fase aguda. **Fuente:** Modificado de **Roy et al., 2017.**

La principal función de las PFA durante la RFA es la de participar en eventos como la coagulación sanguínea, el transporte de metabolitos, nutrientes y hormonas, defenderse contra infecciones y mantener la homeostasis. La IL-6, IL-1beta, TNF-alfa, glucocorticoides y factores de crecimiento son los principales mediadores de la expresión génica de las PFA (**Gulhar et al., 2021**). Estas proteínas se dividen en dos grupos: las PFA positivas (PigMAP) y las negativas, las positivas aumentan durante la inflamación y la concentración de las negativas disminuye (**Khalil y Khalil, 2020**).

2.4. Proteína PigMap (ITIH4)

En el torrente sanguíneo de cerdos inoculados de forma experimental con aceite de trementina se identificó la expresión de una proteína denominada PigMap, la cual fue descrita en 1994 como una Alfa glicoproteína; dicha expresión fue la respuesta a un proceso inflamatorio, observando un aumento considerable de la misma en la sangre de estos animales (**Piñeiro y Piñeiro, 2008**).

La proteína PigMAP (Pig major acute phase protein) es también conocida como ITIH4 (Inter- α - trypsin inhibitor heavy chain), particularmente identificada en cerdos; esta proteína presenta homología con proteínas de la familia ITI (Inhibidores de la inter-alfa-tripsina); cuya estructura está formada por la unión de una cadena ligera conformada por una proteína de nombre bukinina y dos cadenas pesadas (H1, H2 y H3) unidas por medio de un enlace covalente. La proteína bukinina posee una actividad inhibidora de proteasas, sin embargo, PigMAP no presenta unión a estas proteínas por lo que, no cuenta con dicha propiedad. A pesar de que la estructura de la proteína PigMAP está bien definida y estudiada, su función fisiopatológica es todavía desconocida (**Piñeiro *et al.*, 2009; Saco, 2013; Pihl *et al.*, 2021**).

2.4.1. Características bioquímicas de PigMAP

PigMAP es considerada una proteína grande, presentando una extensión de 920 aminoácidos en su conformación polipeptídica, dentro de sus características bioquímicas se menciona que posee un peso aproximado de 102,146 Da de masa y cuenta con un punto isoeléctrico teórico de 6.42, recordando que este punto isoeléctrico es importante porque representa una huella digital de las proteínas (**Uniprot, 2022**). Se sabe muy poco acerca de esta proteína; de acuerdo con herramientas bioinformáticas (String) su principal interacción con otras biomoléculas (Figura 3) está relacionada con proteínas como la Haptoglobina y la proteína C-Reactiva, ambas también son PFA expresada en células hepáticas, de la misma forma interacciona con precursores de Albumina, además de la fibronectina que actúa en el proceso de cicatrización, y con una proteína de nombre AMBP (Precursor de alfa-1-microglobulina/bikunina) de la familia ITI (**Jensen *et al.*, 2009**).

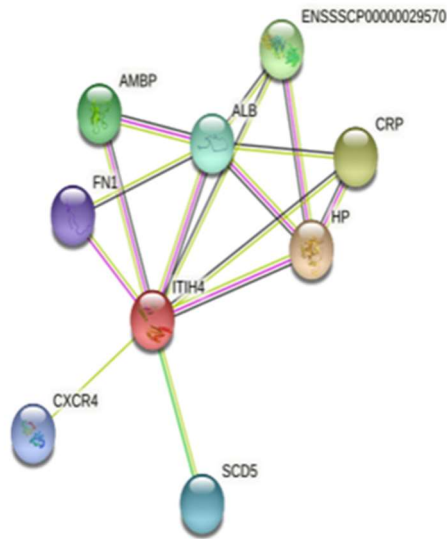


Figura 3. Interactoma de la proteína PigMAP con una confianza alta (0.700), con interacción con las principales proteínas relacionadas. ITIH4-PigMAP; ALB-Precursor albumina; FN1- Fibronectina; CRP- Proteína C reactiva; HP- Haptoglobina; AMBP- Proteína de la familia ITIH AMBP. **Fuente:** Jensen *et al.*, 2009.

2.4.2. Características fisiológicas

Como miembro de la familia del ITI la PigMAP/ITIH4 podría estar implicada en fenómenos de estabilización de la matriz extracelular, y desempeñar un papel importante durante el desarrollo embrionario, y en los procesos de regeneración de órganos dañados, también se ha propuesto que pudiera actuar como una proteína antiinflamatoria, ya que esta inhibe polimerización de actina, y la actividad fagocítica de las células polimorfonucleares. Principalmente de origen hepático, aunque también se ha observado expresión en otros órganos, entre ellos el endometrio. Se sabe que PigMAP es dependiente de la citoquina proinflamatoria IL-6 para expresarse (**González-Ramón *et al.*, 2000; Piñeiro y Piñeiro, 2008; Piñeiro *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2017**).

2.4.3. Uso de PigMap en la evaluación de bienestar animal

La presencia de la proteína PigMAP se ha observado durante procesos infecciosos de índole respiratorio, así como, en procesos de estrés en cerdos después de transporte, generando un amplio panorama para su investigación y uso como biomarcador en cerdos (**Tóthová *et al.*, 2013**).

Se ha descrito que en procesos de RFA, esta proteína puede llegar a aumentar de 10 a 20 veces su concentración basal; siendo de 0.3-1 mg/mL. Mientras que en RFA se han observado valores de 2 a 12 mg/mL; dependiendo de la intensidad de la respuesta originada. La concentración de PigMAP alcanza valores máximos hacia los 2-4 días del inicio de la RFA, entonces si el animal es capaz de superar el estado de estrés o de enfermedad, los niveles disminuyen progresivamente, para volver a la normalidad transcurridos 10-20 días (**Alava *et al.*, 1997; Sorensen *et al.*, 2007; Piñeiro y Piñeiro, 2009**).

2.5. Proteínas Recombinantes

Durante la segunda mitad del siglo XX, se lograron importantes avances en los campos de la biología, siendo esenciales para el desarrollo de la biotecnología moderna, dentro de esta rama y en específico el área de proteómica y el desarrollo de proteínas heterólogas, en la que se implican el aislamiento, producción y mejoramiento de las propiedades biológicas de proteínas a partir de diversas fuentes naturales tales como plantas, animales y microorganismos, para su subsecuente empleo (**López-Hoyos *et al.*, 2003; Lozada, 2008; Gamboa y Trujillo-Roldán, 2009; Young *et al.*, 2011; Alvarado-Madrigal *et al.*, 2019; Surat, 2019**). La producción de proteínas recombinantes (PR) es considerada un área de conocimiento en constante expansión, durante las últimas décadas se han aplicado estas proteínas en diversas áreas de la ciencia y la medicina, y esto ha llevado a tener constantemente investigaciones para mejorarlas (**Chen, 2012; Tripathi y Shrivastava, 2019**).

Las proteínas son moléculas complejas, esto en función y estructura, además de que estas no se pueden sintetizar de forma química como diversos fármacos. Estas proteínas se producen con base en procesos biológicos, de manera general dentro de células huésped, estas células con frecuencia de una especie diferente a su origen. Es por ello, por lo que se le conocen como proteínas recombinantes ya que el ADN que las codifica se ha manipulado o bien recombinado (**Overton, 2014; Tripathi y Shrivastava, 2019; Packiam *et al.*, 2020**).

Actualmente un gran número de productos terapéuticos se purifican a través de organismos genéticamente modificados, generando un mercado creciente de biológicos que son complejos y varían en tamaño y función. Generando una creciente demanda de nuevos sistemas de expresión

de proteínas que mejoren la complejidad de estas biomoléculas heterólogas. Actualmente existen diversos sistemas de expresión en el mercado, con estos es posible la producción de diferentes tipos de terapéuticos basados en proteínas (Moradi, 2021).

2.5.1. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes

Se considera una PR aquella cuya síntesis es realizada en un organismo diferente al nativo. Para la producción de PR es necesario definir cuál será la célula huésped. Para ello, es importante tener información acerca de las propiedades de la proteína que se desea producir bajo este sistema (Cuadro 3) (Overton, 2014; González y Fillat, 2018).

La expresión de PR en sistemas heterólogos puede darse a partir de diversos tipos de cultivos celulares como lo son: las bacterias, levaduras, hongos, células de mamíferos, plantas y células de insecto. Las proteínas tienen diferentes características determinadas por el tamaño, la localización intracelular, el método de secreción, la manera en que se pliegan y, finalmente, el patrón de glicosilación; dichas características deben ser tomadas en cuenta, cuando se escoge un sistema hospedero para su producción. Actualmente los tres sistemas de expresión (Cuadro 3) más utilizados en el campo de la investigación para la producción de péptidos y proteínas recombinantes son bacterias, levaduras y plantas. Sin embargo, existen diversos virus de insectos como los *baculovirus* que son capaces de expresar proteínas complejas con cambios postraduccionales, tanto en insectos como en mamíferos. Cada uno de estos tienen sus ventajas y desventajas, así como, características que ayudan a elegir un sistema sobre otro a la hora de expresar ciertas biomoléculas (Serrano y Sainz, 2006; Domínguez, 2013; Román, 2018).

Cuadro 3. Cuadro comparativo de diferentes sistemas de expresión de proteínas recombinantes

Sistemas bacterianos	Sistemas de células de mamíferos	Baculovirus	Sistemas de levaduras
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Son sistemas económicos de uso y relativamente simples de uso. ▪ Sistemas que están bien caracterizados ▪ Se caracterizan por tener una alta densidad celular ➤ Desventaja: ▪ Estos sistemas no pueden hacer modificaciones postraduccionales ▪ Bajo nivel de producción de la proteína ▪ Degradación de proteína por proteasas ▪ Formación de cuerpos de inclusión. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sistemas costosos ▪ Presentan un bajo rendimiento ▪ Pueden presentar modificaciones postraduccionales ➤ Desventaja: ▪ Crecimiento celular lento ▪ Dificultad para llevarlo a escalamiento ▪ Nutrientes que requieren las células son costosos. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sistema costoso ▪ Pueden tener modificaciones postraduccionales ▪ Alto nivel de producción de proteínas ▪ Puede expresar insertos mayores a 15 kb ➤ Desventaja: ▪ Lento crecimiento de las células ▪ Largos tiempos para expresar plegamiento incorrecto de la proteína en la última etapa. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Son sistemas económicos de uso ▪ Alto rendimiento ▪ Son sistemas relativamente simples de uso ▪ Sistemas que están bien caracterizados ▪ No producen endotoxinas ▪ Alto nivel de secreción de proteínas ➤ Desventajas: ▪ Degradación proteolítica.

Fuente: Modificado de Arya *et al.* 2008

2.5.1.1. **Sistemas bacterianos: *Escherichia coli***

Los sistemas de expresión de proteínas recombinantes, que utilizan bacterias tienen como base principal aquel que implementa el uso de *Escherichia coli*. Se estima que aproximadamente un 30 % de la producción mundial de biofármacos se producen a partir de ellas (**Spadiut et al., 2014; Moradi, 2021**). Esto es por su alta velocidad de crecimiento y rendimiento celular en medios de bajo costos, además, se conoce muy bien la genética y fisiología del hospedador, facilitando en gran medida el clonaje y su cultivo. *E. coli* tiene la capacidad de expresar alto nivel de proteínas heterólogas, llegando hasta un 30% del contenido proteínico, convirtiéndolas en verdaderas biofábricas y considerándola también un sistema seguro en su manipulación por la delección en genes implicados en patogenicidad (**González y Fillat, 2018**).

Se considera que, si las proteínas heterólogas no requieren modificaciones postraduccionales complejas y además son expresadas de forma soluble, *E. coli* se considera la primera opción para obtener suficiente material para estudios bioquímicos y/o estructurales, para llevarlo a una producción a gran escala de productos de valor agregado. Cabe mencionar que es común que las proteínas recombinantes sobre expresadas no logren adquirir una conformación correcta y sufran degradación proteolítica o se asocien entre ellas para formar agregados insolubles de proteínas no nativas conocidas como cuerpos de inclusión (**Samaniego, 2007**).

2.5.2. **Vectores plasmídicos y de expresión.**

Un vector se puede definir como una molécula de ADN que será transportado por un vehículo, de esta forma se permite que se propague en un organismo elegido la secuencia de ADN de interés (**Gómez y Echenique, 2004; NHGRI, 2021**). Siendo base fundamental de las tecnologías de naturaleza recombinante, en la que se hacen copias del ARN / ADN, el cual es insertado en lo que se conoce como plásmidos. Los plásmidos pueden ser vistos como una especie de mini-cromosomas bacterianos, los cuales tienen su propia manera de replicarse, y lo que hace que funcione es que también llevan uno o dos genes que los hacen resistentes a antibióticos específicos (**NGHRI, 2021**). De esta forma, las bacterias a las que se les haya insertado el gen de

interés crecerán en medios adicionados con antibióticos que, en situaciones normales, matarían a las bacterias (Figura 4). Esto ayuda a aislar colonias para después clonaras (**Loeza et al., 2004**).

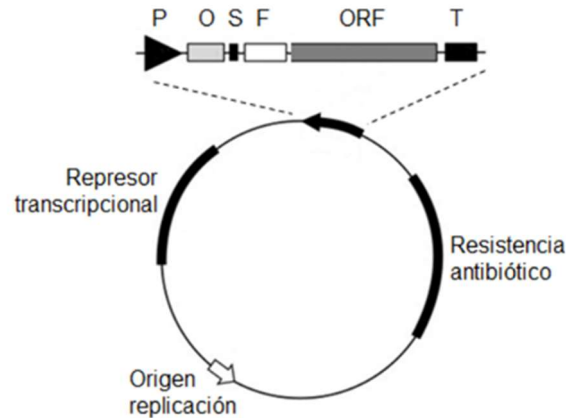


Figura 4. Componentes de un vector plasmídico de expresión recombinante en *E. coli*. P: promotor, O: operador, S: sitio de unión al ribosoma, F: secuencia de fusión, ORF: secuencia codificante del gen de interés, T: terminador. **Fuente:** González y Fillat, 2018.

En resumen, los vectores son sistemas cuya función es asistir en el proceso de transferencia de un gen exógeno hacia el interior de una célula de interés. Facilitando la entrada y biodisponibilidad intracelular del material genético (**Rozalén et al., 2003; Nora et al., 2019**). Existen dos tipos de vectores: los vectores plasmídicos o de resguardo y los vectores de expresión. Del mismo modo, existen otros vectores con otras características como un mayor tamaño, teniendo múltiples lugares de origen de replicación, llamados cromosomas artificiales bacterianos, siendo capaces de manejar secuencias más grandes de ADN, presentando de 100 000 a 200 000 bases para insertar (**Loeza et al., 2004; NHGRI, 2021**).

2.5.2.1. Vector plasmídico pJET 1.2 Blunt

El vector pJET 1.2 blunt es un vector de clonación o resguardo, esto quiere decir que es un genoma que puede aceptar el ADN de interés y aumentar el número de copias a través de una replicación autónoma. Estos vectores de clonación pueden ser tanto un plásmido, un cromosoma artificial de levaduras o bien un bacteriófago, la decisión de cual utilizar radica en el tamaño del inserto de ADN de interés (**Pelley, 2012**).

En cuanto al vector de clonación pJET1.2/blunt, este contiene un gen de enzima de restricción letal, el cual será interrumpido mediante la unión de un inserto de ADN en el sitio de clonación. Con esto solo las células bacterianas que contengan el plásmido recombinante pueden formar colonias. En el caso en que el vector circule sin un inserto, expresa la enzima letal que lisa a la célula de *E. coli* después de la transformación. Esta selección ayuda a acelerar el proceso de detección de colonias. El vector contiene dos secuencias de reconocimiento *BglIII* que flanquean el sitio de inserción, contienen un gen de resistencia a ampicilina y un promotor T7 para la transcripción in vitro e in vivo (Figura 5) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA ,2015).

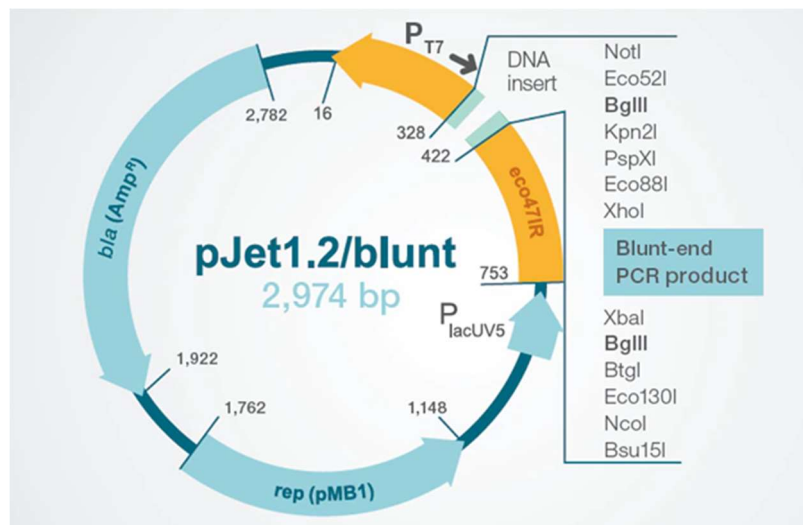


Figura 5. Mapa del vector de clonación Pjet1.2/blunt. **Fuente:** Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 2015

2.5.2.2. Vector de expresión pET SUMO

El vector pET SUMO es un vector de expresión, por lo que este tipo de vectores contienen secuencias río arriba del gen clonado que controlan la transcripción y la traducción de este (Clark y Pazdernik, 2016). El vector de expresión pET SUMO utiliza un pequeño modificador similar a la ubiquitina llamado SUMO, este permite la expresión, purificación y generación de proteínas en *E. coli*. Las fusiones de SUMO pueden aumentar la expresión de PR y mejorar la solubilidad de proteínas parcialmente solubles. Además, la estructura terciaria de la proteína SUMO es reconocida y escindida específicamente por una enzima similar a la ubiquitina conocida como SUMO proteasa. Cuando SUMO se fusiona con el extremo N de la proteína de

interés, SUMO generará la producción de la proteína (**Invitrogen™ Champion pET-SUMO, 2010**).

pET SUMO utiliza componentes del bacteriófago T7 para controlar la expresión de genes heterólogos en *E. coli*, entonces, la expresión del gen de interés estará controlada por un fuerte promotor del bacteriófago T7 que se ha modificado para contener la secuencia operadora lac (*lacO*) (Figura 6). Este promotor impulsa la expresión del gen 10 ($\phi 10$). La ARN polimerasa T7 reconocerá específicamente este promotor, con ello las células de *E. coli* que integren al vector expresarán la proteína de interés (**Invitrogen™ Champion pET-SUMO, 2010; Tan *et al.*, 2019**).

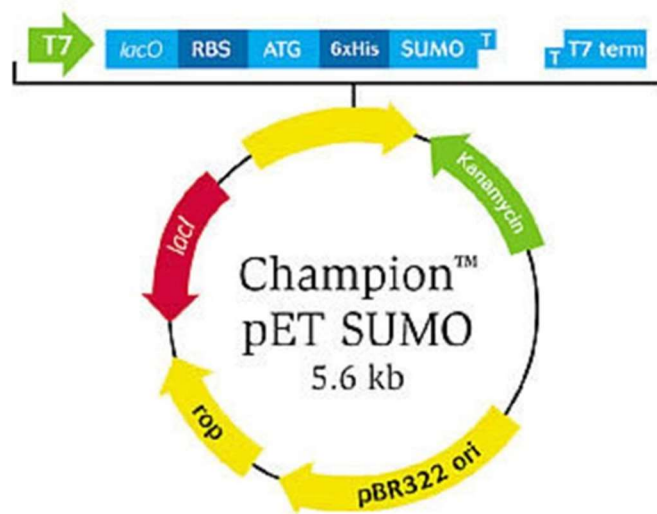


Figura 6. Mapa del vector de expresión pET SUMO. **Fuente:** Invitrogen™ Champion pET-SUMO, 2010.

2.6. Purificación de proteínas recombinantes

Como resultado del avance en la innovación y desarrollo de técnicas en el área de la proteómica durante las últimas décadas, se han generado estudios y técnicas que son cada vez más detallados en las proteínas. Y en este sentido es que estos avances van dirigidos en dos direcciones: 1) la generación de conocimientos para establecer los papeles de proteínas de interés con respecto al rol que desempeñan en procesos biológicos; mientras que 2) el siguiente es la aplicación de los conocimientos generados en esta área en ramas como lo son la nanotecnología, biomedicina y

biotecnología (Gräslund *et al.*, 2008; Mayolo-Deloisa *et al.*, 2012; Labrou, 2014; Ramírez-Carretero *et al.*, 2021).

En este sentido las técnicas de purificación de proteínas son fundamentales en investigaciones, diseñadas para eliminar impurezas y productos de degradación que puedan afectar a la proteína de interés. Sin embargo, estos procedimientos pueden generar condiciones de estrés que pueden llevar a una degradación de la proteína (Razinkov y Kleemann, 2017). Siendo imperativo el determinar qué protocolo de purificación utilizar, teniendo diversos puntos a tomar en cuenta como: la selección de la muestra biológica, el método y en qué condiciones se lisarán las células, esto último con la finalidad de exponer las proteínas al medio, no obstante, esto ocasionará que se genere una mezcla de nuestra proteína de interés con diversos componentes celulares, metabolitos, biomoléculas y estructuras celulares. A partir de este punto es una prioridad mantener a la proteína en condiciones óptimas para conservar su estructura y función (Razinkov y Kleemann, 2017; Ramírez-Carretero *et al.*, 2021).

Dentro de los principales protocolos, para la lisis de células están los métodos mecánicos y los métodos químicos. En el caso de los métodos mecánicos se encuentran la sonicación, homogeneización, uso de presiones altas y los ciclos de congelación y descongelación. Mientras que, en los químicos, se encuentran el uso de químicos que va a derivar en la lisis celular, esto mediante detergentes, disolventes orgánicos, y choque osmótico (Labrou, 2014). Es fundamental el uso de amortiguadores en este proceso, ya que la ruptura de membranas va a permitir la interacción de proteasas con la proteína de interés, generando la necesidad de proteger la estructura y función de esta última. Por último, se realiza un proceso de centrifugación cuya finalidad será la de separar la proteína de interés de componentes celulares (Ramírez-Carretero *et al.*, 2021).

Obtenida la muestra de la proteína de interés y separada de los componentes celulares, resta la purificación del polipéptido de interés, esto por medio de protocolos como la cromatografía en la cual se puede purificar a partir de la afinidad, peso, carga o hidrofobicidad. Convirtiéndose en un proceso ampliamente usado para la purificación (Labrou, 2014; Kapoor, 2015).

2.6.1. Cromatografía como herramienta de purificación de biomoléculas

Se basa en la separación de moléculas a través de su distribución entre dos fases, una llama estacionaria, compuesta por una fase sólida, y la otra móvil en forma líquida, esta última tendrá como objetivo el arrastre de la mezcla del compuesto a separar (**Coskun, 2016; Hasegawa *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2020**). Cabe mencionar que el tiempo en el que permanezca la proteína en la fase estacionaria dependerá íntegramente de las características y propiedades de las proteínas, además de otros factores que son los protagonistas y que contribuyen en este proceso de separación como lo es: la adsorción, la partición, y la afinidad o diferencias entre los pesos moleculares. Que serán este tipo de fuerzas las que van a determinar el tiempo que intervendrá la biomolécula en cada fase hasta abandonar el sistema (**Mayolo-Deloisa *et al.*, 2012; Coskun, 2016; Elviro, 2017; Ramírez-Carreto *et al.*, 2021; Srivastava *et al.*, 2021**).

