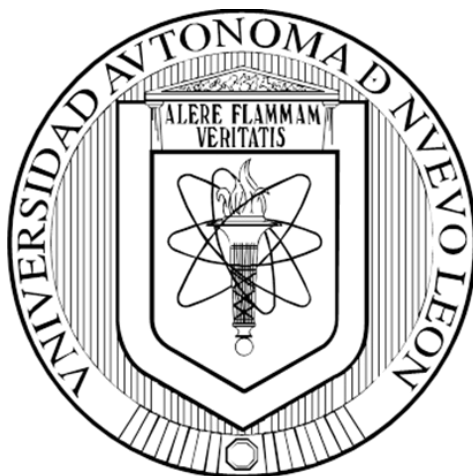


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE GLUCOSA OXIDASA  
RECOMBINANTE EN *Pichia pastoris* Y EVALUACIÓN DE LA  
ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTICANCERÍGENA *in vitro***

**POR**

**QFB. EVELYN MARTÍNEZ MORA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

**NOVIEMBRE 2018**

**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE GLUCOSA OXIDASA RECOMBINANTE  
EN *Pichia pastoris* Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y  
ANTICANCERÍGENA *in vitro***

Aprobación de la Tesis:

---

Dra. María del Rosario González González

**Presidente**

---

Dr. Francisco Guadalupe Avalos Alanís

**Secretario**

---

Dra. Elizabeth Orozco Beltrán

**Vocal**

---

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez

**Sub-Directora de Posgrado**

**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE GLUCOSA OXIDASA RECOMBINANTE  
EN *Pichia pastoris* Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y  
ANTICANCERÍGENA *in vitro***

Aprobado por Comité de Tesis

---

Dra. María del Rosario González González

**ASESOR**

---

Dr. Isaías Balderas Rentería

**COASESOR**

---

Dra. Elizabeth Orozco Beltrán

**COMITÉ TUTORIAL**

---

Dra. Sandra Leticia Gracia Vásquez

**COMITÉ TUTORIAL**

---

Dr. Francisco Guadalupe Avalos Alanís

**COMITÉ TUTORIAL**

---

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez

**SUB-DIRECTORA DE POSGRADO**

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios por darme la vida y permitirme realizar los proyectos que me planteo.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL por aceptarme para estudiar una maestría en ciencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de la maestría.

A la Dra. María del Rosario González González por el apoyo y la asesoría brindada para la realización de este trabajo.

Al Dr. Isaías Balderas Rentería por su valiosa enseñanza y por darme la oportunidad de formar parte del equipo de trabajo del laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica como estudiante de maestría.

Al Dr. Xristo Zárate Kalfópulos por su tiempo, su orientación y sus consejos que me ayudaron a seguir a delante con este proyecto.

Al Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza por su asesoría y contribuir en mi formación.

A los Dres.: Elizabeth Orozco Beltrán, Sandra Leticia Gracia Vásquez y Francisco Guadalupe Avalos Alanís por sus comentarios oportunos y correcciones de la tesis.

A mis compañeros de laboratorio: Jorge, Elizeth, Sonia, Zacatecas, Jesús, Rodrigo, Adela, Eiber, David, Jessica, Brayan y Francisco por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias. Y a mis compañeros de generación: Juan, Laura, Martha, Gladiola, Karla y Alejandro por su apoyo y amistad.

¡Gracias!

## RESUMEN

QFB Evelyn Martínez Mora

Fecha de Graduación: Noviembre 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de estudio: **EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE GLUCOSA OXIDASA RECOMBINANTE EN *Pichia pastoris* Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTICANCERÍGENA *in vitro***

Número de páginas: 95

Candidato para el grado de Maestría con  
orientación en Farmacia

Área de estudio: Farmacia

Propósito y método de estudio: El cáncer consiste en un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Una de sus características es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites, y tienen la capacidad de causar metástasis. Es la segunda causa de muerte en el mundo, con un total de 8.8 millones de defunciones en el año 2015. Dentro de los tratamientos principales se encuentra la quimioterapia, en la cual se ha observado que las células cancerosas desarrollan resistencia a múltiples fármacos, disminuyendo así la efectividad de éstos. Por lo anterior, se hace evidente la necesidad de mejorar y desarrollar nuevos agentes terapéuticos que combatan este padecimiento. Se ha encontrado que especies reactivas del oxígeno, como el  $H_2O_2$ , en altas concentraciones pueden causar citotoxicidad a las células, siendo aún mayor en las células cancerígenas. Una de las enzimas productoras de  $H_2O_2$  es la glucosa oxidasa, la cual en presencia de una molécula de glucosa y una de  $O_2$  forma  $H_2O_2$  y ácido glucónico. En este trabajo se llevó a cabo la expresión extracelular de la enzima glucosa oxidasa recombinante en el sistema de expresión eucariótico *Pichia pastoris* SMD1168, se determinó la actividad enzimática de la glucosa oxidasa y su actividad citotóxica y anticancerígena en las líneas celulares Vero y SiHa.