La interacción que se genera entre las fases y las sustancias que están en la mezcla es el componente principal para que se dé la separación de la proteína. Se describe que el método de cromatografía basado en afinidad, a través de intercambios iónicos, es más efectivo para la separación de ácidos nucleicos y proteínas, mientras que los basados en partición son efectivos para la separación de moléculas como ácidos grasos, carbohidratos y aminoácidos. La cromatografía en papel es utilizada en la separación de proteínas y en estudios relacionados con la síntesis de proteínas. Por otra parte, la cromatografía gas-líquido se utiliza en la separación de grupos alcohol, éster, lípidos y amino, y en la observación de interacciones enzimáticas, mientras que la cromatografía de tamiz molecular se emplea especialmente para la determinación de pesos moleculares de proteínas. Mientras que la cromatografía en gel de agarosa se utiliza para la purificación de partículas de ARN, ADN y virus (**Mayolo-Deloisa *et al.*, 2012; Coskun, 2016; Hasegawa *et al.*, 2020**).

El objetivo de aplicar la cromatografía que se utiliza como método de análisis cuantitativo, para conseguir una separación satisfactoria en un intervalo de tiempo adecuado, para ello se han desarrollado diversos métodos de cromatografía con ese fin. Algunos de ellos incluyen cromatografía en columna, cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía en papel, cromatografía de gases, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de permeación en gel,

cromatografía líquida de alta presión y cromatografía de afinidad (**Mayolo-Deloisa *et al.*, 2012; Coskun, 2016**).

2.6.1.1. Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC)

Este es un tipo de cromatografía desarrollada y explotada en el año de 1975, se ha convertido en una técnica ampliamente usada en la que se aprovecha la diferencia en la afinidad que muestran grupos funcionales presentes en las proteínas por iones metálicos, esta diferencia de interacción se debe al enlace covalente que se produce entre las cadenas laterales de los aminoácidos superficiales y el ion metálico. Entonces este ion metálico actúa como un ligando de afinidad, sin embargo, para ello el ion debe de ser inmovilizado por un agente quelante el cual estará fijo en el soporte cromatográfico (**Otter, 2003; Chang *et al.*, 2017; Elviro, 2017; Rigüero *et al.*, 2020**).

Esta interacción se produce entre las cadenas laterales de los aminoácidos y los iones metálicos que son inmovilizados, se debe a que ciertos aminoácidos como el triptófano, cisteína y la histidina presentan átomos dadores de electrones en sus cadenas laterales; por otro lado, los iones metálicos como el Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} , ante la presencia de un agente quelante los estabiliza e inmoviliza, pero a su vez permite su interacción. De esta forma se producen enlaces covalentes coordinados entre las cadenas laterales que proporcionan electrones presentes en los aminoácidos, los cuales compartirán electrones con el ion metálico que ha sido inmovilizado. Este entrelazamiento de las proteínas con los metales quelados se elude con ácidos de Lewis (como H^+ , Zn^{2+}) que van a competir con el metal por la proteína o inversamente a través de bases de Lewis (imidazol) donde está competirá con la proteína por el metal. Y es a través de esta fuerza ejercida por el metal y la proteína lo que es aprovechada para separar o purificar proteínas (**Vargas, 2014; Elviro, 2017; Rigüero *et al.*, 2020**).

3. Planteamiento del Problema

El bienestar animal hoy en día está vinculado a la certificación de buenas prácticas de producción en las unidades de producción porcina. Como complemento de la evaluación del bienestar animal actualmente se utilizan algunas metodologías que implementan el uso de elementos de diagnóstico que están desarrolladas en Europa, lo cual pone en desventaja a México debido a los costos del producto comercial y las dificultades de su importación. En este sentido, la proteína PigMAP se ha caracterizado como el mejor blanco para el desarrollo de sistemas diagnósticos del bienestar animal, sin embargo, no existe en la actualidad ningún desarrollo relacionado con la obtención y producción de esta proteína. Derivado de ello, la importancia de los progresos biotecnológicos que a través de la utilización de la biología molecular han permitido el desarrollo de las llamadas proteínas recombinantes, que implementan el uso de microorganismo como la *Escherichia coli* (*E. coli*), siendo el vector más utilizado para la producción de estas proteínas con fines diagnósticos, terapéuticos o vacunales.

Con esta investigación se plantea desarrollar una proteína recombinante del gen PigMAP en un plásmido pET SUMO 1.2 utilizado *E. coli*. Cepa BL21 para poder determinar alteración del bienestar en cerdos, debido a que esta proteína PigMAP es específica en esta especie como expresión de fase aguda. Con base en lo anterior, desarrollar un sistema recombinante que permita establecer diagnósticos a costos reducidos, así como tiempo los procesos de evaluación de las unidades de producción para la certificación de buenas prácticas y generar una nueva tecnología que sea una herramienta auxiliar para identificar eventos de estrés en los cerdos.

4. **Objetivos**

4.1. **Objetivo General**

Desarrollar PigMAP de manera recombinante para su utilización como una herramienta de diagnóstico de bienestar animal.

4.2. **Objetivos específicos**

- Determinar las características bioquímicas de la proteína de fase aguda PigMAP que permitan el desarrollo de proteínas recombinantes para su estudio en laboratorio.
- Producir y purificar proteínas recombinantes derivadas de la proteína PigMAP, altamente antigénicas.
- Determinar las propiedades antigénicas e inmunogénicas de las proteínas recombinantes derivadas de PigMAP en modelos animales.

5. Metodología

5.1. Estudio bioquímico de la proteína PigMAP

La predicción del peso molecular y la estructura secundaria de PigMAP (número de acceso: 7VFRB5X3016) se obtuvo mediante el software DNASTar, (DNASTAR), la hidrofobicidad mediante el algoritmo de Kyte-Doolittle (1982), las regiones antigénicas se predijeron mediante el algoritmo de Jameson-Wolf (1988) y las regiones transmembranales con el servidor TMHMM Server v. 2.0. De la misma forma se determinó la probabilidad de superficie (**Emini *et al.*, 1985**) y la determinación de epítomos para ambos fragmentos de interés por medio del programa Predicted Antigenic Peptides (**Kolaskar y Tongaonkar, 1990**). Se diseñaron oligos específicos para recuperar los genes correspondientes al N- y C- terminal de PigMAP, estos contenían los epítomos más inmunogénicos por medio del programa y mejores candidatos para clonación y expresión de manera recombinante.

Una vez determinados los parámetros mencionados, se generó un modelo de la estructura terciaria de la proteína PigMAP, esto a partir de la cristalografía reportada de su homóloga en humanos; ITIH 4 humana (**Briggs *et al.*, 2019**), mediante el programa en línea SWISS MODEL (Swiss Institute of Bioinformatics, Switzerland, 2022). Procediendo a la modelación de ambos; tanto ITIH 4 humana como porcina y se remarcaron las porciones seleccionadas correspondientes al fragmento N-Terminal y C-Terminal, además de los sitios específicos de epítomos en dichas fracciones. Esto último se realizó utilizando el programa de PyMol (Schrödinger, 2015).

5.2. Amplificación de los genes y subclonación al vector de expresión pETSUMO

Los fragmentos correspondientes al N y C-terminal de PigMap fueron amplificados a partir de cDNA de un bazo de cerdo clínicamente sano y clonado en el vector de resguardo pJET1.2/blunt (figura 7) previamente sintetizado por el grupo de trabajo del Laboratorio de Epizootiología del CENID-SAI, para su mantenimiento en el laboratorio.

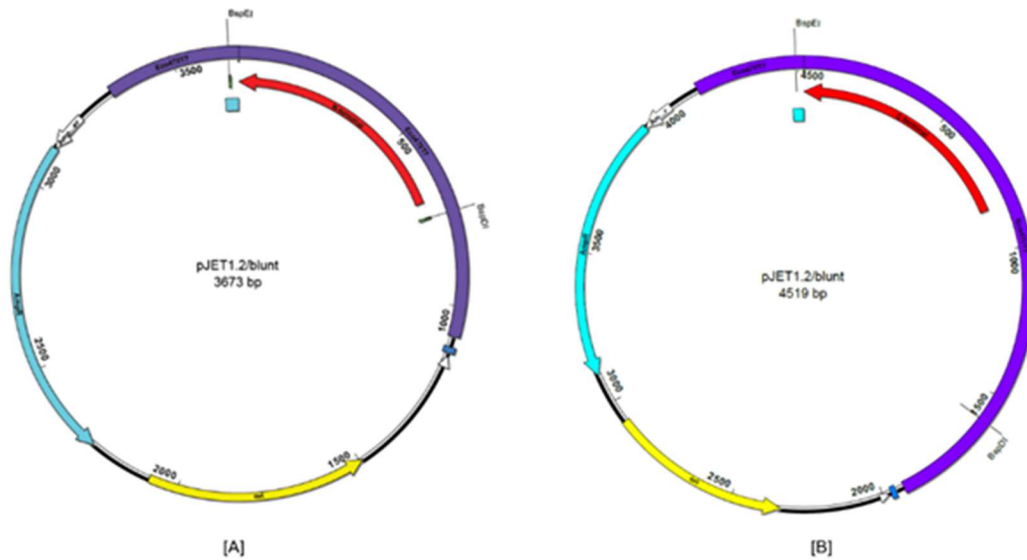


Figura 7. Mapas del vector de resguardo pJET1.2/blunt donde se han clonado los genes de interés [A] N-Terminal; [B] C-Terminal.

Para la subclonación, se realizó una extracción del plásmido que contenía al fragmento de interés ligado al vector de resguardo, esto se realizó a partir del kit FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN Biotech). Para determinar la integridad del plásmido y el inserto correspondiente a los genes de los fragmentos N-Terminal y C-Terminal de cada transformación, se realizó una PCR de los plásmidos obtenidos y, posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1%) para determinar la presencia de dicho inserto. Con la información del gel se pudo realizar la clonación en el vector de expresión.

Posteriormente se realizó una amplificación de los fragmentos de interés, esto se realizó por medio de una prueba PCR punto final con el kit Taq DNA Polimerase (**Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA**) y de los iniciadores que previamente se diseñaron (N-Terminal: Delantero: 5' CTGGCAGAGGCC CTCACCA 3'; Reverso: 5' CTACTACTTCTCCAGGAAG 3'. C-Terminal: Delantero: 5' GAACAGTCTAGGTTGCTG 3'; Reverso: 5' CTACTAATGTCCCTGGACT 3'). A partir del producto obtenido de la extracción de plásmido antes realizado. La mezcla de reacción y las condiciones de la PCR se muestran en los cuadros 4 y 5.

Cuadro 4. Condiciones de la reacción PCR punto final.

Reactivo	Volumen en μL
H ₂ O	29.5
10X Buffer	5
dNTPs	1
Iniciador delantero	2.5
Iniciador reverso	2.5
MgCl ₂	4
TaqPol	0.5
ADN 1/10	5

Cuadro 5. Protocolo de amplificación de los genes de interés N-Terminal y C-Terminal de PigMAP mediante PCR punto final.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	2 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	
Alineación	N-Ter: 70 °C C-Ter: 69 °C (Determinado por gradiente de temperatura)	30 segundos	30
Extensión	72 °C	1 minuto	

Extensión final	72 °C	10 minutos	1
------------------------	-------	------------	---

Los fragmentos amplificados por PCR del inserto/gen N-Terminal (699 pb) y C-Terminal (846 pb), que se encontraban en los plásmidos de resguardo (pJET-NTerPigMAP y pJET-CTerPigMAP) se purificaron directo de reacción mediante el kit comercial FAVORGEN® Gel/PCR Purification Mini Kit (**Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA**) Las muestras purificadas fueron empleadas para la subclonación en el vector de expresión Invitrogen™ Champion™ pET-SUMO. Las muestras obtenidas de PCR punto final fueron cuantificadas en el gel de electroforesis con respecto al marcador de peso molecular de concentraciones conocidas. Los insertos fueron usados en una reacción molar aproximada 1:3 (vector/inserto) en buffer 10X (1µL), vector de expresión (2µL), inserto (4µL), ligasa (1µL) y agua grado biología molecular (2µL) para completar el volumen hasta 10µL. Se incubó a 25 °C durante 24 h. La reacción fue posteriormente usada para transformar células competentes de *E. coli*.

5.3. Preparación y transformación de células competentes de *E. coli*.

Para la preparación de células competentes, se utilizó un pre-cultivo de células TOP10 crecido a saturación en medio LB, posteriormente se inocularon 50 mL de medio LB con 15 uL de precultivo y se dejó crecer a 250 rpm, 37 °C hasta que el cultivo alcanzó 0.35 densidades ópticas (DO) a 600 nm. El medio crecido se incubó en hielo durante 10 minutos y las células se recuperaron por centrifugación a 4100 rpm, 10 minutos, 4 °C. El sedimento se resuspendió en 30 mL de solución de MgCl₂ 80 mM, CaCl₂ 20 mM y se centrifugó a 4 °C, 4100 rpm, 10 min. El sedimento celular se resuspendió en 1 mL de solución de CaCl₂ 0.1 M. Para la transformación a través de choque térmico, brevemente; se colocó en un tubo de 1 mL estéril 3 µL de la mezcla de ligación (pETSUMO-PigMAP), más 200 µL de células competentes TOP10. La mezcla se colocó en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se realizó el choque térmico colocando el tubo 30 segundos a una temperatura de 42 °C, luego se colocó rápidamente en hielo durante 1 a 2 minutos. Pasado el tiempo, se agregó 800 µL de medio LB y se incubó durante 1 hora sin agitación a 37 °C. Durante el proceso de incubación, cada 15 minutos se realizaba una agitación leve, para homogenizar. Pasado el

tiempo de incubación, se tomaron 200 μ L de la suspensión, se colocaron en una placa de agar LB+kanamicina (50 μ g/mL) y esta se incubó durante 18 horas a 37 °C, hasta observar el crecimiento de las colonias.

Seleccionadas las cepas positivas a crecimiento en placa agar LB+Kanamicina, se propagaron éstas en 5 mL de medio LB; donde se procedió a extraer los plásmidos de las células transformadas con el ADN del inserto (N-Terminal y C-Terminal) mediante el kit comercial FAVORGEN® Plasmid Extraction Mini Kit. Para determinar la integridad del plásmido de expresión y el inserto correspondiente al gen que codifica a los fragmentos de interés de cada transformación, se realizó una PCR punto final de los plásmidos obtenidos y, posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1 %) para determinar la presencia de dicho inserto.

Una vez determinado cuales plásmidos contenían el inserto de interés, se realizó una segunda PCR punto final para determinar la orientación del inserto con respecto al origen de replicación. A esta mezcla se incorporó 5 μ L de una dilución 1:10 de los plásmidos provenientes de las células transformadas y se procedió a realizar la PCR utilizando para ello un oligo que hibrida dentro del vector pPETSUMO en una región correspondiente a su región terminadora denominado T7-Rev y el oligo delantero de los insertos ($^{\circ}$ Tm N-Terminal: 66 °C; C-Terminal 64 °C). Los análisis fueron observados en electroforesis de gel de agarosa (1 %).

5.4. Preparación de precultivos.

Una vez se produjeron dos cepas de expresión posibles productoras de la proteína recombinante PigMAP (rPigMAP), la cual fue denominada BL21-rCterminal y BL21-rNterminal. A partir de las cepas productoras, se prepararon cultivos frescos de 5 mL de medio LB más 25 μ L de kanamicina. Estos cultivos sirven para activar la viabilidad de la cepa productora para el proceso de inducción, estimulando una mayor producción de proteína. Los cultivos se crecieron a 37 °C por 20 h a 250 rpm hasta saturación. Pasado el tiempo de incubación, se realizó la medición de absorbancia del cultivo a 600 nm de densidad óptica (DO). Para medir la absorbancia en el espectrofotómetro; se realizó una dilución 1:10 del precultivo a un volumen total de 1 mL.

5.5. Ensayo de inducción

La inducción se llevó a cabo en medio LB, posterior a la preparación de los precultivos. Esto se realizó en tubos de 50 mL con 7 mL de medio LB sin kanamicina comenzando a una DO de 0.1 a 600 nm. La inoculación del medio se dio por la siguiente formula:

$$(1) \text{ Vol. por inocular} = (0.1) (7 \text{ mL}) / \text{Abs del precultivo.}$$

Realizada la inoculación, el proceso de incubación se realizó por aproximadamente 1 h a 37 °C a 250 rpm hasta alcanzar una DO de 0.5. Pasado el tiempo de inoculación y una vez alcanzada la abosorbancia deseada en los cultivos, estos se inocularon con IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1.5 mM, homólogo de la lactosa cuya función es la de estimular el operón Lac de la secuencia que codifica para la proteína de interés. La cantidad de IPTG en el medio inoculado se da por la formula $C1V1=C2V2$, lo que resulta en:

$$(2) (500\text{mM}) (7\text{mL}) = (1.5\text{mM}) V2.$$

Por lo que se inoculó IPTG en el cultivo, 0.021mL o 21μL. Se dejó incubar a 37 °C por 20 h a 250 rpm hasta saturación. Pasado el tiempo de incubación, se midió la absorción del cultivo, en una dilución de 1:10. Posteriormente, se tomaron muestras para analizar mediante el siguiente cálculo:

$$(3) 0.6/\text{Abs del cultivo} = \text{Vol. De muestra a analizar.}$$

Se dosificó el volumen calculado en dos tubos, los cuales fueron centrifugados a 10000 rpm por 1 min. Se eliminó el sobrenadante, y uno de los tubos se almacenó en congelación a -20° C. El tubo restante, se redujo en 60 μL de Buffer reductor (10 % glicerol, 2 % SDS, 5 % 2-mercaptoethanol, 0.0625 M Tris-HCl pH 6.8) y se hirvió durante 10 min para su posterior análisis.

5.6. Análisis de proteínas en SDS-PAGE y Western blot

El análisis de las proteínas se realiza por medio de una electroforesis, esta se realiza por medio de un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). El proceso de preparación de este gel consta de la unión de dos geles, preparados entre dos cristales de 1mm, siendo el primero el gel de corrida [1.022 mL agua destilada, 2 mL monómeros, 1.8 mL Tris-HCl pH 8.8, 50 μ L SDS (Dodecilsulfato sódico) 10 %, 50 μ L PSA (Persulfato amónico), 5 μ L TEMED (tetrametiletilendiamina)]. El segundo gel que se preparó fue el gel concentrador (2.21 mL agua destilada, 350 mL monómeros, 375 mL Tris-HCl pH 6.8, 30 μ L SDS (Dodecilsulfato sódico) 10%, 30 μ L PSA (Persulfato amónico), 3 μ L TEMED (tetrametiletilendiamina)).

Posteriormente se cargaron 10 μ L de las muestras previamente reducidas. La electroforesis se realizó a 70 volts en la fracción del gel concentrador y 100 volts para la fracción gel de corrida. Al finalizar la electroforesis, el gel se tiñó con azul de Coomassie (50 % metanol, 50 % ácido acético, 0.05 % de azul de coomassie) durante una hora en ligera agitación y después el gel se pasó a una solución de desteñido (50 % metanol, 50 % ácido acético) durante 20 minutos en agitación continua para poder observar las proteínas de interés (Laemmli, 1970).

Western Blot es otra de las pruebas que se realizaron para evaluar las proteínas de interés, esta es una prueba de inmunodetección, en esta prueba se realizó un gel de poliacrilamida con las mismas características antes mencionadas y se realizó una electroforesis. Posteriormente el gel se transfirió en una membrana de nitrocelulosa por transferencia en semiseco a 24 V durante 55 min y se bloqueó con leche descremada al 5 % en buffer PBS-Tween (10 mM de buffer de fosfato, 137 mM cloruro sódico, 2,7 mM de cloruro de potasio, 0,05 % de Tween® 20) a 4 °C durante 16 h con agitación moderada. La membrana se lavó con buffer PBS-Tween y se incubó con un anticuerpo primario. Para la detección de proteína recombinante: se utilizó como anticuerpo primario anti-his, este diluyó 1:1000, se colocó en ligera agitación por 2 h y se realizaron tres lavados con PBS-Tween cada con un intervalo de 15 min. Finalmente se añadió anti-mouse IgG-HRP como anticuerpo secundario a una dilución de 1:5000 y nuevamente se realizaron lavados con PBS-Tween. Las bandas de proteína se visualizaron con 10 mL de solución de revelado (PBS, 12 mg de tetrahidrocloreuro de 3,3'-diaminobencidina, 300 μ L de H₂O₂ al 3,4 %).

5.7. Sobreproducción en grandes volúmenes

Con el objetivo de obtener grandes cantidades de las proteínas recombinantes, se procedió a preparar un precultivo de 5 mL de LB más 25 μ L de kanamicina, donde se inocularon las cepas de interés y se llevó a crecimiento. Posteriormente, se inocularon 100 mL de medio LB sin kanamicina, colocando la cantidad de células calculada mediante la ecuación (1) y se llevó a crecimiento hasta alcanzar la absorbancia deseada (0.5 a una DO600 nm). Posteriormente, se indujo con 300 μ L de IPTG (1.5 mM concentración final) y se dejó en crecimiento hasta saturación. El cultivo inducido fue centrifugado a 8000 rpm por 20 min, con el fin de obtener el pellet bacteriano.

5.8. Extracción y solubilización de cuerpos de inclusión

Cabe mencionar que los cuerpos de inclusión son agregados insolubles de proteína, compuestos fundamentalmente por la proteína recombinante de interés, comúnmente formados en *E. coli*, por lo que, su aislamiento y purificación previo a la solubilización contribuye a un incremento en los rendimientos y el grado de pureza de la proteína de interés. Brevemente el paquete celular se resuspendió en un buffer de Tris-HCl 50 mM pH 7.5, en un volumen de 500 mL. Se llevó a cabo el rompimiento celular por homogenización en un equipo Gauling, a una presión de 525 Kg/cm². Se centrifugó y se obtuvieron dos porciones: una fase soluble (sobrenadante), y una fase insoluble (pellet/cuerpos de inclusión).

La fase insoluble que corresponde a los cuerpos de inclusión, fue solubilizada para su preparación previo a la purificación, esto se realizó usando un buffer de solubilización (2.5 mL β mercaptoetanol, 1 gr SDS, 47.5 mL agua destilada y 250 μ L Tris-HCL 1M). Posteriormente para eliminar el β mercaptoetanol se realizó una diálisis en membrana de celulosa (tamaño de poro de 8 kDa) en un buffer Tris-HCl 5mM pH 7.5 con agitación moderada a 70 rpm durante 24 horas con tres cambios.

Una vez eliminado el β mercaptoetanol, se realizó un segundo proceso de solubilización, usando un buffer de Sarcocyl (5 % N-Lauroylsarcosine, Tris-HCl 50 mM pH 7.5) en agitación constante 250 rpm durante 16 h. Finalmente, transcurrido el tiempo se filtró la solución por medio de un filtro de 0.45 μ m y se ajustó el pH a 8 con ácido sulfúrico previo a la purificación).