Conclusiones y contribuciones: Se logró la expresión de la glucosa oxidasa recombinante en el medio extracelular. Se probó la citotoxicidad en las líneas celulares VERO y SiHa, siendo más citotóxico en la línea celular SiHa, se podría concluir que las células cancerígenas son más susceptibles a la presencia del  $H_2O_2$ , que generó la enzima, que las células normales.

---

Dra. María del Rosario González  
González  
Director de Tesis

---

Dr. Isaías Balderas Rentería  
Co-Director de Tesis

## Tabla de Contenido

Capítulo	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>11</b>
2.1 Mutación de la glucosa oxidasa.....	11
2.2 <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión de proteínas recombinantes	12
2.2.1 Expresión de glucosa oxidasa en <i>Pichia pastoris</i> .....	14
2.3 Peróxido de hidrógeno como un agente citotóxico .....	16
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
4.1 Hipótesis.....	19
4.2 Objetivos.....	19
4.2.1 Objetivo general .....	19
4.2.2 Objetivos específicos.....	19
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
5.1 Material, reactivos y equipo .....	21
5.2 Metodología general .....	23
5.3 Diseño y optimización del gen mutado de la glucosa oxidasa madura....	23
5.4 Construcción y propagación del plásmido pPIC3.5K-goxM .....	24
5.4.1 Clonación, propagación y extracción de los plásmidos pPIC3.5K y pUC57-goxM .....	24
5.4.2 Amplificación del gen <i>goxM</i> .....	26
5.4.3 Doble digestión enzimática del amplicón del gen <i>goxM</i> y del vector de expresión pPIC3.5K .....	28
5.4.4 Reacción de ligación del vector pPIC3.5K con el inserto <i>goxM</i> .....	30
5.4.5 Transformación de <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ con el vector construido pPIC3.5K-goxM y su caracterización .....	31
5.5 Clonación del plásmido pPIC3.5K-goxM en <i>Pichia pastoris</i> SMD1168 ...	33
5.5.1 Linearización del plásmido pPIC3.5K-goxM con <i>SacI</i> .....	33
5.5.2 Transformación por electroporación de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168 con el plásmido pPIC3.5K-goxM .....	34
5.5.3 Caracterización de la integración del plásmido pPIC3.5K-goxM al genoma de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168 .....	36

5.6 Expresión y purificación de la enzima glucosa oxidasa recombinante proveniente de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168.....	38
5.6.1 Expresión piloto de la enzima glucosa oxidasa recombinante y caracterización por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) .....	38
5.6.2 Escalamiento de la expresión de la enzima glucosa oxidasa recombinante.....	41
5.6.3 Purificación de la enzima glucosa oxidasa recombinante .....	42
5.7 Evaluación de la actividad enzimática de la glucosa oxidasa recombinante .....	42
5.8 Cuantificación de proteínas .....	43
5.9 Evaluación de la actividad citotóxica y anticancerígena <i>in vitro</i> del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> formado a partir de la glucosa oxidasa recombinante .....	43
5.9.1 Proliferación de las líneas celulares Vero y SiHa .....	43
5.9.2 Evaluación de la actividad citotóxica y anticancerígena <i>in vitro</i> .....	44
5.10 Disposición de los residuos generados .....	46
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
6.1 Diseño y optimización del gen mutado de la glucosa oxidasa madura....	47
6.2 Construcción y propagación del vector pPIC3.5K-goxM.....	51
6.2.1 Clonación, propagación y extracción de los plásmidos pPIC3.5K y pUC57-goxM .....	51
6.2.2 Amplificación del gen <i>goxM</i> .....	53
6.2.3 Doble digestión enzimática del amplicón del gen <i>goxM</i> y del vector de expresión pPIC3.5K .....	53
6.2.4 Reacción de ligación del vector pPIC3.5K con el inserto <i>goxM</i> .....	54
6.2.5 Transformación de <i>Escherichia coli</i> DH5α con el vector construido pPIC3.5K-goxM y su caracterización .....	55
6.3 Clonación del plásmido pPIC3.5K-goxM en <i>Pichia pastoris</i> SMD1168 ...	58
6.3.1 Linearización del plásmido pPIC3.5K-goxM con <i>SacI</i> .....	58
6.3.2 Transformación por electroporación de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168 con el plásmido pPIC3.5K-goxM.....	59
6.3.3 Caracterización de la integración del plásmido pPIC3.5K-goxM al genoma de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168 .....	59
6.4 Expresión y purificación de la enzima glucosa oxidasa recombinante proveniente de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168.....	61

6.4.1 Expresión piloto de la enzima glucosa oxidasa recombinante y caracterización por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) .....	61
6.4.2 Escalamiento de la expresión de la enzima glucosa oxidasa recombinante.....	63
6.4.3 Purificación de la enzima glucosa oxidasa recombinante .....	63
6.5 Evaluación de la actividad enzimática de la glucosa oxidasa recombinante .....	65
6.6 Cuantificación de proteínas .....	67
6.7 Evaluación de la actividad citotóxica y anticancerígena <i>in vitro</i> del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> formado a partir de la glucosa oxidasa recombinante .....	68
<b>7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>74</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>82</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>90</b>



## Índice de Tablas

Tabla	Página
1. Reacción de digestión enzimática de pPIC3.5K con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i> . .....	26
2. Componentes de la reacción de PCR para la amplificación del SMC de pUC57- <i>goxM</i> . .....	27
3. Programa de PCR establecido en el termociclador para la amplificación del SMC de pUC57- <i>goxM</i> . .....	28
4. Doble digestión enzimática del amplicón del SMC del plásmido pUC57- <i>goxM</i> con las enzimas <i>BamHI</i> y <i>NotI</i> . .....	29
5. Doble digestión enzimática de pPIC3.5K con las enzimas <i>BamHI</i> y <i>NotI</i> . ....	30
6. Reacción de ligación del vector pPIC3.5K con el inserto <i>goxM</i> con una relación molar de 1:3. ....	30
7. Reacción de digestión enzimática de pPIC3.5K con la enzima <i>BamHI</i> . ....	31
8. Reacción de ligación del vector pPIC3.5K. ....	31
9. Componentes de la reacción de PCR para la amplificación del SMC de pPIC3.5K- <i>goxM</i> . .....	32
10. Programa de PCR establecido en el termociclador para la amplificación del SMC de pPIC3.5K- <i>goxM</i> . .....	32
11. Reacción de digestión enzimática de pPIC3.5K y pPIC3.5K- <i>goxM</i> con la enzima <i>ClaI</i> . .....	33
12. Reacción de digestión enzimática para la linearización del plásmido pPIC3.5K- <i>goxM</i> con la enzima <i>SacI</i> . .....	34

<b>13.</b> Componentes de la reacción de PCR para la confirmación de la integración del plásmido pPIC3.5K-goxM al genoma de <i>P. pastoris</i> .....	37
<b>14.</b> Fase concentradora del gel para SDS-PAGE al 4 %.....	40
<b>15.</b> Fase separadora del gel para SDS-PAGE al 11 %.....	40
<b>16.</b> Resultados de la electroporación de <i>P. pastoris</i> SMD1168 electrocompetente.....	59

## Índice de Figuras

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Reacción de oxidación de la glucosa catalizada por GOx. ....	4
2. Vector de expresión pPIC3.5K.....	8
3. Representación esquemática de la metodología general de trabajo. ....	23
4. Secuencia de 1818 pb del gen <i>gox</i> de <i>A. niger</i> .....	48
5. Secuencia de 2021 pb que codifica GOxr.....	49
6. Secuencia de 668 aminoácidos de GOxr.....	50
7. Predicción del procesamiento del péptido señal de la secuencia de aminoácidos de GOxr. ....	51
8. Caracterización enzimática del vector pPIC3.5K. ....	52
9. Amplificación del gen <i>goxM</i> . ....	53
10. Doble digestión enzimática del amplicón del SMC de pUC57- <i>goxM</i> y pPIC3.5K. ....	54
11. Representación esquemática de la construcción del vector pPIC3.5K- <i>goxM</i> . ....	55
12. Análisis por PCR de las clonas de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ transformadas con pPIC3.5K- <i>goxM</i> . ....	56
13. Caracterización enzimática del plásmido pPIC3.5K- <i>goxM</i> .....	57
14. Plásmido pPIC3.5K- <i>goxM</i> . ....	58
15. Análisis de la integración de pPIC3.5K- <i>goxM</i> al genoma de <i>P. pastoris</i> SMD1168. ....	61