5.9. Purificación mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC)

Los cuerpos de inclusión solubilizados se purificaron utilizando una columna de agarosa Ni-NTA (Amersham), de 5 mL de resina empaquetada en una columna vertical HisTrap® Chelating High Performance (GE Healthcare, Chicago, IL, EE. UU.). La columna se sanitizó con 6 volúmenes de columna (VC) de agua destilada filtrada, 2 VC de EDTA 0.2 M y 2 VC de NaOH 0.2 M. Posteriormente, se activó con 4 VC de agua, 1 VC de NiCl₂ 0.2 M y 6 VC de agua. La columna se equilibró con 6 VC de buffer de equilibrio (Tris-HCl 50 mM, pH 8) y se cargaron 6 VC de cuerpos de inclusión solubilizados (2 mg/mL). Las proteínas contaminantes se eliminaron con 4 VC de buffer de equilibrio. Las proteínas recombinantes se eluyeron usando 3 VC de buffer de elución (Tris-HCl 50 mM pH 8, imidazol 250 mM). Finalmente, la proteína recombinante purificada se dializó usando un tampón de Tris-HCl 5 mM, pH 8. La presencia de proteína de interés purificada se confirmó mediante SDS-PAGE y Western blot.

5.10. Cuantificación de proteína purificada

Una vez fue evaluada la proteína por medio de SDS-PAGE y Western blot se realizó de nuevo una diálisis de los productos purificados, con el fin de eliminar las sales de imidazol, usando un buffer de diálisis (Tris-HCl 5mM pH 7.5) con agitación moderada a 70 rpm durante 24 h y 3 cambios de buffer. La proteína purificada y dializada fue dosificada en tubos de 1 mL, y llevados a congelación a -70 °C. Finalmente, para su conservación la proteína congelada fue liofilizada hasta su uso. Por otro lado, la cuantificación de la proteína fue realizada por el método de Bradford, 1976, usando albúmina (2 mg/mL) como estándar, donde primero se preparó una curva patrón (Cuadro 6) en el siguiente orden de diluciones:

Cuadro 6. Curva de albúmina para cuantificación de proteína por el método de Bradfrod.

Tubo	Estándar (Stock albúmina/ μ L)	Agua destilada (μ L)	μ g/mL
1	40	760	100
2	20	780	50
3	10	990	20
4	500 μ L del tubo 3	500	10
5	500 μ L del tubo 4	500	5
6	0	150	0

Se colocaron en celdillas limpias y sin rayaduras, 150 μ L de reactivo Bradford y 150 μ L de muestra de cada tubo. Para la cuantificación de la proteína de interés, se realizó una dilución 1:4, y posteriormente se añadió 150 μ L de la proteína diluida en una celdilla más los 150 μ L de reactivo de Bradford. La mezcla se dejó en incubación a temperatura ambiente por 5 min.

Se llevaron a lectura en espectrofotómetro, a 595 nm de DO y se realizó la lectura por duplicado. A partir de los resultados obtenidos, se generó un gráfico con los valores de la concentración de albúmina y la absorbancia y se realizó una regresión lineal para corregir los datos experimentales, posteriormente se interpoló la absorbancia de la muestra para conocer la concentración proteínica y los rendimientos.

5.11. Evaluación de la antigenicidad de la proteína rPigMAP mediante inmunización de ratones

Este estudio se llevó a cabo siguiendo las directrices del comité de bioética para el cuidado y uso razonable de animales para experimentación en proyectos de investigación, CENID-Microbiología Animal; número de aprobación: CBCURAE-2017/001, fecha de aprobación: 21 de septiembre de 2017. Además, los experimentos se realizaron siguiendo la legislación mexicana (NOM-062-ZOO-1999; SAGARPA) con base en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, NRC.

Se emplearon 21 ratones hembra de la cepa CF-1 clínicamente sanas de 21 días de edad. Aleatoriamente se dividieron los ratones en tres grupos experimentales; un grupo de siete ratones inmunizados con la proteína rPigMAP purificada (5 μ g), formulada con el adyuvante AbISCO-100 (ISCOMs) (Isconova, Uppsala, Suecia) (rPigMAP- ISCOMs) (1:1) en un volumen final de 200 μ L/dosis. Un segundo grupo, con siete ratones inmunizados solo con proteína rPigMAP en la misma concentración más solución salina tamponada con fosfato (PBS) en un volumen final de 200 μ L/dosis, y el último grupo conformado por siete ratones inmunizados de forma simulada (grupo de control) administrada con ISCOM más PBS, es decir, sin antígeno. En cuanto al esquema de inmunización y sangrado se aplicó el siguiente: Los animales se inmunizaron por vía subcutánea

(s.c.) en la región del cuello con un volumen final de 200 μ L. De la misma forma se les administró una segunda dosis dos semanas después.

Durante la fase experimental, se recolectaron muestras de sangre por medio de la técnica de punción en la cola y se recolectaron las muestras en tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles a los 0, 7, 14, 21, 28 días. Finalmente, al día 28 los animales fueron sacrificados en una cámara de CO₂ de acuerdo con lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999 y se recolectaron muestras sanguíneas por medio de punción cardíaca. Las muestras obtenidas de suero de todos los animales se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos. Al concluir, se extrajo la fase acuosa, es decir el suero sanguíneo. Con una micropipeta se vaciaron en tubo Eppendorf y se almacenaron a -20 °C hasta su uso en la evaluación de la respuesta de anticuerpos.

5.12. Estandarización de la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA indirecto).

La proteína recombinante rPigMAP purificada por medio de cromatografía de afinidad IMAC se fijó en una placa de 96 pozos MicroWell™ (Thermo Scientific NUNC. EE. UU.) en diferentes concentraciones, utilizando 150, 200, 250 y 300 ng de la proteína, utilizando como amortiguador un buffer de carbonato-bicarbonato (SIGMA, EE. UU.) en un volumen final de 100 μ L por cada pozo. La placa se cubrió y se incubó a 4 °C durante 18 horas. Posteriormente se realizaron tres lavados con 200 μ L de PBS-Tween al 0.05% por cada pozo.

Posteriormente se realizó el bloqueo de la placa utilizando leche descremada en polvo al 5 % en PBS-Tween en un volumen de 200 μ L por pozo. La placa se incubó a 37 °C durante 1 hora en agitación lenta. Una vez pasado el tiempo se repitió el proceso de lavado de la placa tres veces.

Para los sueros (anticuerpo primario), se utilizaron los correspondientes a la toma del día 28 de los tres grupos, a una dilución de 1:100 en PBS-Tween+5 % de leche en un volumen final de 100 μ L/pozo. Cada dilución se realizó con tres repeticiones. Después, se incubó a 37°C durante 1 hora en agitación lenta y se realizó el proceso de lavado. Finalmente, se agregó el anticuerpo secundario; Anti-IgG de ratón + HRP (Invitrogen, EE. UU.) en una concentración de 1:5000 en PBS-Tween+5% de leche, se incubó a 37°C durante 1 hora en agitación lenta y se lavó.

Para el proceso de revelado de la placa se desarrolló utilizando sustratos de 3,3,5,5-tetrametilbencidina (TMB) utilizando 100 μL por pozo, se incubó a temperatura ambiente protegido de la luz durante 15 minutos. Una vez se observó la reacción cromogénica en tonalidad azul se agregaron 100 μL de solución de paro (H_2SO_4 2N) por pozo. Inmediatamente se realizó la lectura de la placa con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm.

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA utilizando el programa estadístico NCSS (NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA.) con pruebas de comparaciones múltiples de Dunnett para comparar los grupos inmunizados con proteína más adyuvante frente a la proteína sola en días diferentes. Los datos que no se encontraron distribuidos normalmente se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y se corrigieron para comparaciones múltiples mediante la prueba de Dunn para comparaciones múltiples. Las diferencias con una $p < 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas con un intervalo de confianza del 95 % ($*p < 0.05$; $**p < 0.005$; $***p < 0.0005$). Finalmente, los gráficos se construyeron utilizando el programa SigmaPlot versión 12.5 (Systat Software Inc., San José, CA, USA). Todos los datos se presentan con la media \pm error estándar de la media (SEM).

6. Resultados y discusión

6.1. Estudio bioquímico de la proteína PigMAP

De acuerdo con la literatura, la proteína PigMAP es considerada una proteína grande, la cual presenta una extensión de 920 aminoácidos y un peso molecular de 120 kDa (González-Ramón *et al.*, 2021; Pihl *et al.*, 2021; Uniprot, 2022). Debido a ello, no es posible expresarla completa en un sistema heterólogo como lo es *E. coli*, por ello se llevó a cabo un estudio de sus características bioquímicas para seleccionar aquellas regiones que presentaran mejor probabilidad de generar antigenicidad al ser producidas en bacterias.

Mediante el estudio de hidrofiliidad, se observó la presencia de una región hidrofóbica en la porción N-terminal de la proteína correspondiente a aproximadamente 231 residuos de aminoácidos (Figura 8A, abajo remarcada en amarillo), siendo el resto de la proteína altamente hidrofílica correspondiente a aproximadamente 200 residuos de aminoácidos, observando características semejantes en la proteína ITIH4 humana debido a que esta muestra una homología

de secuencia significativa en su porción N-terminal en dos tercios con las cadenas pesadas (H1, H2 y H3) de esta familia de proteínas, por lo que la ITIH4 humana y la PigMAP porcina se consideran estructuralmente similares (**González-Ramón *et al.*, 2021**).

Como se puede observar en la figura 8A, dos porciones correspondientes a la región N-terminal y C-terminal presentaron los mejores resultados en cuanto a regiones con mayores índices de antigenicidad, probabilidad de superficie y más de 10 epítomos, las cuales se observan en color rojo (Figura 8 A y B). Estas regiones también se encuentran presentes en la proteína humana, lo que nos indica que son porciones de la proteína altamente conservadas y que probablemente participan en el metabolismo plaquetario, hemostasia entre las vías de coagulación, en el proceso de la inflamación, y particularmente en el sistema inmune innato (**Nguyen, 2022**). Por otro lado, otras características identificadas de la proteína son la longitud, la cual corresponde a 902 aminoácidos, un peso molecular de 120 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 6.42.

Otra de las características que se observaron durante la modelación y estudio bioquímico es la ausencia de un modelo 3D de la estructura terciaria de la proteína PigMAP, esto se resolvió generando un modelo con base en la cristalografía descrita de la proteína ITIH4 humana. Al llevar a cabo la predicción de la estructura terciaria de la proteína por medio del SWISS MODEL (SIB, 2022), en éste se generó un modelo 3D de la proteína PigMAP a partir de la cristalografía reportada para ITIH4 humana (Figura 8 [B], arriba), con ello se generó la estructura de PigMAP con un 42.83 % de similitud (Figura 8 [A], arriba) este porcentaje es importante para determinar la confianza de dicho modelo de acuerdo al autor Contreras-Moreira, (2012), quien señala que durante la modelación de proteínas es imperativo situarse por encima del 30% de identidad, ya que en caso contrario caeríamos en una zona denominada “Twilight” en la que pueden existir errores en la modelación de las estructuras. Posteriormente se resaltaron en ambos modelos (Figura 8) las regiones de los epítomos que comparten y de la misma forma las regiones que corresponden a los fragmentos N-Terminal y C-Terminal de interés (remarcadas en azul). La ausencia del fragmento C-Terminal dentro del modelo generado posiblemente se debe a las diferencias estructurales de las proteínas, ya que PigMAP no presenta una la porción de unión a Bukinina que otras proteínas de la familia ITI (**Piñeiro *et al.*, 2009**; **Briggs *et al.*, 2019**). Sin embargo, se observó que los sitios de epítomos coinciden en forma positiva en el fragmento N-Terminal con respecto a los observados en

el modelo de la ITIH4 humana, con ello se puede considerar que este fragmento puede ser de utilidad para estudiar regiones antigénicas de ambas proteínas. Finalmente, con los resultados anteriormente descritos se puede definir que estas dos regiones (N y C-terminal) fueron los mejores candidatos para sobreproducirlos en un sistema bacteriano recombinante.

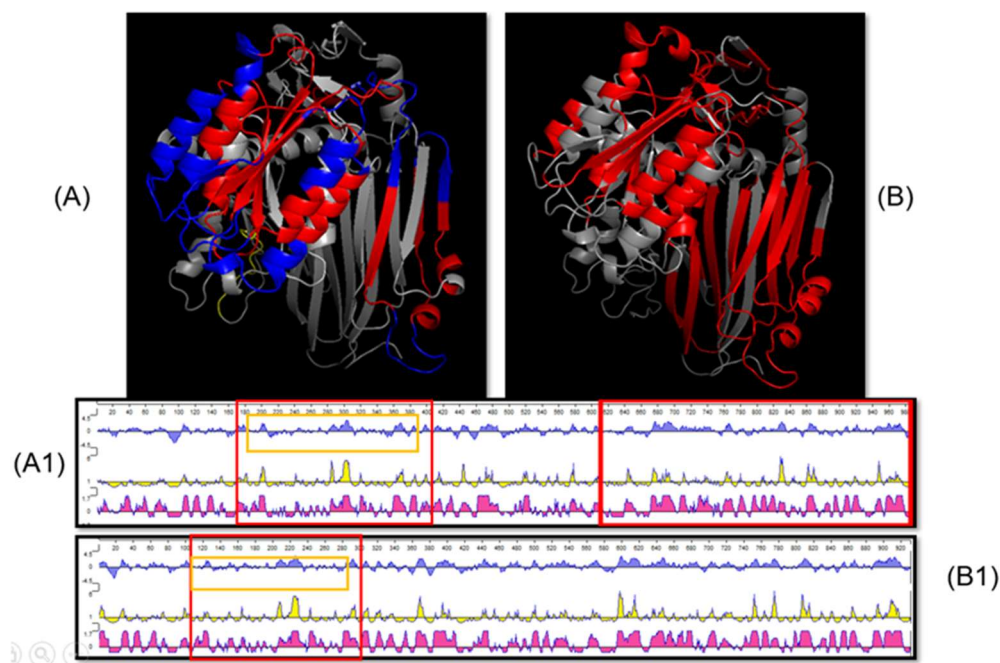


Figura 8. Estructura terciaria de la proteína PigMAP (ITIH4 Pig) (A) e ITIH4 humana (B) Arriba se remarca en color rojo las zonas de los principales epítomos presentes y en color azul la estructura que corresponde a los fragmentos que son los mejores candidatos para producir en bacterias. Figura inferior (A) Azul: Hidrofilicidad a partir del algoritmo Kyte-Doolittle; Amarillo: Probabilidad de superficie; Rosa: índice de antigenicidad. Recuadros Rojos; Regiones N-Terminal y C-Terminal seleccionadas. Recuadros amarillos; regiones altamente hidrofóbicas.

6.2. Amplificación de PigMAP N-Terminal y C-Terminal a partir del vector de resguardo

Una vez determinadas las regiones que poseen las mejores características para producirlas de manera recombinante, se procedió a llevar a cabo la clonación de los fragmentos N y C-terminal de PigMAP, por lo que se procedió a la extracción y purificación de los plásmidos pJET-N y C-terminal que contenían los genes de interés, posteriormente se realizó una amplificación de ambos

productos por medio de un gradiente de temperaturas en una PCR punto final usando los oligos específicos para subclonar en el vector de expresión. Los resultados se observaron a través de la electroforesis con gel de agarosa, como se puede ver en las Figuras 9 y 10, donde se observan bandeos de ambos fragmentos en el peso esperado, siendo para el fragmento N-Terminal de 699 pb (Figura 9) y el fragmento C-Terminal de 846 pb (Figura 10). Finalmente se seleccionaron las temperaturas de alineamiento 70.02 °C para N-Terminal y 69 °C para C- Terminal como las óptimas debido a que amplifican mayor cantidad de los genes de interés.

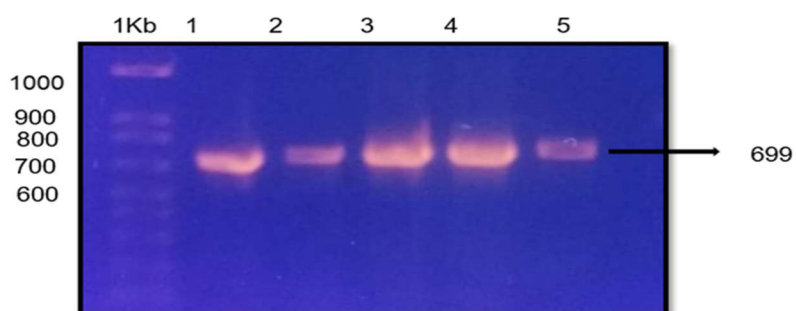


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 1 %, tinción con bromuro de etidio de la PCR punto final de gradiente de temperatura del plásmido pJET-NTerminal de las células transformadas. Carriles: (M) Marcador de peso molecular (1kb Plus); (1) 62°C; (2) 63.7°C; (3) 67.5 °C; (4) 70.2 °C; (5) 72.5 °C.

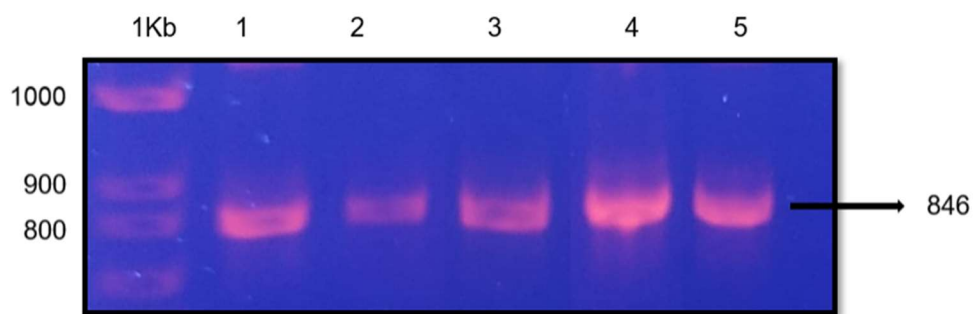


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 1 %, tinción con bromuro de etidio de la PCR punto final de gradiente de temperatura del plásmido pJET-CTerminal de las células transformadas. Carriles: (M) Marcador de peso molecular (1kb Plus); (1) 63 °C; (2) 64.7 °C; (3) 67.1 °C; (4) 69.9 °C; (5) 72.2 °C.

Una vez amplificados los genes N y C-terminal, se realizó la purificación a partir de la mezcla de reacción y se realizó la ligación al vector de expresión.

6.3. Subclonación de los genes de interés en el vector pETSUMO

El gen que codifica para ambas porciones (N-Terminal y C-Terminal) de la proteína PigMAP fue insertado en el vector de expresión InvitrogenTm Champion pET-SUMO (Figura 11). Los plásmidos recombinantes fueron usados para transformar células de *E. coli* Top10, esto es esencial para caracterizar la inserción correcta de nuestros fragmentos de interés con el vector que regulará la expresión del gen heterólogo, denotando el crecimiento de colonias de bacterias transformadas en forma positiva en presencia del antibiótico (Figura 12[A][B] y 13 [A][B]).

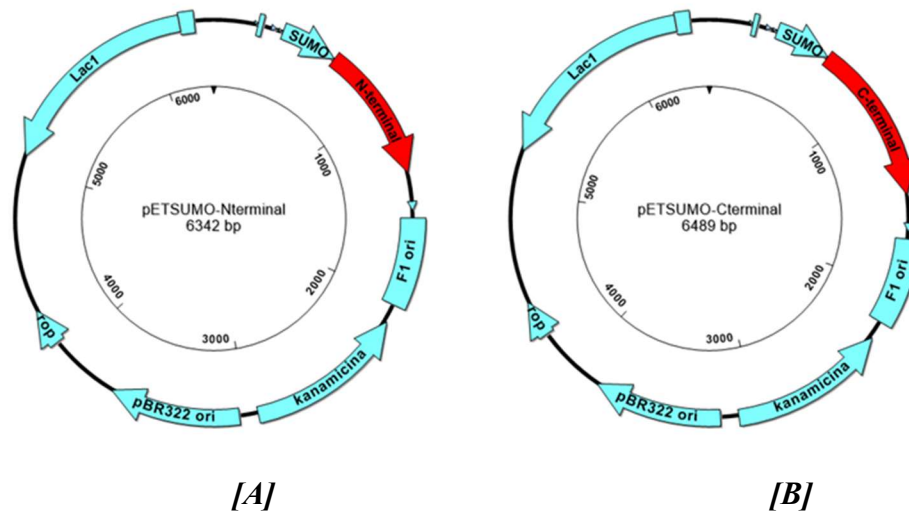


Figura 11. Mapas del vector de expresión donde se han clonado los genes de interés N-Terminal [A] y [B] C-Terminal respectivamente.

Como se observa en los resultados obtenidos de subclonación, transformación y obtención de las colonias bacterianas con el amplicón de interés para ambos fragmentos fue positivo. En los resultados de PCR se observaron las bandas al peso esperado para los dos fragmentos, siendo esto para N-Terminal de 699 pb y C-Terminal 843pb. En cuanto a la transformación para la subclonación del inserto en los vectores se demuestra de acuerdo con Asif y colaboradores en el año 2017 la importancia de la transformación en procesos de producción de proteínas heterólogas ya que será este el paso que nos permitirá introducir un ADN exógeno a bacterias competentes. Siendo en este caso tanto para el vector de resguardo pJET1.2/blunt como el vector de expresión pETSUMO.

Cabe mencionar que la proteína PigMAP no ha sido expresada en un sistema de expresión recombinante. Tanto en sistemas procariontes (*E. coli*) como eucariontes. Es por ello por lo que la obtención de un sistema de expresión recombinante que exprese las proteínas provenientes de las regiones más antigénicas es fundamental para la creación de un sistema de evaluación serológico de bienestar animal en cerdos, englobando diversas ramas de estudio de las ciencias biológicas como lo es la biotecnología y la biología molecular (González y Fillat, 2018).

Una vez seleccionadas las colonias positivas a crecimiento con presencia de antibiótico (Kanamicina) se propagaron en caldo LB y posteriormente se realizó la extracción de plásmidos. Una vez obtenido los productos, se realizó una PCR punto final con los oligos específicos para amplificar ambos genes de interés (N y C-Terminal) y determinar si contienen el fragmento clonado. La evaluación de los productos se observó mediante una electroforesis en gel de agarosa, observándose así los bandeos en el peso esperado para los dos fragmentos. Siendo 699pb para N-Terminal y 846 para C-Terminal. De esta forma se confirmó que las colonias seleccionadas presentan los insertos de interés y como se observa en la imagen (12[C]) y (13[C]) en el caso del N-Terminal se seleccionaron 9 colonias, siendo todas positivas a inserte, mientras que el caso de C-Terminal 7 colonias presentaron el inserto de las 9 seleccionadas (1,3,5,6,7,8,9).

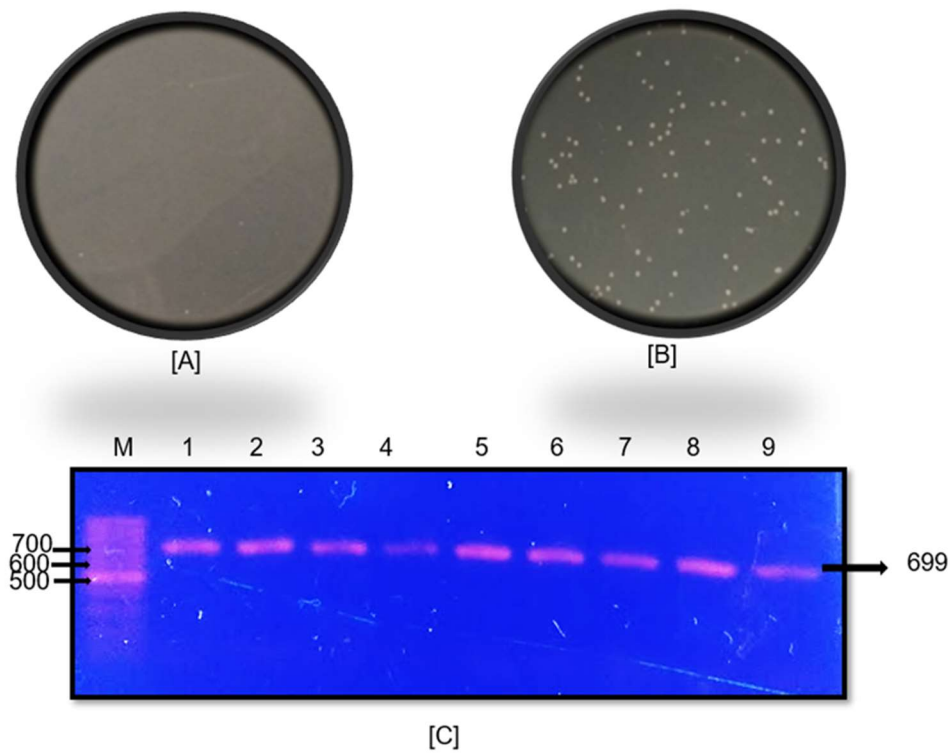


Figura 12. Transformación de células competentes *E. coli* TOP 10 con el vector de expresión pETSUMO-NTerminal; [A] Control Negativo de crecimiento de la prueba de transformación; [B] Colonias transformadas con el vector de expresión pETSUMO-NTerminal; crecidas en medio LB+Kanamicina. [C] Electroforesis en gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio de la prueba PCR punto final; cargado con los productos de la PCR a partir de plásmidos extraídos de colonias que fueron positivas a crecimiento en placas con antibiótico; (M) Marcador de peso molecular; (1-9) Muestra, los 9 plásmidos que se corrieron presentaron el inserto pETSUMO-Nterminal.

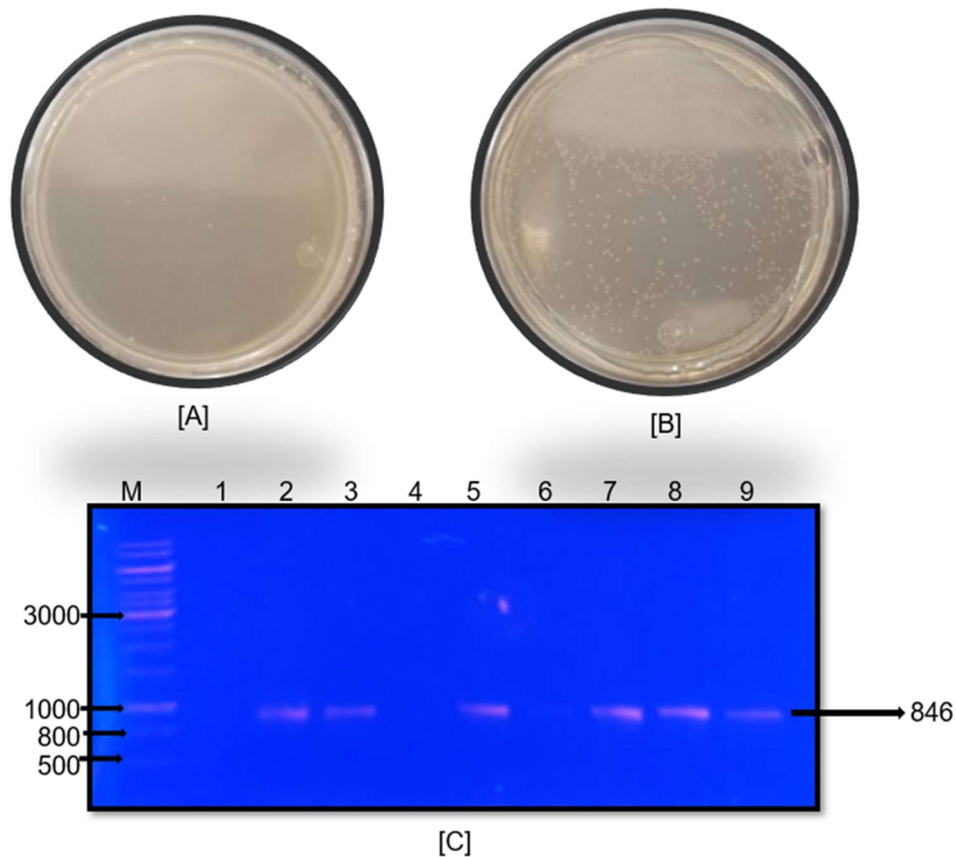


Figura 13. Transformación de células competentes *E. coli* TOP 10 con el vector de expresión pETSUMO-CTerminal; [A] Control Negativo de la prueba de transformación; [B] Colonias transformadas con el vector de expresión pETSUMO-CTerminal; crecidas en medio LB+Kanamicina. [C] Electroforesis en gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio de la prueba PCR punto final; cargado con los plásmidos extraídos de colonias que fueron positivas a crecimiento en placas con antibiótico; (M) Marcador de peso molecular; (1-9) Muestras de plásmidos evaluados, (2,3,5,6,7,8,9,) presentaron el inserto pETSUMO-NTerminal.

Una vez Identificadas las colonias que presentaron el inserto para ambos genes; se realizó una segunda PCR punto final usando como oligo antisentido Reverse T7 que hibrida en la región terminadora del vector pETSUMO y el oligo sentido del gen N y C-terminal. Esto para determinar si la orientación del inserto es correcta y los genes se encuentran en fase con respecto al promotor del vector de expresión, lo cual es necesario para llevar a cabo una correcta expresión de la proteína de interés. Como se puede observar en la figura 14, una vez llevado a cabo la PCR a los vectores

que poseían el inserto, se hizo la evaluación de los plásmidos por medio de una electroforesis en gel de agarosa. Se observó el bandeo en el peso esperado para ambos genes (799 y 846 pb, respectivamente), con ello se identificó aquellas colonias que en forma esperada cuentan con el gen de interés y se encuentra en fase con el vector de expresión. En la figura 14 se muestran los plásmidos, que presentaron amplicones en el gel anterior, que demostraban que el inserto se encontraba en fase con el vector de expresión.

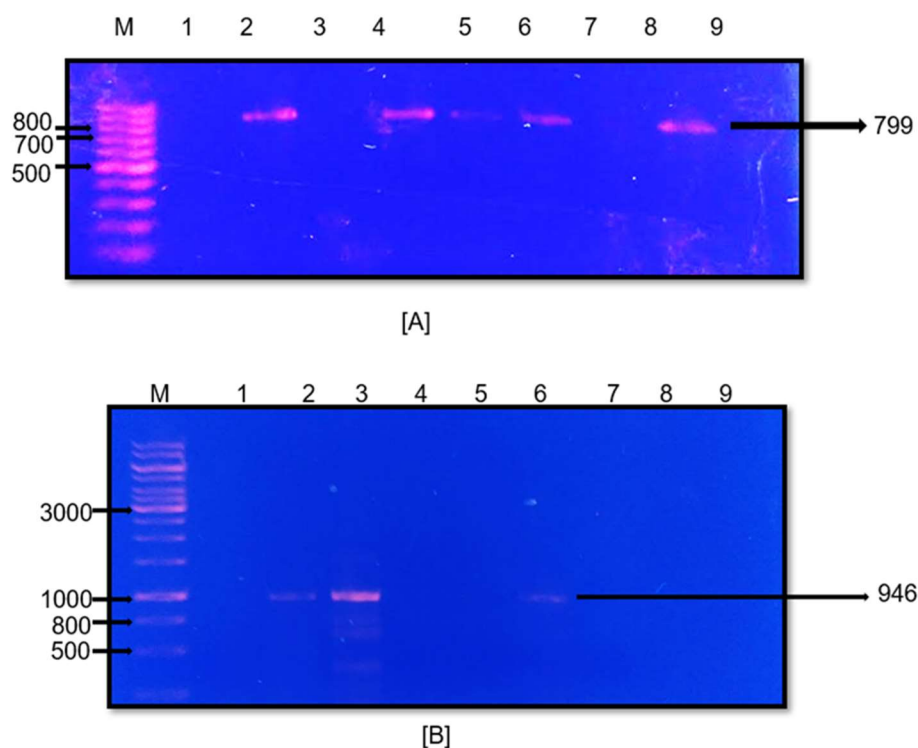


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1%, tinción con bromuro de etidio de la PCR punto final para determinar correcta orientación de los insertos de interés respecto al vector de expresión pETSUMO. [A] Fragmento N-Terminal en sentido (carriles 2, 4, 5, 6, 8); (M) Marcador de peso molecular; (1-9) Muestras de plásmidos evaluados. [B] PCR de los plásmidos con el inserto C-Terminal en sentido (2, 3, 6); (M) Marcador de peso molecular; (1-9) Muestras de plásmidos evaluados.

Como se observa en los resultados obtenidos de subclonación, transformación y obtención de las colonias bacterianas con el amplicón de interés para ambos fragmentos fue positivo. En los

resultados de PCR se observaron las bandas al peso esperado para los dos fragmentos, siendo esto para N-Terminal de 699 pb y C-Terminal 843pb. En cuanto a la transformación para la subclonación del inserto en los vectores se demuestra de acuerdo con Asif y colaboradores en el año 2017 la importancia de la transformación en procesos de producción de proteínas heterólogas ya que será este el paso que nos permitirá introducir un ADN exógeno a bacterias competentes. Siendo en este caso tanto para el vector de resguardo pJET1.2/blunt como el vector de expresión pETSUMO.

6.3.1. Transformación en cepa de expresión BL21.

Una vez caracterizado los vectores de expresión con los fragmentos de interés en sentido correcto, se realizó nuevamente el proceso de transformación, sin embargo, se aplicó este proceso en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (Figura 15), la cual es una cepa de expresión. Se utilizó como plásmido aquellos que presentaban la banda esperada en peso con respecto a los genes de interés y que de igual forma presentaron un bandeo esperado con relación al inserto clonado en fase con el vector de expresión vector de expresión.

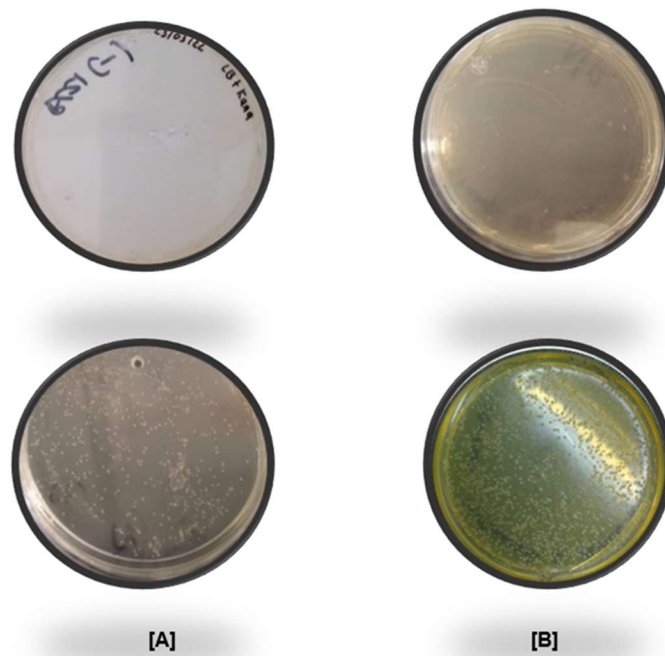


Figura 15. Colonias *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector de expresión; [A]Transformación con plásmido pETSUMO-NTerminal, imagen superior: Control negativo de transformación; imagen inferior: Colonias positivas a crecimiento en Agar LB+Kanamicina ([B]), [A]Transformación con plásmido pETSUMO-CTerminal, imagen superior: Control negativo de transformación; imagen inferior: Colonias positivas a crecimiento en Agar LB+Kanamicina.

Finalmente se tienen posibles sobreproductoras de las proteínas recombinantes N y C-Terminal de la proteína PigMAP, las cuales contienen un vector de expresión con el gen de interés en fase y que cuenta con las características necesarias para su producción en bacterias. Análisis de expresión. Otro resultado positivo es el crecimiento de colonias bacterianas en placas agar LB+Kanacina, esto denota que se realizó de forma satisfactoria la transformación ya que el vector de expresión pETSUMO tiene como marcador de selección un gen integrado de resistencia a Kanamicina, por lo que bacterias que integren de forma correcta al vector generarán esta resistencia (Clark y Pazdernik, 2016). Finalmente, el realizar las pruebas de PCR punto final para determinar que nuestro inserto, así como la orientación del inserto con el vector se realizan de acuerdo con lo establecido por el fabricante de dicho vector (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA, 2015).

El vector de expresión pETSUMO fue seleccionado debido a que presenta características favorables para la sobre-expresión de la proteína de interés: 1) favorece la producción de proteínas altamente solubles gracias a su etiqueta SUMO; 2) permite altos niveles de expresión por su promotor T7Lac y 3) codifica para una región de poli-histidinas en el extremo N-terminal de la proteína recombinante lo que facilita su purificación por afinidad a iones metálicos. En este sentido los resultados fueron positivos ya que las dos construcciones que se habían transformados en cepas BL21 de *E. coli* expresaron las proteínas correspondientes a la información integrada a los vectores de expresión, específicamente para las proteínas correspondientes a las regiones N-Terminal y C- Terminal de la proteína PigMAP.

La evaluación y análisis de expresión de las cepas potencialmente productoras de la proteína rBL21-Nterminal se realizaron a partir de una electroforesis en gel de poliacrilamida posteriormente teñido en azul de commassie (figura 16 [A]), observándose bandeos de sobreexpresión en los carriles tres a nueve; a un peso molecular de 37 kDa el cual corresponde al peso esperado. Los bandeos no se observan en los carriles uno y dos, siendo estos los controles positivo y negativo respectivamente. Posteriormente se realizó la prueba de Western blot (figura 16 [B]), confirmando por medio de inmunodetección dirigida hacia la etiqueta 6his del vector de expresión la presencia de productos proteínico sobreexpresado con las mismas características que los observados en el SDS-PAGE, observándose a un peso de 37 kDa en los carriles correspondientes a las muestras reducidas, no así en los carriles 1 y 2 cargados con los controles positivo y negativo respectivamente.

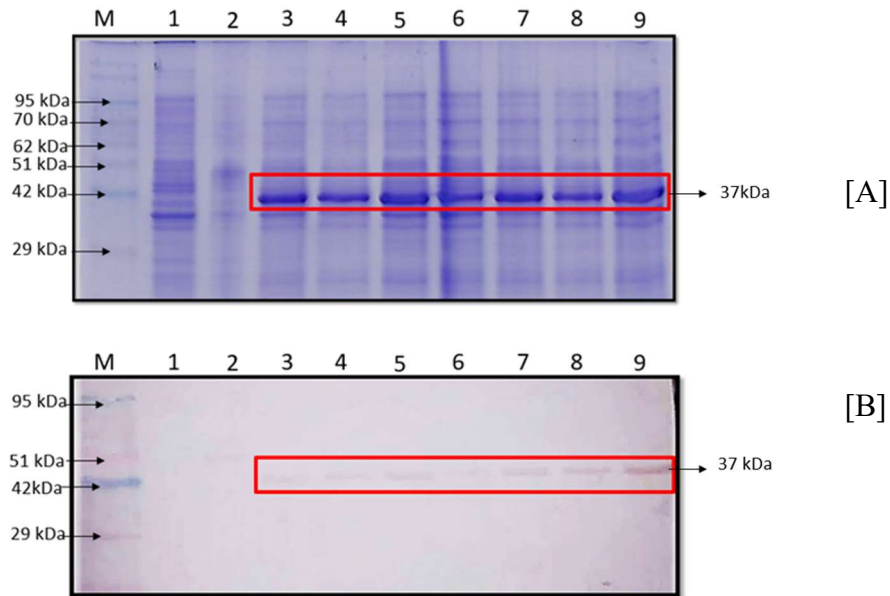


Figura 16. Expresión de la proteína rBL21-Nterminal PigMAP. [A] SDS PAGE con tinción de azul de coomassie y [B] Western blot usando anticuerpos Anti-Hys; [M] Marcador de peso molecular; [1] Control positivo; [2] Control negativo; [3-9] Colonias de *E. coli* BL21 seleccionadas que contienen la construcción pETSUMO-N-Terminal PigMAP.

En la figura 17 podemos observar el mismo procedimiento realizado. Esto para la evaluación y detección de sobreexpresión correspondiente a la proteína rBL21-Cterminal. Se observa en el gel de poliacrilamida (figura 17 [A]) en los carriles 1 y 2 correspondientes a los controles positivo y negativo, en carriles tres a nueve corresponden a muestras reducidas provenientes del ensayo de expresión. Se observan en estos últimos diversos bandeos característicos a sobreexpresión, mismos que no se observan en las muestras control. Estos bandeos corresponden a un peso de 43 kDa [recuadro rojo] y 26 kDa, siendo el peso esperado para esta proteína de 43kDa. De la misma forma se confirma el resultado por medio de una prueba Western blot (Figura 17 [B]), observándose un bandedo en los mismos carriles y mostrando una posible degradación del producto expresado, generando dos principales bandeos, a 43 kDa y a 26 kDa mismos que no se observan en el carril uno, siendo este el control positivo.

La inducción de expresión de las proteínas de interés se realizó por medio de IPTG, este es un homólogo de la alolactosa y de acuerdo con Gomes y colaboradores en 2020 su función es la de

eliminar al represor del operón Lac para inducir la expresión génica. Esto concuerda con nuestros resultados, teniendo en cuenta que el vector de expresión pET SUMO contiene un represor del operón Lac. Al entrar en contacto nuestras cepas de expresión que contienen al vector plasmídico con el reactivo genera la expresión de las proteínas heterólogas, siendo observadas a través del SDS-PAGE como bandas de sobreexpresión en el peso esperado, siendo aproximadamente de 36 kDa en el caso de la proteína correspondiente la región N-Terminal y 43 en el de C-Terminal. *E. coli* siempre es un sistema primario de elección en torno al tema de la producción de proteínas recombinantes, su genoma ampliamente conocido, así como su bajo costo y su alta producción de expresión son las principales razones de ello. Sin embargo, como lo menciona Rosano y Ceccarelli en 2014; existen también dificultades en el proceso de expresión. Como se pudo observar, la proteína expresada por *E. coli* correspondiente a la región C-Terminal de la proteína PigMAP de acuerdo con diversos autores como lo son Rosano y Ceccarelli en 2009 y Wang y colaboradores en 2016 existen diversas causas que llevan a un fallo en el plegamiento de las proteínas, entre ellos uno de los más importantes es la presencia de codones raros. Estos codones pueden generar procesos como el salto de codones, falta de incorporación o degradación de la proteína (**Lipinski *et al.*, 2018; Wong *et al.*, 2018**).

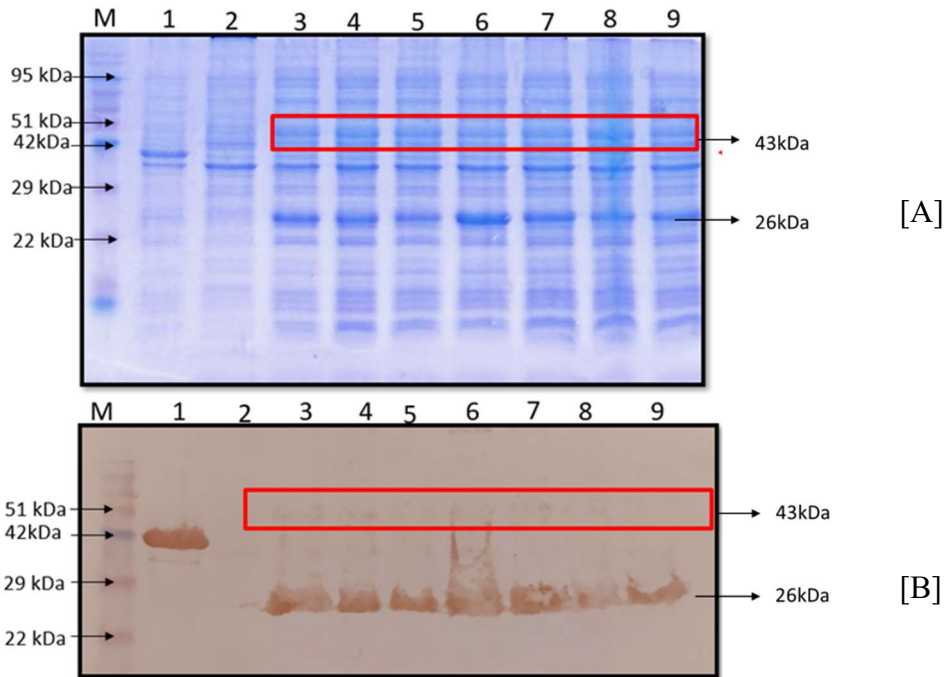


Figura 17. Expresión de la proteína rBL21-Cterminal PigMAP. [A] SDS PAGE con tinción de azul de coomassie y [B] Western blot usando anticuerpos Anti-Hys; [(+)] Control positivo [2] Control negativo; [1-7] Colonias de *E. coli* BL21 seleccionadas que contienen la construcción pETSUMO-C-Terminal PigMAP.

La presencia de codones raros explicaría la degradación se observó en las pruebas de expresión a través de los SDS-PAGE y su posterior confirmación por medio de Western blot. En este sentido se corroboraron las secuencias de codones raros por medio del programa codon usage analyzer 2.1 (**Maduro, 2003**) (Anexo C). Con este programa se observó que la secuencia de la proteína correspondiente a la región C-Terminal de PigMAP contiene un 23% de codones raros, generando una posible explicación acerca de la degradación vista.

6.4. Análisis de formación de cuerpos de inclusión

Al terminó inoculación e inducción de un lote de cultivo de 100 mL de la colonia seleccionada para la proteína correspondiente a la región N-Terminal como C-Terminal de la proteína PigMAP, y su posterior rompimiento celular por homogenización, se realizó una prueba

de SDS-PAGE y su corroboración por medio de Western blot. En la figura 18 [A] se observa una electroforesis en gel de poliacrilamida con tinción en azul de coomassie correspondiente a diversas fases obtenidas durante el rompimiento celular. Se observan en los carriles 4 y 5 la presencia de un fuerte bandeo con un peso de 37 kDa correspondientes a la fracción insoluble o bien cuerpos de inclusión. La presencia de estos bandeos se corroboró por medio de una prueba Western blot (Figura 18 [B]) con una fuerte inmunodetección de la proteína de interés en la fracción de cuerpos de inclusión a un peso de 37kDa. Con ello, se confirma que la proteína rBL21-Nterminal se encuentra principalmente en la fase insoluble.