<b>16.</b> Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 11 % de la expresión de GOxr. ....	62
<b>17.</b> Cromatograma de purificación de GOxr. ....	64
<b>18.</b> Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 11 % de las fracciones obtenidas de la purificación en el FPLC.....	65
<b>19.</b> Curva de calibración de la actividad enzimática de GOx. ....	66
<b>20.</b> Curva de calibración de la concentración de albúmina sérica bovina. ....	67
<b>21.</b> Cambio morfológico observado a través del microscopio de la línea celular Vero al ser expuesta a la GOxr.....	68
<b>22.</b> Porcentajes de viabilidad de la línea celular Vero expuesta a la GOx determinados por el ensayo de citotoxicidad con WST-1. ....	69
<b>23.</b> IC <sub>50</sub> de GOxr y GOx comercial en la línea celular Vero. ....	70
<b>24.</b> Cambio morfológico observado a través del microscopio de la línea celular SiHa al ser expuesta a la GOxr.....	71
<b>25.</b> Porcentajes de viabilidad de la línea celular SiHa expuesta a la GOx determinados por el ensayo de citotoxicidad con WST-1. ....	72
<b>26.</b> IC <sub>50</sub> de GOxr y GOx comercial en la línea celular SiHa. ....	73

## Nomenclatura

%	Porcentaje
° C	Grados Celsius
μF	Microfaradio
μg/mL	Microgramos por mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Ag <sup>+</sup>	Ion plata (1+)
Ala	Alanina
Amp	Ampicilina
<i>amp<sup>r</sup></i>	Gen de resistencia a ampicilina
<i>AOX1</i>	Gen que codifica para la enzima alcohol oxidasa I
<i>aox1</i>	Gen defectuoso de la enzima alcohol oxidasa I
Arg	Arginina
<i>ARG4</i>	Gen que codifica para la enzima arginosuccinato liasa
<i>arg4</i>	Gen defectuoso de la enzima arginosuccinato liasa
Asn	Asparagina
BCNU	Carmustina
BJAB	Hibridoma de linfocitos B
BMGY	Medio enriquecido amortiguado adicionado con glicerol
BMMY	Medio enriquecido amortiguado adicionado con metanol
BSA	Albúmina de suero bovino
Cu <sup>2+</sup>	Ion cobre (2+)
DH5α	Cepa de <i>Escherichia coli</i> resistente al fago T1 y deficiente en <i>endA</i> para preparaciones de plásmidos de alta calidad
DMEM	Medio esencial mínimo modificado
DNA	Ácido desoxirribunucleico
DO <sub>600</sub>	Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Comisión de Enzimas
EMT6/AR1.0	Células de cáncer de mama murino resistentes a múltiples fármacos
EMT6/WT	Células de cáncer de mama murino
ERO	Especies reactivas del oxígeno
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FADH <sub>2</sub>	Flavín adenín dinucleótido reducido
Fe <sup>2+</sup>	Ion hierro (2+)

G418	Geneticina
<i>GCN4</i>	Gen que codifica para el <i>general control non-derepressible 4</i>
Glu	Ácido glutámico
GOx	Glucosa oxidasa
<i>gox</i>	Gen que codifica para la enzima glucosa oxidasa
<i>goxM</i>	Secuencia modificada del gen de la glucosa oxidasa
GOxr	Glucosa oxidasa recombinante
<i>GS115</i>	Cepa de <i>Pichia pastoris</i> con el genotipo <i>his4</i>
h	Hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
Hg <sup>2+</sup>	Ion mercurio (2+)
HGHr	Hormona del crecimiento humano recombinante
His	Histidina
His <sup>+</sup>	Células de <i>Pichia pastoris</i> capaces de sintetizar histidina
<i>HIS4</i>	Gen que codifica para la enzima histidinol deshidrogenasa
<i>his4</i>	Gen defectuoso de la enzima histidinol deshidrogenasa
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
<i>kan<sup>r</sup></i>	Gen de resistencia a kanamicina
kDa	Kilodalton
Kex2p	Endoproteasa dependiente de ion calcio (2+) unida a membrana
K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis-Menten
KM71	Cepa de <i>Pichia pastoris</i> con el genotipo <i>aox1::ARG4, his4, arg4</i>
L	Litro
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
M	Molar
MAO A	Monoamino oxidasa A
mAU	Miliunidades de absorción
MCF10A	Células de la glándula mamaria humano normales
MCF7	Células de cáncer de mama humano
MD	Medio mínimo dextrosa
MDAMB231	Células de cáncer de mama humano, triple negativo
MEM	Medio esencial mínimo
min	Minuto
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MRP	Resistencia a múltiples fármacos
MTT	Metil tiazolil tetrazolio
mU/mL	Miliunidades por mililitro
Mut <sup>+</sup>	Mutante que posee el gen <i>aox1</i>