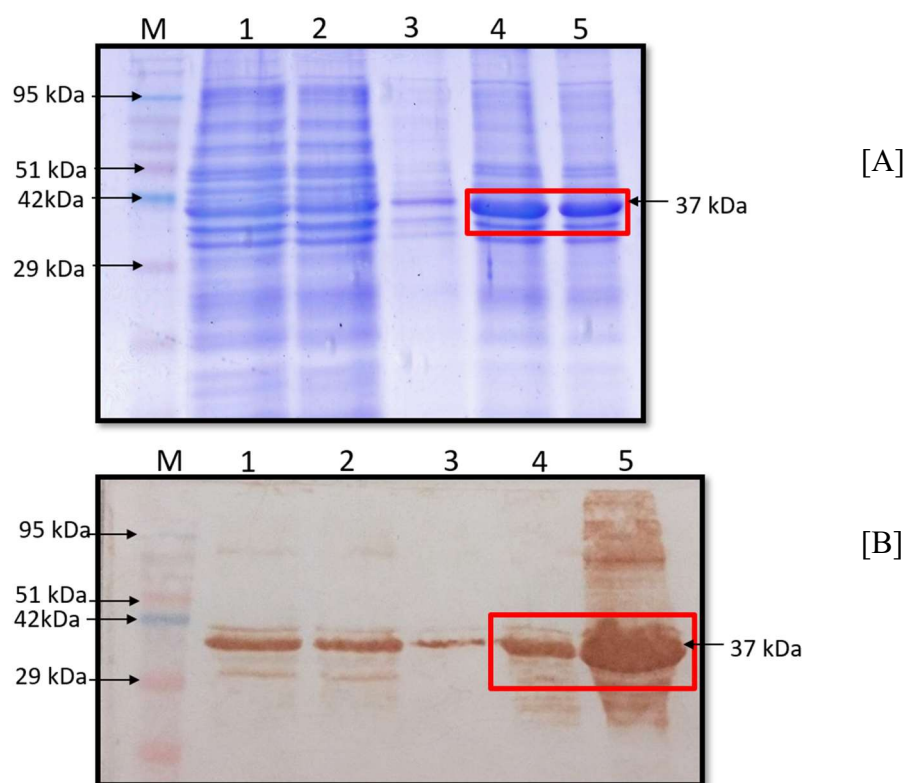


Figura 18. Análisis de cuerpos de inclusión de la proteína rBL21-Nterminal. [A] SDS PAGE con tinción de azul de coomassie y [B] Western blot usando anticuerpos Anti-Hys; [M] Marcador de peso molecular; [1] y [2] BL21-N-Terminal completa; [3] BL21-N-Terminal lisado; [4] y [5] Cuerpos de inclusión; [6] Fase soluble.

En la figura 19 [A] se observa un gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de coomassie, correspondiente a las diversas fases resultantes del proceso de ruptura celular en ensayo sobre

rBL21-Cterminal, observándose el mismo bandeo fraccionado principalmente observable en el carril 2 correspondiente a células completas y en el carril 5 con la fase insoluble. Posteriormente se realizó la confirmación por medio de una prueba Western blot (figura 19 [B]), observándose los mismos bandeos fraccionados y confirmando con ello la degradación de la proteína de interés. Finalmente, a partir de los resultados obtenidos se tomó la decisión seguir únicamente los siguientes procesos con la proteína rBL21-Nterminal. Dejando la proteína rBL21-Cterminal para estudios posteriores o su uso en una línea de investigación diferente.

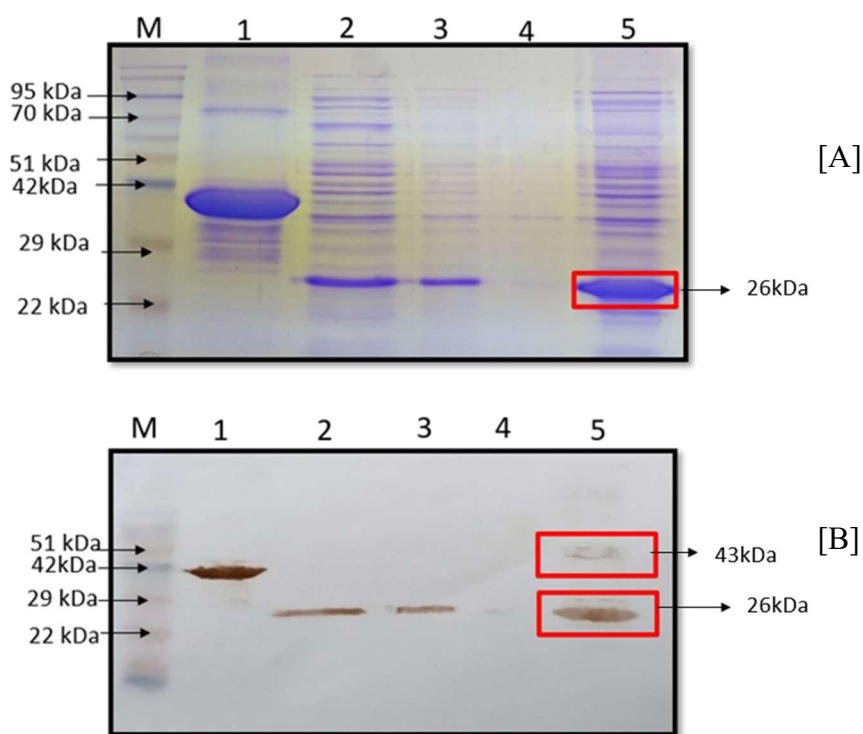


Figura 19. Análisis de cuerpos de inclusión de la proteína rBL21-Cterminal. [A] SDS PAGE con tinción de azul de coomassie y [B] Western blot usando anticuerpos Anti-Hys; [M] Marcador de peso molecular; [1] Control positivo, proteína purificada N-Terminal PigMAP; [2] BL21-C-Terminal completa; [3] BL21-C-Terminal lisado; [4] Fase soluble; [5] Cuerpos de inclusión.

6.5. Purificación de la proteína recombinante

Una vez se realizó la solubilización de los anticuerpos se realizó la purificación de la proteína, como se observa en la figura 20 [A] se corrieron en una electroforesis en gel de poliacrilamida diversas muestras obtenidas durante el proceso de purificación, observándose principalmente las eluciones que contienen la proteína purificada en los carriles marcados en recuadro rojo. Con un bandeo correspondiente a 37 kDa, cuyo peso es el esperado para la proteína rBL21-Nterminal. De la misma forma se observa una pérdida de proteína durante el proceso de adición de buffer de lavado.

El bandeo correspondiente a la proteína purificada se observa claramente más limpia en comparación con el resultado obtenido en el carril 1 siendo los cuerpos de inclusión solubilizados. En la figura 20 [B] se realizó la corroboración por medio de inmunodetección de la cola de poli histidinas por Western Blot, observándose los bandeos en el peso esperado de 37 kDa.

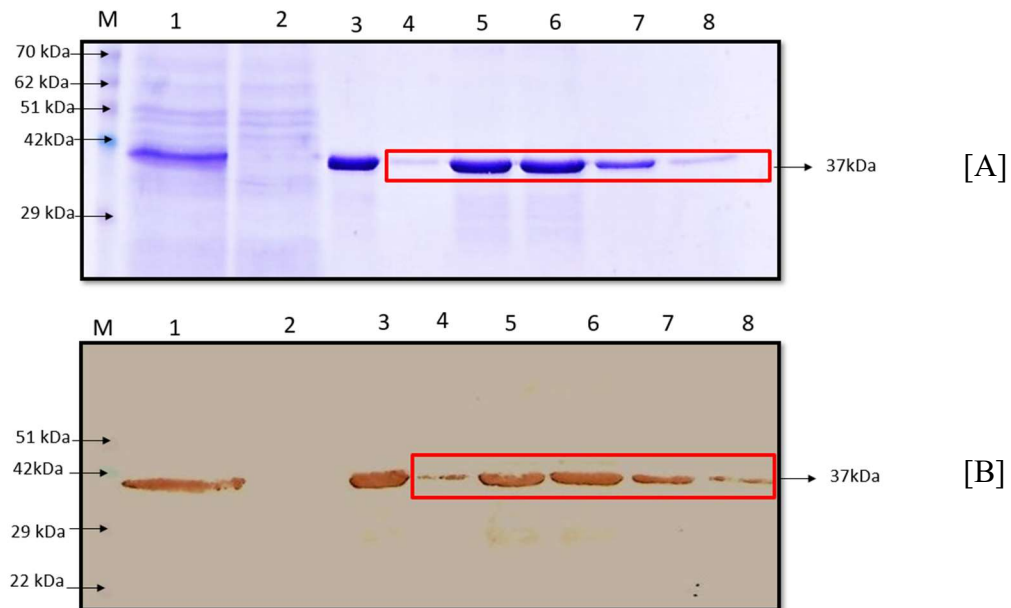


Figura 20. Análisis de purificación de la proteína rBL21-Nterminal. [A] SDS PAGE con tinción de azul de coomassie y [B] Western blot usando anticuerpos Anti-Hys; [M] Marcador de peso molecular; [1] Proteína solubilizada en Sarcocyl; [2] Fase de no pegado; [3] Fase de lavado; [4-8] elusiones.

Una vez obtenida la proteína recombinante, es imperativo una correcta solubilización y purificación a través de un sistema IMAC de forma satisfactoria como se observó para la construcción de la proteína correspondiente a la región N-Terminal de PigMAP ya que los bandeos observados tanto en el SDS-PAGE como en el Western blot corresponden al peso esperado de 37 kDa. Las etiquetas de SUMO así como la adición de la cola de poli-histidinas (6His) son fundamentales para el proceso de obtención y purificación de la proteína, ayudando en la solubilización y en la captación y pegado de regiones específicas en histidinas en la columna de resina y su posterior liberación por medio de soluciones de elusión, convirtiéndola en el sistema más usado en el mundo para la purificación de polipéptidos (**Loughran *et al.*, 2016**).

6.6. Cuantificación de proteína por Bradford

Después de obtenida de la proteína pura, a base del tratamiento con β -mercapto y Sarcosyl 8 %, se cuantificó la cantidad de proteína en el conjunto de tubos colectados que posteriormente fueron dializados y congelados a -20 °C. Se preparó la curva patrón con el estándar de albúmina de suero bovino (BSA), con reactivo de Bradford, así mismo; se preparó una dilución 1:6 de la proteína purificada PigMAP, y se preparó también con Bradford. Se programó el espectrofotómetro para Bradford (595 nm) y se cuantificó la curva patrón, así como también la muestra de proteína diluida. Se realizó una regresión lineal para cuantificar la concentración de la proteína purificada correspondiente a la región N-Terminal de PigMAP (Gráfico 1).

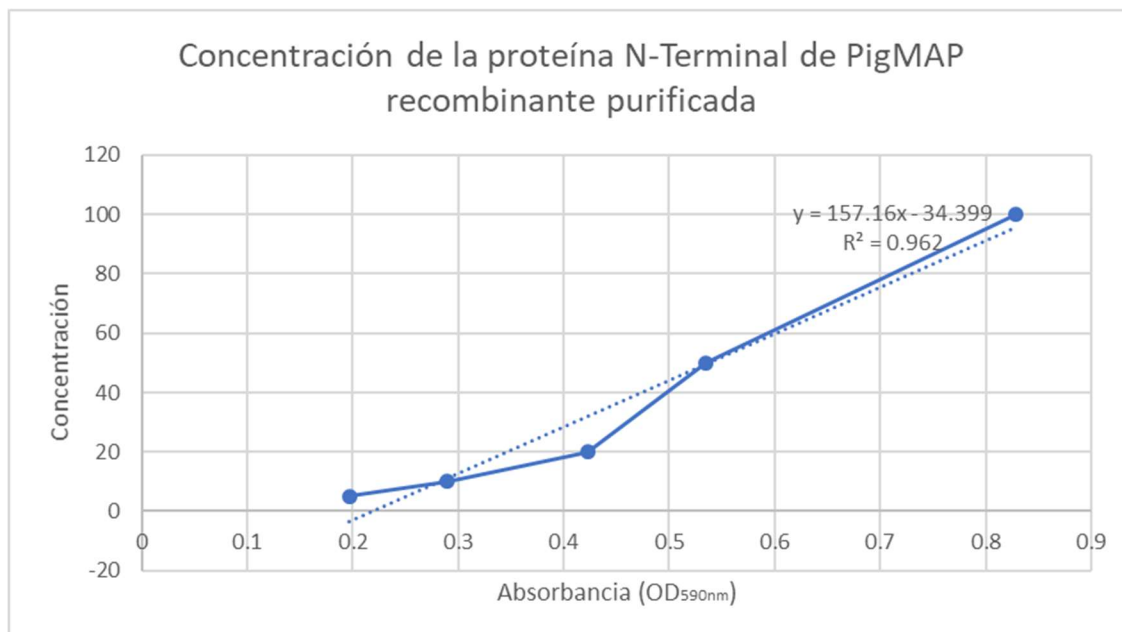


Gráfico 1. Regresión lineal de las absorbancias de la curva patrón, con la cual se obtuvo una ecuación de la recta y una R cercana a 1, por lo cual se pudo cuantificar la concentración de la proteína correspondiente a la región N-Terminal de PigMAP.

El resultado final de la concentración final de la proteína purificada correspondiente a la región N-Terminal de PigMAP recombinante fue de 200 µg/mL, esto a partir de los datos obtenidos de la curva patrón.

6.7. Antigenicidad de la proteína rPIG-MAP

Las proteínas se pueden considerar como inmunógenos potentes, teniendo la capacidad de desencadenar una respuesta inmune, y por lo tanto ser reconocidas por los anticuerpos. Sin embargo, estas deben cumplir con ciertas características para desempeñar dicho papel: tener un peso mayor a 10 kDa; el poseer una estructura compleja y que esta misma posea estabilidad (Saylor *et al.*, 2020). Estas características permitirán la elección de antígenos para el diagnóstico serológico, por lo que es necesario tener conocimiento previo de las propiedades que posean las proteínas de interés. La proteína PigMAP expresada para este trabajo cuenta con estas características, siendo seleccionada la región con mayor probabilidad de desencadenar dicha respuesta inmune, sin

embargo, fue necesario evaluar la capacidad de generar una respuesta inmune por medio de la inoculación de la proteína en un modelo murino.

Se desarrolló el experimento en ratones de la cepa CF-1 divididos de forma aleatoria en 3 grupos, un grupo inoculado con la proteína de interés; otro más con la proteína en conjunto al adyuvante ISCOM y un último grupo inmunizado con PBS solamente este diseño basado en el usado por Cuevas-Romero y colaboradores en el año 2016. Tomando muestras cada 7 días y extrayendo el suero para su mantenimiento en congelación para su posterior evaluación por medio de la prueba ELISA. De esta forma se desarrolló y estandarizó la prueba ELISA, usando como antígeno la proteína rPigMAP purificada, como anticuerpo primario los sueros de ratones que en primicia contenían anticuerpos generados por los huéspedes y finalmente un anticuerpo específico a IgG de ratón con marcaje.

La proteína rPigMAP (37 kDa) no generó reacciones secundarias ni lesiones macroscópicas aparentes ni respuesta inflamatoria en la región del cuello post-inoculación en ninguno de los animales inoculados (Figura 21).

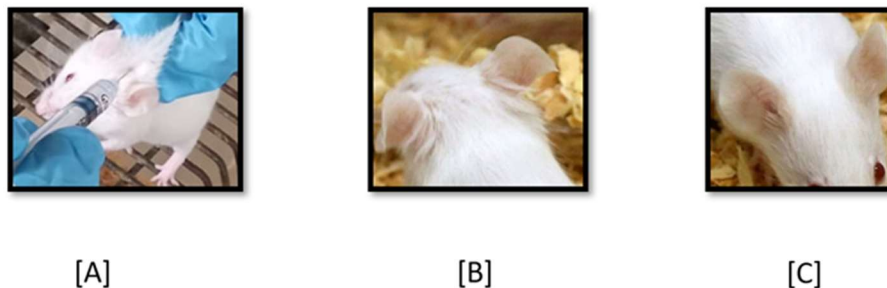


Figura 21. Región anatómica de inmunización en ratones CF-1 con la proteína rPigMAP. Inoculación correspondiente al día 0 por vía subcutánea (s.c.) en región del cuello [A], zona de inoculación al día 14 post-inoculación [B] y zona de inoculación al día 28 post-inoculación [C].

Para la estandarización de la prueba ELISA se emplearon sueros de ratones inoculados con la proteína recombinante rPigMAP correspondientes a la toma de muestras del día 28; mostró a través de una cinética donde se compararon las diferentes concentraciones de la proteína utilizada antígeno contra las unidades de absorbancia obtenidas (Gráfico 2). En esta cinética se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los grupos de interés (rPigMAP- ISCOMs y rPigMAP-PBS) en relación con el grupo negativo (ISCOMs-PBS). Esta diferencia estadística se puede observar a partir del uso de 250 ng y 300 ng de proteína recombinante, donde también se puede observar un aumento en las unidades de absorbancia en el fondo de prueba. Se observa que la cantidad de proteína para generar una diferencia estadística significativa es de 250 ng (Gráfico 2) por ello se decidió tomar esta cantidad de proteína para las pruebas subsecuentes.

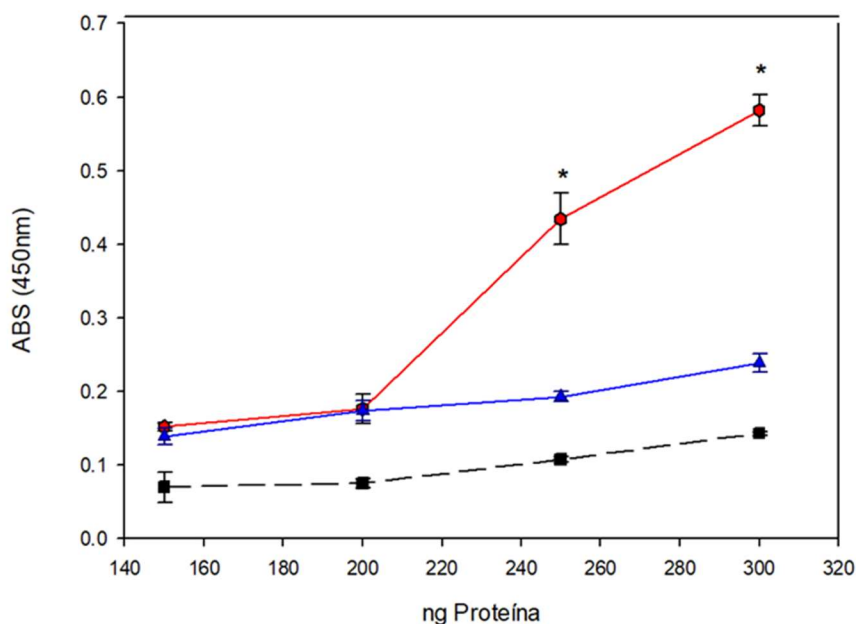


Gráfico 2. Estandarización de la prueba ELISA indirecta con la proteína rPigMAP. Grupo inmunizado con la proteína rPigMAP+PBS (—▲—); grupo inmunizado con proteína rPigMAP + ISCOM (—●—); grupo inmunizado con PBS (grupo control) (—■—)

Una vez estandarizada la prueba, se procedió a evaluar la respuesta inmune humoral en las muestras de ratones inoculados (Gráfico 3), lo cual mostró una diferencia estadísticamente

significativa ($p < 0.05$) en la producción de anticuerpos séricos específicos, que aumentaron después de la segunda dosis administrada en el día 14 y se prolongaron hasta el día 21 en los dos grupos de interés (rPigMAP- ISCOMs y rPigMAP-PBS). De la misma forma se observa un fondo de prueba elevado, observándose diferencias estadísticas a partir del día 21 de la prueba.

El aumento abrupto de los niveles de anticuerpos séricos al día 21 denota la necesidad de generar más estudios acerca del comportamiento de estos entre el día 14 y 21, siendo este primero el día donde se administró una segunda dosis en los ratones en experimentación. Así que la toma de dosis entre estos días puede generar un mejor entendimiento de la expresión de anticuerpos específicos.

Por otra parte, la cinética nos muestra una diferencia estadística baja entre el grupo de ratones inmunizados con la proteína recombinante sin el adyuvante contra el grupo inmunizado con el adyuvante y proteína hasta el día 21. A partir de este punto, caen los niveles de anticuerpos séricos en el grupo inmunizado solo con la proteína. Mientras que el grupo inmunizado con adyuvante mantiene la concentración de estos (** $p < 0.005$).

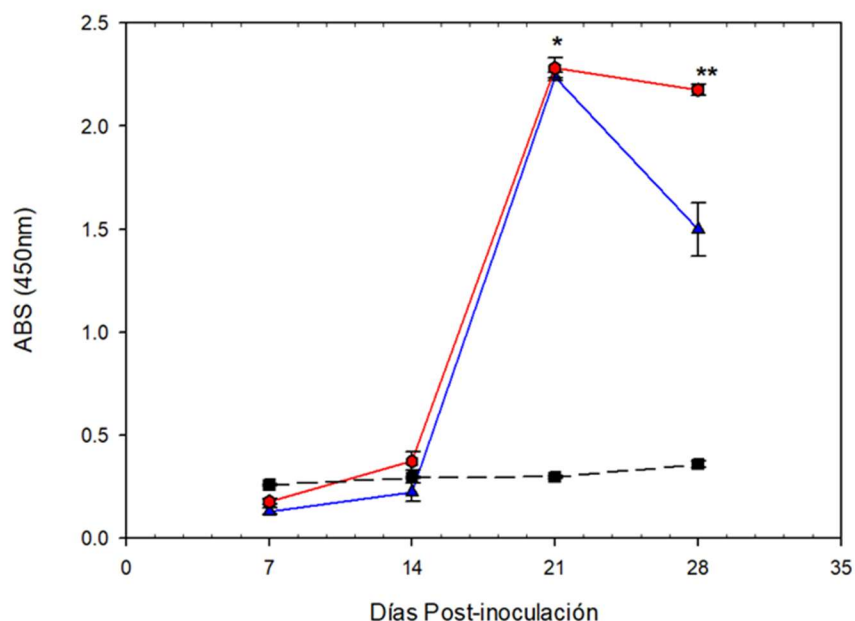


Gráfico 3. Respuesta humoral específica inducida por la proteína recombinante rPigMAP en ratones cepa CF-1. Grupo inmunizado con la proteína rPigMAP (—▲—); grupo inmunizado con proteína rPigMAP + ISCOM (—●—); Grupo inmunizado con PBS (grupo control) (—■—).

Los resultados obtenidos a partir de la prueba ELISA denotan la capacidad de la proteína tanto por si sola como en compañía de un adyuvante, de producir anticuerpos contra esta. Esta capacidad es conocida como inmunogenicidad; la cual da lugar a una respuesta inmunitaria en un huésped competente, con ello generando anticuerpos (López-Hoyos et al., 2003). Esto se observa a partir del día 14 coincidiendo con la segunda inmunización de los ratones y teniendo un aumento abrupto hasta el día 21. Posterior a este día se observó una disminución en la producción de anticuerpos en el grupo inmunizado solamente con la proteína, mientras que el grupo inmunizado con la proteína recombinante más un adyuvante mantiene constante la producción, este mantenimiento en la producción de anticuerpos se puede deber a la capacidad del adyuvante de aumentar la respuesta inmune prolongando la producción de IgG específicos contra la proteína de interés (Cárdenas-Vargas et al., 2016) y con ello confirmando la capacidad de estos anticuerpos de detectar la proteína PigMAP.

En conjunto, estos resultados indican que los IgG contra rPigMAP obtenidos en conjunto en este estudio puede tener potencial de usarse para detectar la proteína PigMAP en un ELISA tipo

sándwich en un sistema de diagnóstico, con tendencias a caracterizarlo a futuro. Finalmente, como un enfoque más ambicioso y novedoso, nuestro presente estudio fue diseñado para desarrollar por primera vez de forma recombinante esta proteína con el objetivo de usarla para generar tecnología aplicable al campo que pueda ayudar a la evaluación de bienestar animal. Cabe mencionar que este es el inicio de una nueva línea de investigación en el país y que se requerirán estudios complementarios para la generación de una prueba diagnóstico.

7. Conclusiones

- Se generó y estudió un modelo de la estructura terciaria de la proteína PigMAP con un 42.3% de homología con respecto a la estructura de la proteína ITIH4 Humana.
- Se encontró que la proteína PigMAP y la proteína humana presentan una conformación estructural similar, así como una distribución de epítomos, lo que posiblemente nos abra la posibilidad de usar ambas proteínas en el desarrollo herramientas biotecnológicas que puedan servir para ambos.
- Se generaron los primeros sistemas de expresión para la producción de manera recombinante de la proteína PigMAP, los cuales contienen todos los elementos necesarios para producir las proteínas en bacterias.
- Se subclonó con éxito los genes que codifican a los fragmentos altamente antigénicos de la proteína PigMAP en el vector de expresión pETSUMO y se transformaron bacterias *E. coli* BL21 (DE3) que serán candidatas para la subsecuente expresión y obtención de ambas proteínas.
- Se comprobó la capacidad antigénica de la proteína recombinante en un modelo murino

8. Referencias

1. Ackermann, M. 2017. Inflammation and Healing1. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 73–131, e2. doi:10.1016/b978-0-323-35775-3.00003-5
2. Alava, M., González-Ramón, N., Heegaard, P., Guzilack, S., Toussaint, M., Lipperheider, C., Madec, F., Gruys, E., Eckersall, P., Lampreave, F., Piñeiro, A. 1997. Pig-MAP, porcine acute phase proteins and standardisation of assays in Europe. *Comparative Haematology International* 7, 208–213. <https://doi.org/10.1007/BF02658691>
1. Alvarado-Madrigal, M., Chavarría-Quirós, T., Leiva-Montero, B., Mora-Román, J. 2019. Producción de proteínas recombinantes a partir de animales transgénicos: Sistemas y aplicaciones. *Tecnología en Marcha* Vol. 32, N.º 4, 2019, DOI: <https://doi.org/10,18845/tm.v32i4.4798>
2. Andrade, M., Machado, M. Schippers, D., Greene, A. 2004. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase: princípios e aplicações em odontología. *J Appl Oral Sci*; 12(1): 1-11
3. Arvizu, T, Soberanis, R., Téllez, R. 2018. Normatividad de bienestar Animal en México. 17º Congreso Internacional de MVZ especialistas en bovinos.
4. Arya, R., Bhattacharya, A., Saini, K. 2008. Dictyostelium discoideum—a promising expression system for the production of eukaryotic proteins. *The FASEB Journal*, 22(12), 4055–4066. doi:10.1096/fj.08-110544
5. Betancur, M., Sierra, A. 2017. Síndrome de estrés porcino: etiología, implicaciones metabólicas y manifestaciones clínicas. Seminario presentado en el curso “Fundamentos bioquímicos de los trastornos metabólicos”. Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 2017. 8
6. Bottegal, D. 2018. Sistemas productivos porcinos y su impacto en indicadores comportamentales y fisiológicos del estrés. Tesis Maestría pp 30-42 Universidad de Buenos Aires.

7. Bustos, J. 2018. La Importancia del Bienestar Animal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. <https://inta.gob.ar/documentos/la-importancia-del-bienestar-animal>
8. Carbajal, A. 2018. Manual de Nutrición y Dietética. Universidad Complutense de Madrid.
9. Cardona, F. 2020. Proteínas y aminoácidos. Propiedades funcionales. Universidad Politécnica de Valencia. <http://hdl.handle.net/10251/147138>
10. Cerriteño, J. 2020. Introducción a la expresión de proteínas recombinantes y vectores de expresión. Memorias del curso virtual de PCR y estrategias para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli.*, pp 12, Cened-SAI Palo Alto, CDMX.
11. Chang, Y.-Y., Li, H., Sun, H. 2017. Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) for Metalloproteomics and Phosphoproteomics. *Inorganic and Organometallic Transition Metal Complexes with Biological Molecules and Living Cells*, 329–353. doi:10.1016/b978-0-12-803814-7.00009-5.
12. Chen, H., Chu, R., Fung, H., Ho, L., Lin, J., Lee, W, Lee, Y., Yang, P. 2003. Serum acute phase proteins and swine health status. *Canadian journal of veterinary research*. 67(4), 283–290.
13. Chen, R. 2012. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1102–1107. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.15.
- Clark, D., Pazdernik, N. 2016. Recombinant DNA Technology. *Biotechnology*, 63–95. doi:10.1016/b978-0-12-385015-7.00003-x
14. Clausen H., Wandall H., Steentoft C., Stanley, P., Schnaar, R. 2017. Glycosylation Engineering. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2015-2017. Chapter 56. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453027/> doi: 10.1101/glycobiology.3e.056

15. Čobanović, N., Stanković, S. D., Dimitrijević, M., Suvajdžić, B., Grković, N., Vasilev, D., Karabasil, N. (2020). Identifying Physiological Stress Biomarkers for Prediction of Pork Quality Variation. *Animals*, 10(4), 614. doi:10.3390/ani10040614
16. Consejo Mexicano de la Carne (COMECARNE). 2021. El Bienestar Animal en México, <https://comecarne.org/>
17. Coskun O. 2016. Separation techniques: Chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
18. CUSABIO 2018. Western Blotting Protocol, Manual.
19. Daggett, V., & Fersht, A. 2003. The present view of the mechanism of protein folding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(6), 497–502. doi:10.1038/nrm1126
20. Damián J., Ungerfeld R. 2012. Indicadores de bienestar animal en especies productivas: una revisión crítica. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. Universidad de la República, Uruguay. Pp. 103-113.
21. de Aluja, A. 2011. Bienestar animal en la enseñanza de Medicina Veterinaria y Zootecnia ¿Por qué y para qué?. *Veterinaria México*, 42(2),137-147. ISSN: 0301-5092. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=4231974400>
22. Domínguez, M. 2013. "Clonación del gen de una porina/esterasa de membrana de *Alicyciphilus* sp. BQ1 en un vector de expresión, para la generación de proteína recombinante". (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/347095>
23. Eckersall, P., Bell, R. 2010. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*. 185(1), 23–27. doi:10.1016/j.tvjl.2010.04.009
24. Ehlting, C, Wolf, S, Bode, J. 2021. Acute-phase protein synthesis: a key feature of innate immune functions of the liver. *Biol Chem*. 2021 Jul 29;402(9):1129-1145. doi: 10.1515/hsz-2021-0209. PMID: 34323429.

25. Gamboa, R., Trujillo-Roldán, M. 2009. Un acercamiento a la producción de proteínas recombinantes terapéuticas de uso humano. *El Residente* Vol. IV. Número 3-2019, 87-97.
26. García, N. 2005. Las proteínas de fase aguda como biomarcadores del bienestar porcino y criterio de calidad de la carne curada, Tesis, Universidad de Zaragoza
27. Gómez, C. 2019. La bioética y el bienestar animal como valores fundamentales en la formación veterinaria. Universidad de Guadalajara. <http://www.cualtos.udg.mx/noticia/la-bioetica-y-el-bienestar-animal-como-valores-fundamentales-en-la-formacion-veterinaria>
28. Gómez, E. 2015. Valoración del bienestar animal porcino en diferentes condiciones de alojamientos, utilizando indicadores de estrés y parámetros reproductivos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
29. Gómez, M. Echenique, V. 2004. Capítulo 3: Herramientas básicas de ingenierías genética. Biotecnología y Mejoramiento vegetal, CONICET, Argentina.
30. Gondek, M., Knysz, P., Promorska, M., Ziomek, M., Bien-Kalinowska, M. 2020. Acute phase protein pattern and antibody response in pigs experimentally infected with a moderate dose of *Trichinella spiralis*, *T. britovi*, and *T. pseudospiralis*, *Veterinary Parasitology*. Volume 288, 109277, ISSN 0304-4017, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109277>.
31. González, A., Fillat, M. 2018. Aspectos Metodológicos de la Expresión de Proteínas Recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista de Educación Bioquímica (REB)*. 37 (1), 14-27, España
32. González-Ramón, N., Hoebe, K., Alava, M., van Leengoed, L., Piñeiro, M., Carmona, S., Iturralde, M., Lampreave, F., Piñeiro, A. 2000. Pig MAP/ITIH4 and haptoglobin are interleukin-6-dependent acute-phase plasma proteins in porcine primary cultured hepatocytes. *European Journal of Biochemistry*, 267(6), 1878–1885. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01195.x
33. González-Ramón, N., Hoebe, K., Alava, M., van Leengoed, L., Piñeiro, M., Carmona, S., Iturralde, M., Lampreave, F., Piñeiro, A. 2000. Pig MAP/ITIH4 and haptoglobin are interleukin-6-dependent acute-phase plasma proteins in porcine primary cultured

- hepatocytes. *European Journal of Biochemistry*, 267(6), 1878–1885. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01195.x
34. Gopal, G., Kumar, A. 2013. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. *The Protein Journal*. 32(6), 419–425. doi:10.1007/s10930-013-9502-5
 35. Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Arrowsmith, C. 2008. Protein production and purification. *Nature Methods*, 5(2), 135–146. doi:10.1038/nmeth.f.202
 36. Gulhar, R., Ashraf, M., Jialal, I. 2021. Physiology, Acute Phase Reactants. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519570>
 37. Gutiérrez, C. 2006. Aminoácidos y proteínas, Material FMVZ, UNAM
 38. Hasegawa, S., Chen, C., Yoshimoto, N., Yamamoto, S. 2020. Optimization of Flow-Through Chromatography of Proteins. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, Vol. 53, No.5, pp 214-221. DOI <https://doi.org/10.1252/jcej.20we003>
 39. Heegaard, P., Stockmarr, A., Piñeiro, M., Carpintero, R., Lampreave, F., Campbell, F., Eckersall, P., Toussaint, M., Gruys, E., Sorensen, N. 2011. Optimal combinations of acute phase proteins for detecting infectious disease in pigs. *Vet Res* 42, 50. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-50>
 40. Hernández, F. 2016. "Aplicación de un protocolo de bienestar animal en caprinos bajo un sistema de pastoreo extensivo con encierro nocturno". (Tesis de Licenciatura). Pp. 15-25 Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/435361>
 41. Jain, S., Gautam, V., Naseem, S. 2011. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 3(1), 118. doi:10.4103/0975-7406.76489
 42. Jar, A. 2014. Bienestar animal y el uso de animales de laboratorio en la experimentación científica. *Revista Argentina de Microbiología*. 46(2),77-79. ISSN: 0325-7541. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213031635001>

43. Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., von Mering, C. 2009. STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Research*, 37(Database), D412–D416. doi:10.1093/nar/gkn760
44. Jensen, P. 2018. Genetics and genomics of animal welfare. *Advances in Agricultural Animal Welfare*. 25–48. doi:10.1016/b978-0-08-101215-4.00002-x
45. Kapoor, M. 2015. How to isolate proteins, University of Calgary.
46. Khalil, R., Khalil, R. 2020. Types of acute phase reactants and their importance in vaccination (Review). *Biomedical Reports*, 12, 143-152. <https://doi.org/10.3892/br.2020.1276>
47. Khan K. H. 2013. Gene expression in Mammalian cells and its applications. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 3(2), 257–263. <https://doi.org/10.5681/apb.2013.042>
48. Khan, K. 2013. Gene expression in Mammalian cells and its applications. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 3(2), 257–263. <https://doi.org/10.5681/apb.2013.042>
49. Labrou N. E. 2014. Protein purification: an overview. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1129, 3–10. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-977-2_1
50. Loeza, P., Valdez, J., Baizabal, V., López, J. 2004. Mecanismos de replicación de los plasmidos bacterianos. *REB*, 23 (2): 71-78.
51. López-Hoyos, M., Fernández-Fresnedo, G., López-Escribano, H., De Francisco, A. 2003. Antigenicidad de las proteínas recombinantes. *Gac. Med. Bilbao*. 100,17-21.
52. Lowe, D. 2021. More Protein Folding Progress - What's It Mean?, *Science: In the pipeline*, julio-2021.
53. Lozada, I. 2008. *Proteínas Recombinantes*, Ciencias Genómicas, UNAM, México. http://www.divulgacion.ccg.unam.mx/webfm_send/8586

54. Mahalik, S., Sharma, A., Mukherjee, K. 2014. Genome engineering for improved recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 13(1). doi:10.1186/s12934-014-0177-1
55. Mahmood, T., Yang, P. 2012. Western blot: technique, theory, and troubleshooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
56. Martínez-Miró, S., Tecles, F., Ramón, M., Escribano, D., Hernández, F., Madrid, J., Orengo, J., Martínez-Subiela, S., Manteca, X., Cerón, J. 2016. Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update. *BMC Veterinary Research*. 12(1). doi:10.1186/s12917-016-0791-8
57. Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Parra, M., Cerón, J. 2001. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 17, 97–113. Recuperado a partir de <https://revistas.um.es/analesvet/article/view/16381>
58. Mayolo-Deloisa, K., Martínez, L., Rito-Palomares, M. 2012. Técnicas cromatográficas y aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol. 11, No. 3, 415-429
59. McInerney, J. 2004. Animal Welfare, economics and policy. *Animal Health, Economics Division of Defra*. Pp 5-10.
60. Moradi, M. 2021. Strategies to improve and balance the expression levels of recombinant proteins in mammalian cell lines. *Doctoral Thesis in Biotechnology*. KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden 2021.
61. Moreno, S. 2015. *Aminoácidos y Proteínas*. Universidad de Sonora, pp. 1-19.
62. Mota, D., Roldan, P., Pérez, E., Martínez, R., Hernández, E., Trujillo, M. 2014. Factores estresantes en lechones destetados comercialmente. *Número especial Vet. Méx.*, 2014. 58.
- Murata, H. 2007. Stress and acute phase protein response: An inconspicuous but essential linkage. *The Veterinary Journal*. 173(3), 473–474. doi:10.1016/j.tvjl.2006.05.008

63. Murata, H. 2007. Stress and acute phase protein response: An inconspicuous but essential linkage. *The Veterinary Journal*. 173(3), 473–474. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.05.008
64. Narayan, E., Barreto, M., Hantzopoulou, G., Tilbrook, A. 2021. A Retrospective Literature Evaluation of the Integration of Stress Physiology Indices, Animal Welfare and Climate Change Assessment of Livestock. *Animals*. 11(5), 1287. doi:10.3390/ani11051287
65. National Human Genome Research Institute (NHGRI). 1999. About the Institute. [online] <https://www.genome.gov/>
66. National Human Genome Research Institute (NHGRI). 2021. About the Institute. [online] <https://www.genome.gov/>
67. Nelson, D., Cox, M. 2008. *Lehninger principles of biochemistry*. Primera Edición. Estados Unidos.
68. Neubauer, P., Winter, J. 2001. Expression and Fermentation Strategies for Recombinant Protein Production in *Escherichia Coli*. *Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells. A Comparative View on Host Physiology*, 195–258. doi:10.1007/978-94-015-9749-4_17
69. Nopal, T. 1994. Estudio por Western blot de la respuesta inmune humoral en humanos con brucelosis y vacunados hacia algunos constituyentes de brucella. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3500532>
70. Nora, L., Westmann, C., Martins-Santana, L., Alves, L., Monteiro, L., Guazzaroni, M., Silva-Rocha, R. 2019. The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. *Microb Biotechnol*. Jan;12(1):125-147. doi: 10.1111/1751-7915.13318. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30259693; PMCID: PMC6302727.
71. O'Reilly, E., Bailey, R., Eckersall, P. 2018. A comparative study of acute-phase protein concentrations in historical and modern broiler breeding lines. *Poultry Science*. doi:10.3382/ps/pey272

72. OIE. (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2019. Acerca del bienestar animal, <https://www.oie.int/>
73. Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO). 2016. Cerdos y Producción y Sanidad Animal, <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/pigs/home.html>
74. Otter, D. (2003). PROTEIN | Determination and Characterization. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, 4824–4830. doi:10.1016/b0-12-227055-x/00980-9
75. Overton, T. 2014. Recombinant protein production in bacterial hosts. Drug Discovery Today. 19(5), 590–601. doi:10.1016/j.drudis.2013.11.008
76. Oxford University. 2019. Chapter 13: Chromatography techniques, Chemistry v 1.1. pp 298- 323, United States.
77. Packiam, K., Ramanan, R., Ooi, C., Krishnaswamy, L., Tey, B. 2020. Stepwise optimization of recombinant protein production in Escherichia coli utilizing computational and experimental approaches. Applied Microbiology and Biotechnology. doi:10.1007/s00253-020-10454-w
78. Pallarés, F., Martínez-Subiela, S., Seva, J., Ramis, G., Fuentes, P., Bernabé, A., Muñoz, A., Cerón, J. 2008. Relationship between serum acute phase protein concentrations and lesions in finishing pigs. The Veterinary Journal. 177(3), 369–373. doi:10.1016/j.tvjl.2007.04.019
79. Panichi, V., Migliori, M., De Pietro, S., Taccola, D., Andreini, B., Metelli, M., Palla, R. 2000. The link of biocompatibility to cytokine production. Kidney International. 58, S96–S103. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.07612.x
80. Paranhos, M., Ceballos, M. 2021. Benefícios econômicos e sociais relacionados à promoção do bem-estar de bovinos leiteiros e de corte. Rev. Fac. Nac. Agron. 74, S17-24 ISSN 0304- 2847 / e-ISSN 2248-7026
81. Pelley, J. 2012. Recombinant DNA and Biotechnology. Elsevier's Integrated Review Biochemistry, 161–169. doi:10.1016/b978-0-323-07446-9.00018-0

82. Pepys, M. 1998. Acute Phase Proteins. *Encyclopedia of Immunology*, 18–20. doi:10.1006/rwei.1999.0005
83. Pérez-Chabela, M., Soriano-Santos, J., Ponce-Alquicira, E., Díaz-Tenorio, L. 2015. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS como herramienta en el estudio de proteínas miofibrilares. Una revisión, *Nacameh* Vol. 9, No. 2, pp 77-96, FES Iztacala, UNAM.
84. Pihl, R., Jensen, R., Poulsen, E., Jensen, L., Hansen, A., Thøgersen, I., Dobó, J., Gál, P., Andersen, G., Enghild, J., Thiel, S. 2021. ITIH4 acts as a protease inhibitor by a novel inhibitory mechanism. *Sci Adv.* Jan 8;7(2):eaba7381. doi: 10.1126/sciadv.aba7381. PMID: 33523981; PMCID: PMC7793589.
85. Piñeiro, C., Piñeiro, M., Morales, J., Andrés, M., Lorenzo, E., Pozo, M. del, Alava, M., Lampreave, F. 2009. Pig-MAP and haptoglobin concentration reference values in swine from commercial farms. *The Veterinary Journal.* 179(1), 78–84. doi:10.1016/j.tvjl.2007.08.010
86. Piñeiro, M., Piñeiro, C. (2008). Pig-MAP, Proteína de Fase Aguda Principal en el cerdo. *PigCHAMP-Pro Europa*. Pp 1-2
87. Pomorska-Mól, M., Krzysztof, K., Pejsak, Z., Markowska-Daniel, I. 2013. Analysis of the acute-phase protein response in pigs to clinical and subclinical infection with H3N2 swine influenza virus. *Influenza and Other Respiratory Viruses.* 8(2), 228–234. doi:10.1111/irv.12186
88. Ramírez-Carreto, S., Miranda-Zaragoza, B., Rodríguez-Almazán, C. 2021. Purificación de proteínas. *Memoria del XLVIII Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM.* ISSN-0188-137X
89. Razinkov, V., Kleemann, G. 2017. Preclinical and clinical formulation studies. *High-Throughput Formulation Development of Biopharmaceuticals*, 45–74. doi:10.1016/b978-1-907568-63-3.00003-7
90. Rigüero, V., Clifford, R., Dawley, M., Dickson, M., Gastfriend, B., Thompson, C., Wang, S., O'Connor, E. 2020. Immobilized metal affinity chromatography optimization for poly-

- histidine tagged proteins. *Journal of Chromatography A*, 1629, 461505. doi:10.1016/j.chroma.2020.461505
91. Román, R. 2018. Desarrollo de procesos de producción de proteínas bioterapéuticas: Aumento de productividad específica en células HEK293. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
 92. Rosano, G., Morales, E., Ceccarelli, E. 2019. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: a 5-year update. *Protein Science*. doi:10.1002/pro.3668
 93. Roy, S., Kumar, V., Bohera, B. 2017. Acute Phase Proteins and their Potential Role as an Indicator for Fish Health and in Diagnosis of Fish Disease. *Protein & Peptide Letters*. Volume 24, Issue 1, 2017. <https://doi.org/10.2174/0929866524666161121142221>
 94. Rozalén, J., Ceña, V., Jordán, J. (2003). Terapia génica. Vectores de expresión. *OFFARM*. vol 22 núm 8 septiembre.
 95. Saco, Y. 2013. Proteínas de fase aguda como biomarcadores en medicina y producción porcina, Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, ISBN: 9788449038327
 96. Samaniego, M. 2007. Clonación, sobre-expresión y purificación de las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus en *Escherichia coli*. Repositorio IPICYT.
 97. Serrano, M., Sainz, T. (2006). Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Volumen 37, No. 1, enero-marzo.
 98. Shi, R., Xiao, G., Dillon, T., Ricci, M., Bondarenko, P. 2020. Characterization of therapeutic proteins by cation exchange chromatography-mass spectrometry and top-down analysis. *mAbs*, 12(1), 1739825. doi:10.1080/19420862.2020.1739825.
 99. Singh, K., Gupta, A., Bharti, C., Sharma, H. 2021. Emerging techniques of western blotting for purification and analysis of protein. *Futur J Pharm Sci* 7, 239. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00386-1>

100. Skovgaard, K., Mortensen, S., Boye, M., Poulsen, K., Campbell, F., Eckersall, P., Heegaard, P. 2009. Rapid and widely disseminated acute phase protein response after experimental bacterial infection of pigs. *Veterinary research*. 40(3), 23. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009006>.
101. Sorensen, N., Tegtmeier, C., Andresen, L., Piñeiro, M., Toussaint, M., Campbell, F., Lampreave, F., Heegaard, P. 2006. The porcine acute phase protein response to acute clinical and subclinical experimental infection with *Streptococcus suis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 113(1-2), 157–168. doi:10.1016/j.vetimm.2006.04.008.
102. Spadiut, O., Capone, S., Krainer, F., Glieder, A., Herwig, C. 2014. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. *Trends Biotechnol*. 2014 Jan;32(1):54-60. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.10.002. Epub 2013 Oct 31. PMID: 24183828; PMCID: PMC3906537.
103. Srivastava, N., Singh, A., Kumari, P., Nishad, J. H., Gautam, V., Yadav, M., Bharti, R., Kumar, D., Kharwar, R. (2021). Advances in extraction technologies: isolation and purification of bioactive compounds from biological materials. *Natural Bioactive Compounds*, 409–433. doi:10.1016/b978-0-12-820655-3.00021-5.
104. Strimbu, K., Tavel, J. 2010. What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463–466. doi:10.1097/coh.0b013e32833ed177.
105. Surat, P. 2019. What are Recombinant Proteins?. *News-Medical*. Retrieved on November 17, 2020 from <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-are-Recombinant-Proteins.aspx>.
106. Tamay, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de las PCR en tiempo real. *Tecnología en Salud*, Vol. 2, No. 2, pp 70-79 106. Tan, M., Teh, Y., Ho, K., Stanslas, J. 2019. An Application of pET SUMO Protein Expression System in *Escherichia coli*: Cloning, Expression, Purification, and Characterisation of Native Kras4BG12V Oncoprotein. *The Protein Journal*. doi:10.1007/s10930-019-09872-1.