Mut <sup>s</sup>	Mutante que carece del gen <i>aox1</i>
N	Nitrógeno
ng	Nanogramo
ng/μL	Nanogramos por microlitro
O	Oxígeno
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>P. amagasakiense</i>	<i>Penicillium amagasakiense</i>
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina de buffer de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>pep4</i>	Gen defectuoso de la enzima aspartil proteasa vacuolar
<i>PEP4</i>	Gen que codifica para la enzima aspartil proteasa vacuolar
pH	Potencial de hidrógeno
pl	Punto isoeléctrico
<i>PRB1</i>	Gen que codifica para la enzima proteinasa B
<i>PRC1</i>	Gen que codifica para la enzima carboxipeptidasa Y
rpm	Rotaciones por minuto
s	Segundo
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
Ser	Serina
SiHa	Células de cáncer de cérvix humano
SMC	Sitio múltiple de clonación
SMD1168	Cepa de <i>Pichia pastoris</i> con el genotipo <i>his4, pep4</i>
<i>STE13</i>	Gen que codifica para la enzima dipeptidil aminopeptidasa integral de membrana del aparato de Golgi
T <sub>1/2</sub>	Tiempo de vida media
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TB1	Cepa de <i>Escherichia coli</i> derivada de JM83 con el genotipo <i>hsdR</i>
TE	Tris-HCl-EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TENS	Tris-EDTA-NaOH-SDS
Thr	Treonina
TSNT	Tritón-SDS-NaCl-Tis-HCl-EDTA
TT	Terminador de la transcripción
Tyr	Tirosina
U/mg	Unidades por miligramo
U/mL	Unidades por mililitro
V	Voltio
v/v	Volumen/volumen

Val	Valina
Vero	Células de riñón de mono verde
WST-1	Sal de tetrazolio
X	Número de veces la concentración
X-33	Cepa de <i>Pichia pastoris</i> de tipo salvaje
$\lambda$	Lambda
YPD	Medio de extracto de levadura con peptona y dextrosa
$\alpha$ -Factor	Señal de secreción del factor $\alpha$
$\alpha$ -MF	Factor de apareamiento $\alpha$ de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
$\Omega$	Ohm



# **CAPÍTULO I**

## **1. INTRODUCCIÓN**

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, con un total de 8.8 millones de defunciones ocurridas por este padecimiento en el año 2015. Entre los tipos de cáncer que causan mayor número de muertes se encuentran: el pulmonar, hepático, colorrectal, gástrico y mamario; siendo estos dos últimos los de mayor prevalencia en México<sup>1,2</sup>.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer consiste en un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo. Las células cancerosas tienen como características la multiplicación celular rápida, la extensión más allá de sus límites y la capacidad de causar metástasis, manteniendo activada su señalización proliferativa, evadiendo a los supresores del crecimiento y al sistema inmune, la resistencia a las señalizaciones de muerte celular y la facilidad de cambiar su metabolismo energético y de inducir angiogénesis<sup>1,3</sup>. Esto es debido a desórdenes genéticos y a una serie de mutaciones en los genes que cambian las funciones celulares y orientan a las células a una proliferación anormal, como es el caso de los protooncogenes, los cuales son los responsables del crecimiento y la división celular, que se convierten en oncogenes por causa de las mutaciones<sup>4</sup>.

Estos cambios se deben a una variedad de factores internos, como la genética del individuo, por factores hereditarios y no hereditarios, y agentes externos, como los carcinógenos físicos, químicos y biológicos<sup>1,4</sup>.

Los principales tratamientos que se utilizan para combatir el cáncer son: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia<sup>1</sup>. Uno de los problemas del uso de la quimioterapia es que las células cancerosas desarrollan resistencia a múltiples fármacos, disminuyendo así su efectividad, por características propias del tipo de cáncer o estas células van adquiriendo esa resistencia conforme avanza la enfermedad<sup>5,6</sup>. Algunos tumores consisten de células sensibles y resistentes, siendo la quimioterapia efectiva solamente en las primeras; y en algunos de los casos, si el tumor vuelve a proliferar se vuelve más resistente<sup>5</sup>.

Dentro de los mecanismos de resistencia se encuentran: la sobreexpresión de bombas de eflujo sobre las membranas de células cancerígenas, como lo son la P-glicoproteína y las proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (MRP, por sus siglas en inglés), alteración en el metabolismo de lípidos y en la membrana celular, eliminación de fármacos por sistemas de detoxificación, mediada por glutatión, aumento de la capacidad de reparación del DNA, entre otros<sup>6</sup>.