107. Te Pas, M., Hoekman, A., Smits, M. 2011. Biomarkers as management tools for industries in the pork production chain. *Journal on Chain and Network Science*, 11(2), 155–166. doi:10.3920/jcns2011.qpork.
108. Tothova, C., Novotny, J., Nagy, O., Hornakova, P., Zert, Z., Varga, M., Medvecky, L., Vdoviakova, K., Danko, J., Petrovova, E. 2019. Changes in the Acute-Phase Protein Concentrations and Activities of Some Enzymes in Pigs Following the Repair of Experimentally Induced Articular Cartilage Defects Using Two Types of Biocement Powder. *Animals*. 9(11), 931. doi:10.3390/ani9110931.
109. Tripathi, N., Shrivastava, A. 2019. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 7. doi:10.3389/fbioe.2019.00420.
110. Viguera, A. 2003. Estructura y Estabilidad de las proteínas. *Ciencias Genómicas, Investigación y ciencia*, marzo, 70-77.
111. Westermeier, R. 2005. *Electroforesis in Practice*. 4^a ed., Ed. Wiley-VHC, Germany.
112. Yañez, A. 2014. "Bienestar animal en lechones: valoración del estrés por efecto del retiro de la camada o de la madre". (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación General de Estudios de Posgrado, UNAM. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3482404>. Pp 28-36.
113. Young, C., Britton, Z., Robinson, A. 2012. Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal*. 7(5), 620–634. doi:10.1002/biot.201100155.
114. Yousefi, R. 2020. The four levels in protein structure. *Biochemistry Online Course*. Shiraz University.
115. Saylor, K., Gillam, F., Lohneis, T., & Zhang, C. (2020). Designs of Antigen Structure and Composition for Improved Protein-Based Vaccine Efficacy. *Frontiers in immunology*, 11, 283. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00283>.

116. Cuevas-Romero, J., Rivera-Benítez, J., Hernández-Baumgarten, E., Hernández-Jaúregui, P., Vega, M., Blomström, A.-L., Berg, M., Baule, C. (2016). Cloning, expression and characterization of potential immunogenic recombinant hemagglutinin-neuraminidase protein of Porcine rubulavirus. *Protein Expression and Purification*, 128, 1–7. doi:10.1016/j.pep.2016.08.002.
117. Cárdenas-Vargas, A., Pedroza-Roldán, C., Elizondo-Quiroga, D. (2016). Adyuvantes para vacunas: tipos, aplicaciones y modos de acción. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 47(3),29-47.[fecha de Consulta 30 de Mayo de 2023]. ISSN: 1870-0195. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57956611003>

9. Anexos

Anexo A. índices complementarios

Índice de Cuadros	Página
Cuadro 1. Metabolitos usados como biomarcadores de bienestar animal en cerdos.	5
Cuadro 2. Niveles de estructura de las proteínas	8
Cuadro 3. Cuadro comparativo de diferentes sistemas de expresión de proteínas recombinantes	16
Cuadro 4. Condiciones de la reacción PCR punto final	28
Cuadro 5. Protocolo de amplificación de los genes de interés N-Terminal y C-Terminal de PigMAP mediante PCR punto final.	28
Cuadro 6. Curva de albúmina para cuantificación de proteína por el método de Bradford.	34

Índice de Figuras	Página
Figura 1. Niveles estructurales de las proteínas	7
Figura 2. Síntesis de las proteínas de fase aguda	11
Figura 3. Interactoma de la proteína PigMAP	13
Figura 4. Componentes de un vector plasmídico de expresión recombinante en <i>E. coli</i>	18
Figura 5. Mapa del vector de clonación pJET1.2/blunt	19
Figura 6. Mapa del vector de expresión pET SUMO	20
Figura 7. Mapas del vector de resguardo pJET1.2/blunt donde se han clonado los genes de interés.	27
Figura 8. Estructura terciaria de la proteína PigMAP (ITIH4 Pig) e ITIH4 humana.	39
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 1 %, tinción con bromuro de etidio de la PCR punto final de gradiente de temperatura del plásmido pJET-NTerminal de las células transformadas.	40

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 1 %, tinción con bromuro de etidio de la PCR punto final de gradiente de temperatura del plásmido pJET-CTerminal de las células transformadas.	41
Figura 11. Mapas del vector de expresión donde se han clonado los genes de interés N-Terminal y C-Terminal respectivamente.	42
Figura 12. Transformación de células competentes <i>E. coli</i> TOP 10 con el vector de expresión pETSUMO-NTerminal.	44
Figura 13. Transformación de células competentes <i>E. coli</i> TOP 10 con el vector de expresión pETSUMO-CTerminal.	45
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1%, tinción con bromuro de etidio de la PCR punto final para determinar correcta orientación de los insertos de interés respecto al vector de expresión pETSUMO.	46
Figura 15. Colonias <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformadas con el vector de expresión;	48
Figura 16. Expresión de la proteína rBL21-Nterminal PigMAP.	50
Figura 17. Expresión de la proteína rBL21-Cterminal PigMAP.	52
Figura 18. Análisis de cuerpos de inclusión de la proteína rBL21-Nterminal.	53
Figura 19. Análisis de cuerpos de inclusión de la proteína rBL21-Nterminal.	54
Figura 20. Análisis de purificación de la proteína rBL21-Nterminal.	55
Figura 21. Región anatómica de inmunización en ratones CF-1 con la proteína rPigMAP.	58

Índice de Gráficos

	Página
Gráfico 1. Regresión lineal de las absorbancias de la curva patrón, con la cual se obtuvo una ecuación de la recta y una R cercana a 1, por lo cual se pudo cuantificar la concentración de la proteína correspondiente a la región N-Terminal de PigMAP.	57
Gráfico 2. Estandarización de la prueba ELISA indirecto con la proteína rPIG-MAP.	59
Gráfico 3. Respuesta humoral específica inducida por la proteína recombinante rPigMAP en ratones cepa CF-1.	61

Anexo B Abreviario

<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
EC AMV	Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos
ARN	Ácido Ribonucleico
CgA	Cromogranina A
COM ECARNE	Consejo Mexicano de la Carne
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación
HPA	Hipotalámico-Pituitario-Adrenal
IgA	Inmunoglobulina A
IL-18	Interleucina-18
ITI	inhibidor de tripsina inter- α
ITIH4	Inter- α - trypsin inhibitor heavy chain
JHU	Johns Hopkins University
MCS	Sitio de Clonación Múltiple
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHG RI	National Human Genome Research Institute
NOM	Norma Oficial Mexicana
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
PFA	Proteínas de Fase Aguda
pH	Potencial de Hidrógeno

AP	PigM	Pig major acute phase protein
ED	TEM	Tetrametiletilendiamina
	IMAC	Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados
	E. coli	Escherichia coli
α	TNF-	Factor de necrosis tumoral alfa

Anexo C.

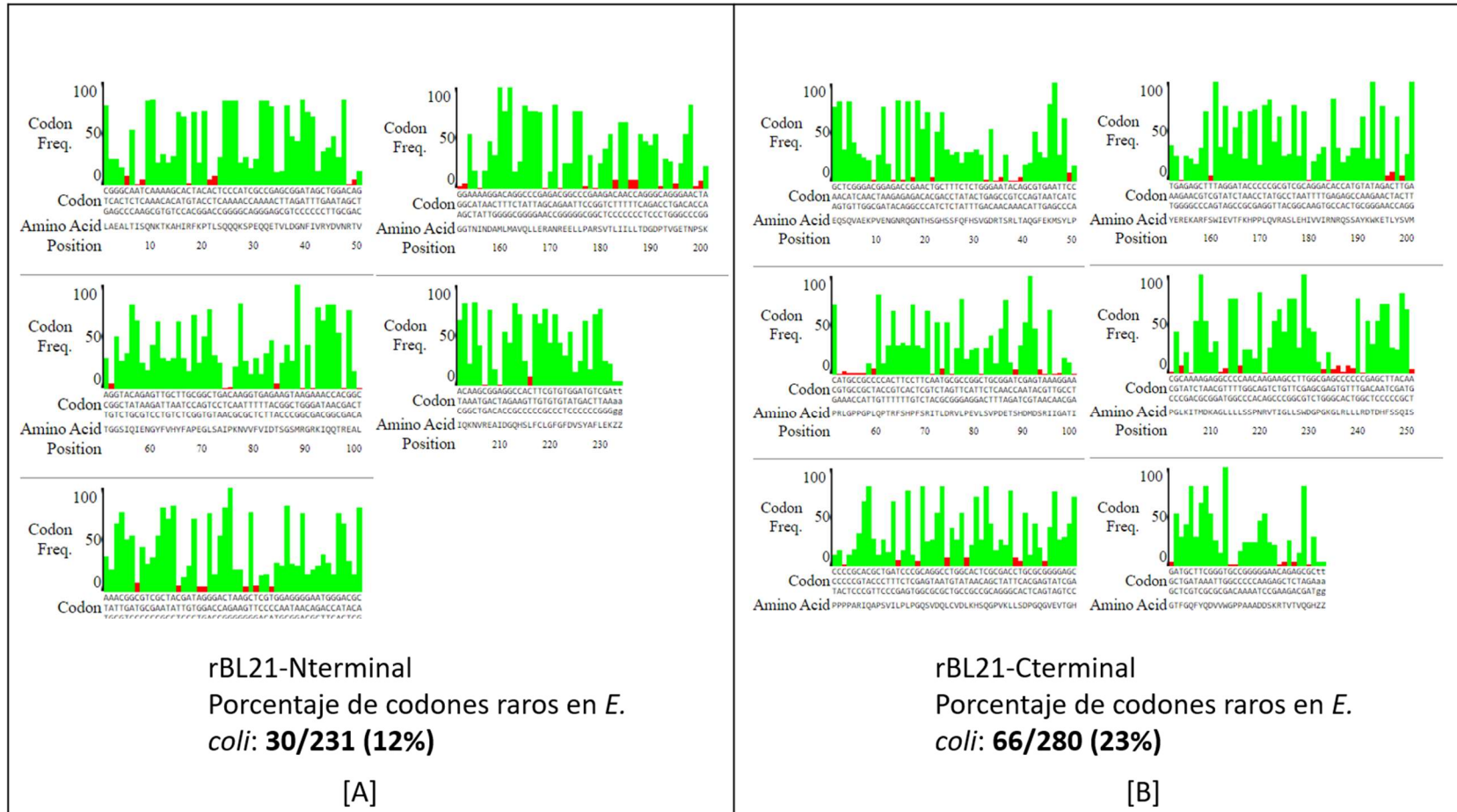


Figura C1. Análisis de secuencias con *E. coli* Codon Usage Analysis 2.0. [A] Análisis de presencia de codones raros en la secuencia correspondiente a rBL21-Nterminal. [B] Análisis de presencia de codones raros en la secuencia correspondiente a rBL21-Cterminal.

Anexo D. Actividades extras realizadas por el sustentante.

Diplomado:

Diplomado en Biotecnología veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNAM
[octubre 2021] – [diciembre 2022]

Cursos

- Abcam Western blot certificate (septiembre 2022)
- Mini-course on SDS-PAGE (enero, 2023)
- Curso Práctico de Bioinformática aplicada (enero 2023).
- Curso básico de acoplamiento molecular (mayo, 2023).

Publicaciones

Artículo aceptado para su publicación

- Castro-Roca, C., De Loera-Ortega, Y., Cerriteño-Sánchez, J.; Cuevas-Romero, J., García-Contreras, A., (2023). SISTEMA DE EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LA PROTEÍNA DE FASE AGUDA “Pig-MAP” PARA SU USO COMO BIOMARCADOR DE ESTRÉS. SOCIEDADES RURALES, PRODUCCIÓN Y MEDIO AMBIENTE AÑO 2023 VOL.22 NÚM 44

Participación en cursos y conferencias

- Conferencista invitado a “Curso Teórico Internacional: Aplicación de herramientas Biotecnológicas en Medicina Veterinaria”, realizado en las instalaciones del CENID-Salud Animal e Inocuidad, sede Palo Alto del INIFAP, del 06 al 08 de septiembre de 2022.
- Miembro del comité organizador del 11vo. Congreso Internacional Red Mexicana sobre Conservación y Utilización de los recursos Zoogenéticos. 9-11 de noviembre de 2022. Coyoacán, CDMX.
- Instructor del “Curso-Taller Práctico: Aplicación de Herramientas Biotecnológicas en Medicina Veterinaria.” Realizado en el CENID-Salud Animal e Inocuidad se Palo Alto del INIFAP, del 7 a 10 de marzo de 2023.
- Conferencista invitado a Curso: tecnologías para el área pecuaria basadas en biotecnología aplicada, realizado en las instalaciones de la Universidad Tecnológica del Valle de Toluca. Conferencia: “Producción y Caracterización de la Proteína Recombinante rPig-MAP para su uso en la Evaluación del Bienestar Animal de los Cerdos”. 19 de mayo de 2023, Lerma de Villada, Edo.Mex

Trabajos presentados en congresos nacionales e internacionales

- “Uso de sistemas bacterianos para la producción de la proteína de fase aguda PigMAP con potencial uso en la evaluación de bienestar animal en cerdos”. Agroevento 2022 INIFAP 23 de septiembre de 2022 Tepatitlán de Morelos, Jalisco.

Reconocimiento: Primer lugar en modalidad de Resumen Técnico del Área Pecuaria.

- “Cloning and expression of PigMAP protein by recombinant system for its potential use in the evaluation of animal welfare in pigs”. XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica. 16 de octubre de 2022. Mérida, Yucatán.
- “Clonación y expresión de la proteína PigMAP a través de un sistema recombinante con potencial uso en la evaluación de bienestar animal en cerdos”. Reuniones científicas 2022. Villahermosa, Tabasco.
- “Clonación y expresión de la proteína PigMAP a través de un sistema recombinante con potencial uso en la evaluación de bienestar animal en cerdos. 5to Foro Interdisciplinario de Investigación Científica 2022. Universidad Autónoma del Estado de México 15 y 16 de noviembre de 2022”. Amecameca, Estado de México.
- “Proteínas recombinantes como herramientas de evaluación en bienestar animal para sistemas de producción porcinas.” 11vo Congreso Internacional Red Mexicana sobre Conservación y Utilización de los recursos Zoogenéticos. 9- 11 de noviembre de 2022. Coyoacán, CDMX.
- “Producción y caracterización de una proteína de fase aguda PigMAP recombinante para su potencial uso en la evaluación de bienestar animal.” 1er Congreso Nacional e Internacional de Ciencias Multidisciplinarias. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 3- 5 de mayo de 2023 Cuautitlán, Estado de México.

Sistema de expresión recombinante de la proteína de fase aguda “Pig-MAP” para su uso como biomarcador de estrés

*Carlos A. Castro Roca,^{1,3} Yasmin G. De Loera Ortega,² José Luis Cerriteño Sánchez,³ Julieta S. Cuevas Romero³ y Adelfa del C. García Contreras⁴

Resumen. Los cerdos dentro de producciones tecnificadas hacen frente a condiciones que pueden generar estrés, relacionado con la disminución de bienestar animal. El uso de biomarcadores; moléculas que sintetizan y liberan los animales en condiciones específicas, nos pueden ayudar en la medición de parámetros para la evaluación del bienestar animal. Las proteínas de fase aguda son proteínas plasmáticas secretadas en el hígado como respuesta de fase aguda, debido a infecciones, inflamación, daño tisular o estrés. PigMAP es una glicoproteína de fase aguda, secretada por los cerdos. Por ello se seleccionó y clonó la porción N-terminal correspondiente a esta proteína en el vector pJET1.2/blunt y se usó para amplificar y subclonar al vector de expresión pETSUMO (pETSUMO-Nterminal), finalmente, el plásmido recombinante se corroboró mediante PCR y prueba de secuenciación. Por lo tanto, se obtuvo por primera vez un sistema de expresión para la proteína recombinante PigMAP con potencial para desarrollar un sistema de evaluación del bienestar animal en cerdos.

Palabras clave: Biomarcadores; Estrés; Bienestar animal; Pig-MAP; Producción porcina.

¹ Maestría en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, CDMX, México.

² Licenciatura en MVZ. Departamento de Ciencias Pecuarias, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Edo. de México.

³ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP, CDMX, México.

⁴ Laboratorio de imagenología Zootécnica y Gestión Ambiental. Departamento Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, CDMX, México.

* Autor de correspondencia: e-mail: cerriteno.jose@inifap.gob.mx

Abstract. Pigs in technical productions face conditions that can generate stress, which is related to a decrease in animal welfare. The use of biomarkers, molecules that are synthesized and released by animals under specific conditions, can help in the measurement of parameters for the evaluation of animal welfare. Acute phase proteins are plasma proteins secreted in the liver as an acute phase response to infections, inflammation, tissue damage, or stress. PigMAP is an acute-phase glycoprotein that is secreted by pigs. Therefore, the N-terminal portion corresponding to this protein was selected and cloned into the pJET1.2/blunt vector and used to amplify and subclone the pETSUMO expression vector (pETSUMO-N-terminal). The recombinant plasmid was confirmed by PCR, and sequencing tests. Therefore, an expression system for the PigMAP recombinant protein was obtained for the first time, with the potential to develop an animal welfare assessment system for pigs.

Key words: Biomarkers; Stress; Animal Welfare; PigMAP; Swine Production.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial se ha generado una gran cantidad de información y metodologías diferentes para cuantificar y evaluar el bienestar de los animales, siguiendo métodos de observación directa para evaluar el comportamiento, utilizando sistemas o protocolos de calificación como herramientas de evaluación, sin embargo, estos indicadores (Cuadro 1) sólo permiten evaluar las condiciones de bienestar animal de forma indirecta durante los procesos de producción (Damian y Ungerfeld, 2012; Muñoz, 2014).

Aunado a ello, existe la posibilidad de realizar evaluaciones de indicadores sanguíneos (Cuadro 1), los cuales se sabe que están relacionados con la presencia de estrés y, por lo tanto, reflejan una alteración en el bienestar animal, sin embargo, se consideran invasivos para el animal al momento de tomar la muestra (Muñoz, 2014; Giergel *et al.*, 2021).

Cuadro 1. Indicadores comunes de evaluación del bienestar animal para determinar el desempeño del sistema de producción

	Indicador de comportamiento	Indicadores sanguíneos
1	Condición corporal	Hormonas: ✓ Adrenocorticotropa (ACTH)- Concentración de cortisol ✓ Catecolaminas ✓ Prolactina
2	Estado de salud	Bioquímica: ✓ Glucosa – incremento de la glicemia ✓ Lactato
3	Presentación de lesiones	Hematológicas: ✓ Leucocitos ✓ Eritrocitos ✓ Monocitos ✓ Linfocitos ✓ Neutrófilos Proteínas de fase aguda: ✓ Haptoglobina ✓ Proteína C-Reactiva ✓ Proteína amiloide A sérica ✓ Pig-MAP (ITIH4 pig)
4	Diámetro de la zona de fuga	Proteínas de fase aguda: ✓ Haptoglobina ✓ Proteína C-Reactiva ✓ Pig-MAP (ITIH4 pig)
5	Tendencia agresiva, estereotipias	✓ Catecolaminas
6	Comportamiento social	Hormonas: ✓ Catecolaminas ✓ Adrenocorticotropa (ACTH)- Concentración de cortisol ✓ Cromogranina A

Chen *et al.*, 2003; Tadich *et al.*, 2003; Piñeiro *et al.*, 2009; Tadich *et al.*, 2009; Muñoz, 2014; Hernández, 2016; Martínez-Miró *et al.*, 2016; Heegaard *et al.*, 2011; Hennig-Pauka *et al.*, 2019.

Sin embargo, la creación de herramientas de diagnóstico que permitan cuantificar el efecto fisiopatológico generado como respuesta a un estímulo ambiental sobre el individuo, y que sobrepasa su sistema homeostático y con ello, disminuye su eficacia biológica, es fundamental. Estos elementos permitirían de manera predictiva y diagnóstica valorar una alteración mediante la expresión y cuantificación de algunos elementos conocidos también como biomarcadores, definiendo como marcador biológico o biomarcador a una molécula biológica, que se encuentra en la sangre, incluidos otros fluidos o tejidos, que se expresa como un signo de un proceso normal o anormal, o de una condición o enfermedad; de los cuales su presencia está considerada como una respuesta a intervenciones terapéuticas, toxicológicos, de susceptibilidad o riesgo, diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad o condición que puede representar una valoración negativa del bienestar (Muñoz, 2014; Martínez-Miró *et al.*, 2016; Myers *et al.*, 2017; O'Reilly *et al.*, 2018).

Partiendo de ello, una oportunidad práctica y con buenos resultados es la utilización de biomarcadores que permiten identificar aquellos metabolitos que se liberan en el organismo y que repercutirán en la salud, y por ende en la alteración del bienestar animal. Algunos son las llamadas Proteínas de Fase Aguda (PFA), que corresponden a un grupo de proteínas plasmáticas que modifican su concentración en respuesta a procesos de inflamación causados por lesiones tisulares, infecciones, trastornos inmunológicos o estrés. Por lo que, pueden tener una función importante, no solo en el área clínica, sino también en la evaluación de las buenas prácticas de producción animal (Tóthová *et al.*, 2019; Gulhar *et al.*, 2021). La utilización de PFA para la evaluación del bienestar animal durante diferentes eventos dentro del ciclo de vida de la producción porcina puede dar información puntual de los momentos específicos en que estas son producidas y con ello, buscar la mejora en aquellos manejos que están generando su presentación (Martínez-Miró *et al.*, 2016; Gulhar *et al.*, 2021). Las principales PFA positivas reportadas en cerdos son la Haptoglobina, Amiloide A sérico, proteína C reactiva y la Pig Major Phase Protein (Pig-MAP), proteínas que han mostrado su incremento en modelos experimentales relacionados con estrés físico o psicológico, trauma quirúrgico o infecciones bacterianas o virales (Piteiro *et al.*, 2009; Heegaard *et al.*, 2011; Cray, 2012; Hennig-Pauka *et al.*, 2019).

A lo largo de décadas de investigación sobre las técnicas de recombinación genética se han logrado una serie de avances muy relevantes que en la mayoría de los casos resuelven problemas muy específicos. Por lo que, la generación de herramientas para realizar diagnósticos a nivel molecular, y detectar la presencia de biomarcadores, los cuales identifican la vulnerabilidad a ciertas enfermedades o problemas, es de gran valor dependiendo de las necesidades del mercado o los productores, abarcando distintas especies como porcinos, ovinos, bovinos, abejas, peces, pollos, entre otros. Actualmente

en el mercado internacional hay gran variedad de proteínas recombinantes (PR) para un amplio abanico de aplicaciones, lo que ha llegado a constituir toda una revolución en el mercado biotecnológico y a la vez ha impulsado la investigación en este campo (Amaro, 2014; Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004; Sánchez y Rosales, 2017).