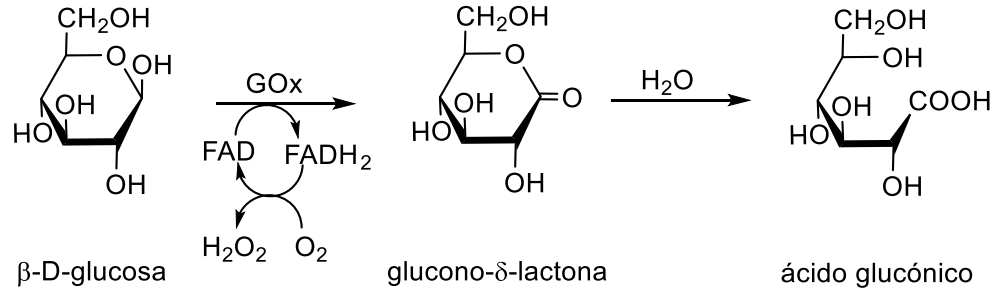
Se ha encontrado que especies reactivas de oxígeno (ERO), como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), en altas concentraciones pueden causar citotoxicidad a las células a través de la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo, generando un desequilibrio en la producción y neutralización de las ERO, causando dentro del núcleo el rompimiento de la cadena del DNA, la oxidación

de las bases nitrogenadas, y un daño oxidativo a la membrana mitocondrial. Mediante este fenómeno se origina la muerte celular por apoptosis o necrosis, incluso en aquellas células cancerígenas resistentes a múltiples fármacos, siendo estas más sensibles a las ERO, debido a las diferencias en la composición lipídica de su membrana celular<sup>7</sup>.

En condiciones normales las células se protegen reduciendo las ERO por mecanismos enzimáticos (catalasas, peroxidasas) y no enzimáticos (vitaminas A, C y E)<sup>8,9</sup>.

El  $H_2O_2$  es una molécula de señalización celular, el cual tiene un tiempo de vida media ( $T_{1/2}$ ) dentro de la célula de  $10^{-5}$  s y sus concentraciones van desde  $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  M. Dependiendo de esas concentraciones y del sitio de producción intracelular es el efecto biológico que provoca dentro de la célula, concentraciones bajas están relacionadas con la proliferación celular, concentraciones medias con la senescencia y altas concentraciones con la apoptosis<sup>8,9</sup>.

Se sabe que la glucosa oxidasa (GOx), cuya clasificación es: EC 1.1.3.4  $\beta$ -D-glucosa: oxígeno 1-oxidoreductasa, es una enzima que en presencia de  $\beta$ -D-glucosa y oxígeno ( $O_2$ ) forma  $H_2O_2$  más glucono- $\delta$ -lactona, la cual sufre una hidrólisis y forma ácido glucónico. Es una flavoproteína, la cual durante la reacción utiliza la coenzima flavín adenín dinucleótido (FAD) como un acarreador de electrones, y se reduce a  $FADH_2$ . La enzima es regulada por retroalimentación negativa por el  $H_2O_2$ ; y la acumulación del ácido glucónico reduce el pH del medio en donde se encuentre<sup>10-12</sup>.



**Figura 1.** Reacción de oxidación de la glucosa catalizada por GOx.

La enzima que proviene de *Aspergillus niger* es la más estudiada, se encuentra ubicada en la pared celular de este hongo, su gen *gox* es de 1818 pb, que codifican para 605 aminoácidos, de los cuales 22 aminoácidos corresponden al péptido líder de la proteína y los otros 583 aminoácidos conforman a la proteína madura. GOx es una glicoproteína dimérica, compuesta de dos subunidades idénticas de alrededor de 80 kDa cada una, unidas por enlaces disulfuro; y dos sitios de unión no covalente a FAD, del cual el N5 del anillo de isoaloxazina es el involucrado en la reacción catalítica<sup>10-15</sup>. El sitio activo de la enzima está conformado por Tyr68, Thr110, Glu412, Arg512, Asn514, Tyr515, His516 y His559 (sin incluir el péptido líder). Los aminoácidos que se encuentran en el sitio catalítico e interactúan con la estructura de FAD son Glu412, His516 y His559<sup>10,16</sup>. Alrededor del 16% de su peso corresponde a carbohidratos, y de éstos el 80% es de moléculas de manosa unidas por enlaces N u O-glicosídicos<sup>10-12,15</sup>.

El rango de temperatura y pH en el que se encuentra estable es de 20 – 50 °C y 5 – 7, respectivamente. Su punto isoeléctrico (pI) está entre 4.2 – 4.5. Tiene un  $T_{1/2}$  de alrededor de 30 min a 37 °C. Para aumentar su estabilidad se han

empleado alcoholes polihídricos, como el etilenglicol, glicerol, eritritol, xilitol, sorbitol y polietilenglicol; en forma liofilizada puede almacenarse por meses a -20 °C. Su actividad enzimática es inhibida con la presencia de los iones  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ , y los compuestos bisulfato de sodio, 1,4-ditiotreitol, dodecil sulfato de sodio, ácido ascórbico, entre otros<sup>11,12,17</sup>.

Además del género de *Aspergillus* (*A. niger*), existen otros microorganismos que la producen naturalmente como los del género de *Penicillium* (*P. amagasakiense*), *Talaromyces flavus*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Botrytis cinérea*; los cuales utilizan el  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido por GOx como un agente antifúngico y antibacteriano, para la degradación de lignina, y el ácido glucónico para disminuir el pH del medio ambiente que les rodea; y en algunos tipos de insectos como la *Apis mellifera*, para la preservación de la miel<sup>11</sup>.

Debido a sus propiedades se le ha dado uso a nivel industrial y comercial, entre las aplicaciones de GOx se encuentra como aditivo en el procesamiento de los alimentos por sus funciones como antioxidante y conservador, para disminuir la concentración de alcohol en la producción de vinos, como un biosensor en los dispositivos para la medición de los niveles de glucosa, componente de celdas de biocombustibles, en la industria textil para el blanqueamiento de telas por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , entre otras aplicaciones que se encuentran a nivel laboratorio<sup>11,12</sup>.

Para la producción fermentativa de GOx los géneros más empleados de microorganismos son *Aspergillus* y *Penicillium* utilizando glucosa como fuente principal de carbohidratos, pero han presentado problemas de bajo rendimiento y producción concomitante con otras enzimas, como la catalasa que dificulta la

purificación de GOx<sup>12,18</sup>. Para resolver estos problemas se han utilizado microorganismos genéticamente modificados, como lo son *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, siendo estas últimas las más empleadas para la producción de proteínas recombinantes provenientes de genomas eucarióticos; ya que estas células realizan modificaciones post-traduccionales para este tipo de proteínas, tales como procesamiento de las secuencias señal, plegamiento, enlaces disulfuro y, O- y N- glucosilación. Además, en *E. coli* es típico obtener productos insolubles, cuerpos de inclusión, solubilización posterior y la falta de plegamiento de las proteínas<sup>12,17</sup>.

En *S. cerevisiae* se obtienen buenos rendimientos de GOx, ésta fue la primera levadura en ser empleada para la producción de proteínas recombinantes y, por lo tanto, es muy bien conocida su manipulación genética; pero la desventaja de esta levadura es la alta glucosilación de las proteínas, lo que disminuye la actividad enzimática de las enzimas formadas<sup>12,18,19</sup>. Es por lo que *P. pastoris* es una de las mejores opciones para la expresión de proteínas provenientes de sistemas eucarióticos, ya que las enzimas recombinantes producidas por esa levadura presentan una actividad comparable con las enzimas nativas<sup>18</sup>.

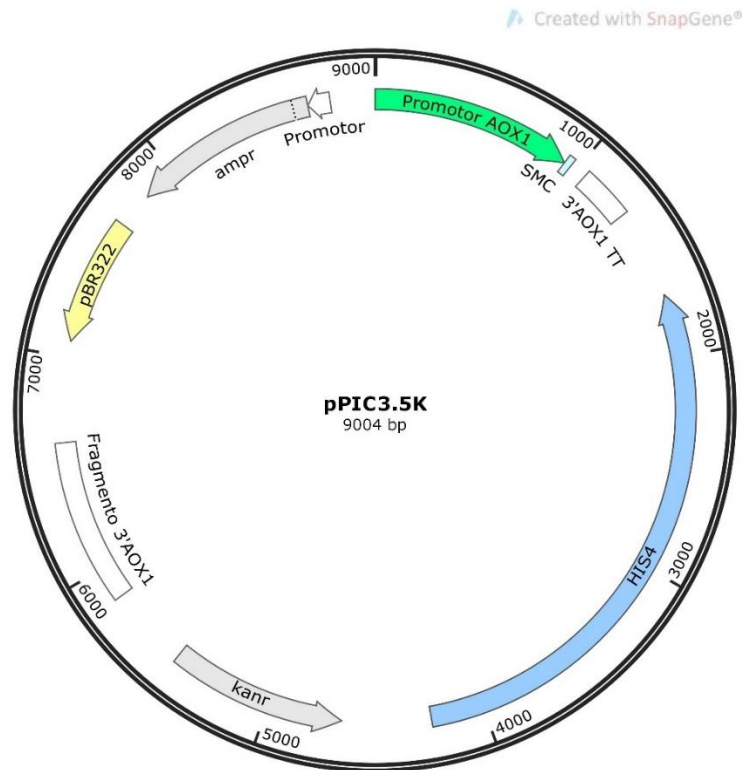
*P. pastoris* es altamente empleada para la producción de biofármacos, como la insulina recombinante humana, y enzimas de uso industrial o para la investigación<sup>20</sup>. Entre otras ventajas de *P. pastoris* es que crece a altas densidades celulares, puede producir grandes cantidades de proteínas recombinantes, tiene la capacidad de secretar estas proteínas que, por lo

general, constituyen la mayor cantidad de proteínas totales del medio de cultivo, ya que no produce muchas proteínas extracelulares naturalmente, facilitando la purificación de la proteína de interés<sup>17,20,21</sup>.