La producción de proteínas recombinantes (PR) se ha utilizado cada vez más en la investigación para obtener proteínas específicas para estudios biofísicos y estructurales, con fines diagnósticos y terapéuticos, así como para aplicaciones emergentes, desarrollando nuevas moléculas recombinantes con propiedades farmacocinéticas mejoradas y descubriendo nuevas aplicaciones clínicas debido a la alta afinidad y especificidad que pueden generar (Oliveira y Domingues, 2018). Por lo que, el objetivo de esta investigación fue la obtención de un sistema de expresión recombinante de Pig-MAP, para su implementación como biomarcador de diagnóstico enfocado en el bienestar animal aplicado a cerdos.

MATERIAL Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de virología II perteneciente al Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) sede palo alto del INIFAP. Se procedió a la estimación de algunas características bioquímicas importantes de la proteína de fase aguda PigMAP, para ello se realizó la predicción de la distribución de epítopos, la estimación del peso molecular y de su estructura terciaria, correspondientes a la proteína Pig-MAP (número de acceso: 7VFR-B5X3016), mediante el uso de diferentes paquetes bioinformáticos disponibles como el software PyMol y DNASTar, (DNASTAR) y sus respectivos métodos de validación para seleccionar la región más adecuada para producir de manera recombinante la proteína de interés.

Se determinó la hidrofobicidad utilizando el algoritmo de Kyte-Doolittle, para el caso de las regiones antigénicas se predijeron mediante el algoritmo de Jameson-Wolf, la probabilidad de superficie se determinó implementando el algoritmo de Emini, mientras que las regiones transmembranales se corroboraron con el servidor TMHMM Server v. 2.0.

Posteriormente se seleccionaron dos regiones adecuadas para su producción y se diseñaron iniciadores que hibridan en los genes que codifican para los dos fragmentos ubicados en el N- y C- terminal de la proteína Pig-MAP. Se procedió a la elección de dichas regiones, ya que contienen los epítopos más inmunogénicos y, por lo tanto,

los mejores candidatos para la clonación y expresión de la proteína de interés para su producción de manera recombinante. Dichos fragmentos fueron amplificados a partir de cDNA obtenido de un bazo de cerdo clínicamente sano, este cDNA fue clonado en un vector comercial de selección positiva o vector de resguardo pJET1.2/blunt (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific) para su mantenimiento en el laboratorio. La porción correspondiente al N-terminal fue subclonada en el vector de expresión pET SUMO (Champion™ pET SUMO expression vector, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) para la expresión de la proteína. A continuación, se realizó la transformación en células competentes de *E. coli* Top 10 (*E. Coli One Shot*® TOP10, Invitrogen Life Sciences) para la obtención del fragmento de interés ligado al vector de expresión para su caracterización por PCR y posterior secuenciación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un punto importante a considerar en el diseño de biomarcadores veterinarios es la relación costo-beneficio y el hecho de poder garantizar que esta sea compatible con métodos de detección para un buen análisis clínico. A día de hoy, la biotecnología ofrece grandes oportunidades para solucionar este tipo de problemas tecnológicos con un alto impacto, un ejemplo de ello, es la utilización de la biología molecular, la cual nos brinda la posibilidad de diseñar las llamadas proteínas recombinantes mediante el uso de *Escherichia coli* (*E. coli*), microorganismo que nos permite la producción de estas proteínas (más de 30.000 proteínas expresadas y purificadas con éxito), con fines diagnósticos, terapéuticos o vacunales (Kielkopf *et al.*, 2021).

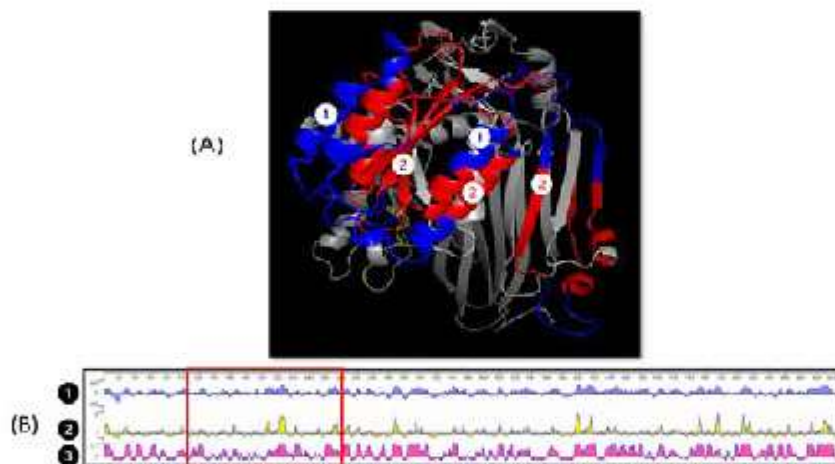
Para poder generar la síntesis de una proteína recombinante, es necesario considerar las propiedades químicas y biológicas (Blanco *et al.*, 2010), por ello, el primer paso de esta investigación fue identificar el peso molecular y las características bioquímicas básicas de la proteína de interés, en este caso de la Pig-MAP. Los primeros resultados obtenidos nos permitieron estimar el peso molecular, el cual fue de 100.36 kDa con 907 residuos de aminoácidos, de acuerdo con la literatura, el peso molecular reportado para Pig-MAP se encuentra en un rango de 26, 43-55, 115-120 kDa respectivamente (Lampreave *et al.*, 1994; González-Ramón *et al.*, 1995; Piñeiro *et al.*, 2004; Heegaard *et al.*, 2013).

Posteriormente, se observó una región hidrofóbica en el extremo N-terminal de la proteína, siendo el resto de la proteína altamente hidrofílica. Esta característica de hidrofobicidad puede ocasionar problemas en la purificación y solubilización de la proteína,

además de que no contiene epítopos de interés, por ello se descartó para expresión, además se puede considerar con un carácter variable, el cual puede estar influenciado por características ambientales como el origen de la cepa aislada (Blanco *et al.*, 2010).

Adicionalmente, se pudo determinar en la proteína Pig-MAP la presencia de dos porciones ubicadas en el N-terminal y C-terminal, las cuales expresan el mayor índice de antigenicidad, de probabilidad de superficie, sin regiones hidrofóbicas y más de 10 epítopos (Figura 1).

Figura 1. Predicción de las principales características estructurales de la proteína Pig-MAP



[A] Predicción de la estructura terciaria de la proteína Pig-MAP (ITIH4 Pig).

[A-1] Estructura que corresponde a un fragmento del N-Terminal, seleccionado en este trabajo.

[A-2] Las zonas de los principales epítopos presentes, seleccionados como mejores candidatos a expresión.

[B] Algoritmos de predicción de: Hidrofobicidad a partir del algoritmo Kyte-Doolittle.

[B-1] Probabilidad de superficie de Emini.

[B-2] Índice de antigenicidad de Jameson-Wolf.

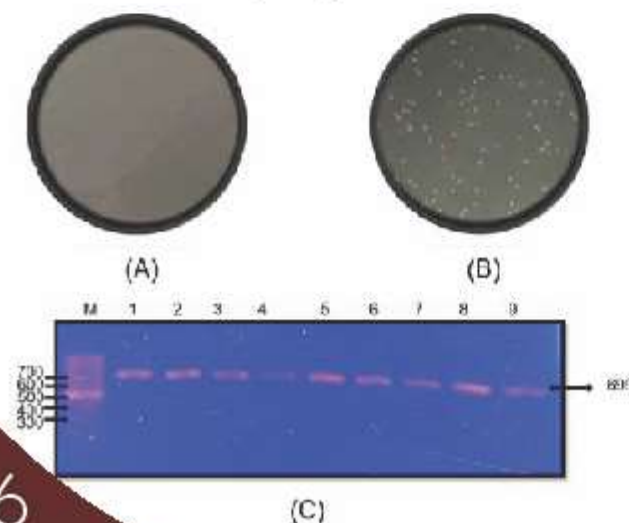
[B-3] En recuadro rojo se muestra la ubicación de la porción N-terminal seleccionada en este trabajo.

Haciendo uso de la técnica de PCR, se logró la amplificación de dos importantes regiones (correspondientes a 699 y 846 pb), adecuadas para el desarrollo de un sistema de expresión recombinante utilizando *E. coli*, debido a que esta presenta un rápido crecimiento y un alto rendimiento, así como bajos costos de producción, en comparación con otros posibles huéspedes, y mejora el rendimiento (Cardoso *et al.*, 2020). Un sistema de expresión lo conforma un organismo hospedero y un vector de expresión o fragmentos de DNA que posee los elementos génicos necesarios para elaborar procesos de transcripción y traducción en dicho organismo hospedero (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004).

Los avances en biotecnología permiten mejorar ampliamente la expresión de proteínas recombinantes utilizando *E. coli*, incluido el desarrollo de promotores y el uso de etiquetas de proteínas o dominios de fusión de proteínas removibles o para ayudar a optimizar su pureza, homogeneidad y solubilidad (Bugli *et al.*, 2014; Oliveira y Domingues, 2017).

Como parte de los elementos identificados durante esta investigación, el producto de PCR proveniente de la región seleccionada en el N-terminal, fue exitosamente ligado en el vector de expresión pETSUMO. Posteriormente se realizó la transformación con el producto de la ligación en células competentes TOP10 para su caracterización (Figura 2). Este sistema de expresión pETSUMO en conjunto con la proteína de fusión SUMO, mejora la solubilidad y protege la proteína expresada de la degradación proteolítica lo cual permite una purificación y detección más fácil de la proteína, que en conjunto con las características de *E. coli* garantizan una clonación rápida y eficiente, elementos que son componentes principales en la producción de proteínas recombinantes (Tan *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022).

Figura 2. Transformación de células competentes *E. coli* TOP 10 con el vector de expresión pETSUMO-NTerminal



(A) Control negativo de crecimiento de la prueba de transformación.

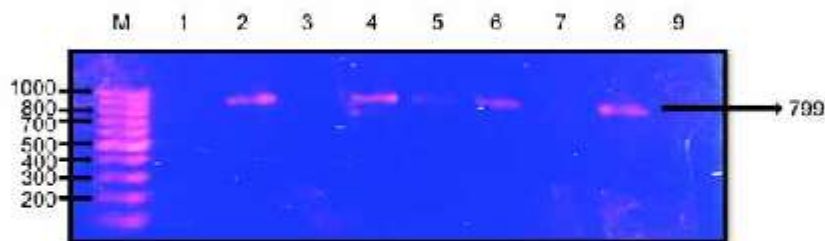
(B) Colonias transformadas con el vector de expresión pETSUMO-NTerminal; crecidas en medio LB+Kanamicina. (C) Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio de la prueba PCR punto final; cargado con los productos de la PCR a partir de plásmidos extraídos de colonias que fueron positivas a crecimiento en placas con antibiótico.

(M) Marcador de peso molecular.

(1-9) Diferentes plásmidos analizados que presentaron el inserto de interés de 699 pb provenientes del vector pETSUMO-NTerminal.

Posteriormente, se determinó, mediante PCR punto final, la correcta orientación del fragmento de interés con respecto del vector de expresión pETSUMO, esto se desarrolla en una prueba de PCR punto final, usando el iniciador delantero diseñado para la amplificación del gen N-terminal de Pig-MAP, así como el oligo reverso T7, que hibrida en una parte de la región terminadora del vector pETSUMO, esperando con ello visualizar un producto de aproximadamente 799 pb, lo cual se puede observar en la Figura 3.

Figura 3. PCR punto final para determinar la correcta orientación de los insertos de interés respecto al vector de expresión pETSUMO



Fragmento N-Terminal en sentido (carriles 2, 4, 5, 6, 8).
 (M) Marcador de peso molecular.
 (1-9) Plásmidos evaluados.

Lo anterior, nos indica que el inserto N-terminal de Pig-MAP quedó en fase con el vector de expresión, característica esencial para producir la proteína de interés. Finalmente, esto nos permite seleccionar los plásmidos positivos para su subsecuente transformación en la cepa BL21(DE3) que es una cepa de expresión utilizada para la inducción por medio de análogos de la lactosa como el isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) para inducir la expresión de la proteína recombinante.

Estos sistemas de expresión se caracterizan por su capacidad para mejorar la producción de proteínas, mejorando el plegamiento y solubilidad para facilitar su purificación y detección (Tan *et al.*, 2020). Considerando al sistema de expresión pETSUMO como componente de fusión que facilita la expresión y purificación de la proteína re-

combinante en *E. coli* (Bugli *et al.*, 2014; Peroutka III *et al.*, 2011). Los resultados nos indican que se obtuvo por primera vez un sistema de expresión recombinante para la proteína Pig-MAP que contiene todas las características necesarias para expresarse en *E. coli*, lo cual, nos permiten considerar el uso de esta proteína para continuar con la subsecuente expresión y caracterización más específica de la proteína y con ello más vías de investigación relacionadas con sus características bioquímicas, estructurales y para poder desarrollar una herramienta de alto valor diagnóstico en la producción de animales de granja como indicador de alteraciones.

CONCLUSIONES

Mediante esta investigación por primera vez, se logra la obtención de un sistema de expresión recombinante para la proteína de fase aguda Pig-MAP, que contiene todos los elementos necesarios para la producción de la proteína de manera recombinante, como son la elección de la cepa, el vector de expresión, el cultivo y las estrategias de purificación más apropiadas para su correcta producción en bacterias.

Dado que el bienestar animal hoy en día está vinculado a la certificación de buenas prácticas de producción se requiere estandarizar metodologías o herramientas que permitan mejor la evaluación de dicho bienestar en las prácticas de producción ganaderas. En el mercado europeo ya existen algunos desarrollos para uso en veterinaria que implementan la utilización de proteínas de fase aguda, sin embargo, los tiempos de envío, las dificultades que conlleva su importación, las necesidades de manejo y conservación en refrigeración, así como los costos derivados, pone en desventaja a México para obtener estas herramientas de manera comercial. Motivo por el cual, esta investigación presenta un potencial importante en el contexto de la ciencia aplicada directamente a la evaluación del bienestar animal enfocado a cerdos, para poder generar una herramienta de evaluación y diagnóstico con una buena relación costo-beneficio, en el manejo de todo su ciclo de vida, lo cual conllevaría a una repercusión económica y social importante, para definir aquellos procesos que comprometan el bienestar y buen estado de salud de los animales.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio LABIMA-GA, UAM-X, en especial al Laboratorio de Epizootiología CE-NID-SAI del INIFAP y al Proyecto SEP-CONACYT 288942, por el apoyo y facilidades para el desarrollo de esta investigación. CVU: 1143807

BIBLIOGRAFÍA

- Amaro M. 2014. Retos y oportunidades para el desarrollo de la biotecnología agroalimentaria en México. *Revista Innovación y Competitividad de la Asociación Mexicana de Directivos de la Investigación Aplicada y el Desarrollo Tecnológico AC*.
- Betancourt L. 2008. La Zootecnia, su quehacer en el pasado, presente y retos para el futuro. *Revista de la Universidad de La Salle*, 2008(45), 112-116.
- Blanco M., Sacristán B., Lucio L., Blanco J., Pérez G. C., Gómez G. A. 2010. La hidrofobicidad de la superficie celular como indicador de otros factores de virulencia en *Candida albicans*. *Revista iberoamericana de micología*, 27(4), 195-199.
- Bugli F., Caprettini V., Cacaci M., Martini C., Sterbini F., Torelli R., Della L. S., Papi M., Palmieri V., Giardina B., Posteraro B., Sanguinetti M., Arcovito A. 2014. Synthesis and characterization of different immunogenic viral nanoconstructs from rotavirus VP6 inner capsid protein. *International journal of nanomedicine*, 9, 2727.
- Cardoso V. M., Campani G., Santos M. P., Silva G. G., Pires M. C., Gonçalves V. M., Zangrolami T. C. 2020. Cost analysis based on bioreactor cultivation conditions: Production of a soluble recombinant protein using *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Biotechnology reports*, 26, e00441.
- Chen H., Lin J., Fung H., Ho L., Yang P., Lee W., Lee Y., Chu R. 2003. Serum acute phase proteins and swine health status. *Canadian journal of veterinary research, Revue canadienne de recherche veterinaire*, 67(4), 283-290.
- Cobanović N., Stanković S. D., Dimitrijević M., Suvajdžić B., Grković N., Vasilev D., Karabasil N. 2020. Identifying Physiological Stress Biomarkers for Prediction of Pork Quality Variation. *Animals*, 10(4), 614. doi:10.3390/ani1004061
- Cray C. (2012). Acute phase proteins in animals. *Progress in molecular biology and translational science*, 105, 113-150.
- Damián J., Ungerfeld R. 2012. Indicadores de bienestar animal en especies productivas: una revisión crítica. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. Universidad de la República, Uruguay. Pp. 103-113.

- Giergel M., Olejnik M., Jabłoński A., Posyński A. 2021. *The markers of stress in swine oral fluid*, J Vet Res 65, 487-495, 2021. DOI:10.2478/jvetres-2021-0065
- González R. N., Sarsa J. A., Pin M., Escartin A. 1995. *The major acute phase serum protein in pigs is homologous to human plasma kallikrein sensitive PK-120*. Febs Letters, 371(3), 227-230.
- Guerrero M., Cab B. E., Galán W. L., Viader S. J. 2004. *Biotecnología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura. Avances en nutrición Acuícola. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. Hermosillo, Sonora. México, 245-258.
- Gulhar R., Ashraf M., Jialal I. 2021. *Physiology, Acute Phase Reactants*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519570>
- Heegaard P. M., Stockmarr A., Pifeiro M., Carpintero R., Lampreave F., Campbell F. M., Eckersall P. D., Toussaint M., Gruys E., Sorensen N. S. (2011). *Optimal combinations of acute phase proteins for detecting infectious disease in pigs*. *Veterinary Research*, 42(1), 1-13.
- Heegaard P. M., Miller I., Sorensen N. S., Soerensen K. E., Skovgaard K. 2013. *Pig α 1-acid glycoprotein: characterization and first description in any species as a negative acute phase protein*. PLoS One, 8(7), e68110.
- Hennig P. I., Menzel A., Boehme T., Schierbaum H., Ganter M., Schulz J. (2019). *Haptoglobin and C-Reactive Protein—Non-specific Markers for Nursery Conditions in Swine*. *Frontiers in Veterinary Science*, 6. doi:10.3389/fvets.2019.00092
- Hernández J. 2016. *Elaboración y validación de un instrumento de evaluación de bienestar animal para cerdas en gestación y lactancia*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de [https://repositorio.unam.mx/contenidos/Lampreave, F., González Ramón, N., Martínez Ayensa, S., Hernández, M. A., Lorenzo, H. K., García Gil, A., Pifeiro, A. 1994. Characterization of the acute phase serum protein response in pigs. *Electrophoresis*, 15\(1\), 672-676.](https://repositorio.unam.mx/contenidos/Lampreave, F., González Ramón, N., Martínez Ayensa, S., Hernández, M. A., Lorenzo, H. K., García Gil, A., Pifeiro, A. 1994. Characterization of the acute phase serum protein response in pigs. Electrophoresis, 15(1), 672-676)
- Martínez M. S., Tecles F., Ramón M., Escribano D., Hernández F., Madrid J., Orengo J., Martínez S. S., Manteca X., Cerón J. 2016. *Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update*. *BMC Veterinary Research*. 12(1). doi:10.1186/s12917-016-0791-8
- Myers M. J., Smith E. R., Turfle P. G. 2017. *Biomarkers in veterinary medicine*. *Annual Review of Animal Biosciences*, 5, 65-87.
- Muñoz R. 2014. *Bienestar animal: un reto en la producción pecuaria*. *Spei Domus*, 10(20), 31-40. doi: 10.16925/sp.v10i20.884

- Murata H. 2007. Stress and acute phase protein response: an inconspicuous but essential linkage. *Veterinary journal* (London, England.1997), 173(3), 473-474. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.05.008>
- O'Reilly E., Bailey R., Eckersall P. 2018. A comparative study of acute-phase protein concentrations in historical and modern broiler breeding lines. *Poultry Science*. doi:10.3382/ps/pey272
- Peroutka III R., Orcutt S., Strickler J., Butt T. 2011. SUMO fusion technology for enhanced protein expression and purification in prokaryotes and eukaryotes. *Heterologous Gene Expression in E. coli*, 15-30.
- Pifeiro M., Andres M., Iturralde M., Carmona S., Hirvonen J., Pyorala S., Alava M. A. 2004. ITIH4 (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4) is a new acute-phase protein isolated from cattle during experimental infection. *Infection and Immunity*, 72(7), 3777-3782.
- Pifeiro M., Pifeiro C., Carpintero R., Morales J., Campbell F., Eckersall P., Toussaint M., Lampreave F. 2007. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *The Veterinary Journal*, 173(3), 669-674. doi:10.1016/j.tvjl.2006.02.006
- Puicón V. H., Gutiérrez A. F. 2022. Sistema silvopastoril, alimentación y biotecnología para una producción animal sustentable. *Revista de Veterinaria y Zootecnia Amazónica*, 2(2), e408-e408.
- Sánchez M., Rosales M. A. 2017. Panorama general de la biotecnología en México y el mundo. *Las vicisitudes de la innovación en biotecnología y nanotecnología en México*, 33. ISBN UAM: 978-607-28-1197-3 ©Universidad Autónoma Metropolitana. Sección de Publicaciones de la División de Ciencias Sociales y Humanidades.
- Sarabia V. J. 2020. *Evaluación del bienestar animal en cerdos de engorda aplicando el protocolo Welfare Quality*. Tesis. Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias.
- Serrano E., Mantecon A. 2003. Bases para un desarrollo ganadero sostenible: la consideración de la producción animal desde una perspectiva sistémica y el estudio de la diversidad de las explotaciones. *Revista Española de Estudios Agrosociales y Pesqueros*. 199, 159-191. <http://hdl.handle.net/10261/8316>
- Tadich N., Gallo C., Brito M. L., Broom D. M. (2009). Effects of weaning and 48 h transport by road and ferry on some blood indicators of welfare in lambs. *Livestock Science*, 121(1), 132-136.
- Tadich N., Gallo C., Echeverría R., Van Schaik G. (2003). Efecto del ayuno durante dos tiempos de confinamiento y de transporte terrestre sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en novillos. *Archivos de medicina veterinaria*, 35(2), 171-185.

- Tan M. S., Teh Y. H., Ho K. L., Stanslas J. 2020. An application of pET SUMO protein expression system in *Escherichia coli*: Cloning, expression, purification, and characterisation of native Kras4B G12V oncoprotein. *The protein journal*, 39, 54-61.
- Te Pas M., Hoekman A., Smits M. 2011. Biomarkers as management tools for industries in the pork production chain. *Journal on Chain and Network Science*, 11(2), 155-166. doi:10.3920/jcns2011.qpork
- Tothova C., Novotny J., Nagy O., Hornakova P., Zert Z., Varga M., Medvecky L., Vdoviakova K., Danko J., Petrovova E. 2019. Changes in the Acute-Phase Protein Concentrations and Activities of Some Enzymes in Pigs Following the Repair of Experimentally Induced Articular Cartilage Defects Using Two Types of Biocement Powder. *Animals*. 9(11), 931. doi:10.3390/ani9110931
- Zhang Z. X., Wang Y. Z., Nong F. T., Xu Y., Ye C., Gu Y., Huang H. 2022. Developing a dynamic equilibrium system in *Escherichia coli* to improve the production of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(18), 6125-6137.