*P. pastoris* es una levadura metilotrófica, es decir, que puede emplear metanol como única fuente de carbono y de energía, lo cual es una gran ventaja por la utilización de un promotor fuerte que permite la sobreexpresión de proteínas recombinantes, este promotor es del gen *AOX1* de la enzima alcohol oxidasa, el cual es regulado por inducción con metanol y se encuentra altamente reprimido en presencia de glucosa, glicerol o etanol<sup>20</sup>.

Los vectores empleados para *P. pastoris* tienen la particularidad de que se pueden replicar en *E. coli* y expresar la proteína de interés en esta levadura. Uno de estos es pPIC3.5K, el cual es un vector para expresión intracelular, cuenta con el promotor *AOX1*, un sitio múltiple de clonación en el cual por medio de enzimas de restricción se inserta el gen de la proteína recombinante a expresar, un terminador de la transcripción y una señal de poliadenilación del gen *AOX1* para eficientizar la terminación de la transcripción y proteger el mRNA, un fragmento 3' *AOX1* de dicho gen para la recombinación homóloga en el genoma de *P. pastoris*, un origen de replicación en *E. coli* del plásmido pBR322 para la propagación del vector; además se encuentran los marcadores de selección de las clonas, uno de ellos es el gen *HIS4* de la enzima histidinol deshidrogenasa el cual es indispensable para que las cepas auxotróficas puedan crecer en un medio de cultivo con ausencia del aminoácido histidina, y dos genes de resistencia a los

antibióticos ampicilina y kanamicina para bacterias y a genética (G418) para levaduras<sup>22</sup>.



**Figura 2.** Vector de expresión pPIC3.5K con los siguientes componentes: promotor AOX1, sitio múltiple de clonación (SMC), terminador de la transcripción (3'AOX1 TT), gen *HIS4* (*HIS4*), gen de resistencia a kanamicina (*kan<sup>r</sup>*), fragmento 3'AOX1, origen de replicación en *E. coli* (pBR322) y gen de resistencia a ampicilina (*amp<sup>r</sup>*).

Este vector, como otros utilizados para *P. pastoris*, cuenta con sitios de restricción para la linearización del vector, paso que se realiza antes de la transformación para mejorar la integración y que se encuentren múltiples copias de este en el genoma de la levadura, aunque no existe una correlación directa entre los niveles de expresión y el número de copias para aquellas proteínas que serán secretadas hacia el exterior<sup>20</sup>.



*P. pastoris* tiene la capacidad de expresar proteínas recombinantes al exterior de la célula en altas concentraciones, correctamente plegadas, procesadas post-traduccionamente y activas a través de la vía del retículo endoplásmico-Golgi, gracias a señales de secreción de proteínas que son reconocidas por esa vía, de los cuales unos de los más empleados es la señal de secreción del factor  $\alpha$  proveniente del factor de apareamiento  $\alpha$  de *S. cerevisiae* ( $\alpha$ -MF,  $\alpha$ -mating factor, por sus siglas en inglés). La longitud de esta secuencia señal es de 85 aminoácidos, la cual se divide en dos regiones pre y pro. La región pre es la encargada de dirigir a la proteína recién sintetizada hacia el retículo endoplásmico para las modificaciones post-traduccionales y esta secuencia es cortada por una proteasa. La región pro dirige a la proteína del retículo endoplásmico para el aparato de Golgi y es cortada por la endoproteasa Kex2p cuando encuentra una lisina y una arginina unidas en la secuencia. Una dipeptidil aminopeptidasa, producto del gen *STE13*, es una proteína integral de membrana del aparato de Golgi la cual corta en el lado del carboxilo de secuencias repetidas, como el ácido glutámico (Glu) y alanina (Ala), en las construcciones es preferible retirar esas repeticiones para evitar la falta de homogeneidad del lado de la amina en las proteínas recombinantes debido al procesamiento incompleto de esa aminopeptidasa<sup>20,21</sup>.

Para mejorar la eficiencia en la expresión de proteínas recombinantes se han desarrollado cepas huéspedes de *P. pastoris* que han sido modificadas genéticamente con la finalidad de identificar con una mayor facilidad las clonas de aquellas que no han integrado el gen de interés en el genoma de la levadura.

Entre estas cepas se encuentran las que son auxotróficas, es decir, que no tienen la capacidad de sintetizar un compuesto orgánico en particular requerido para su crecimiento. Una de estas es la cepa SMD1168, la cual tiene un defecto en el gen de histidinol deshidrogenasa (*his4*) lo que le impide sintetizar histidina, por lo cual en medios de cultivo deficientes de este aminoácido no le será posible crecer; además esta cepa tiene la particularidad de ser deficiente de proteasas, porque no tiene la capacidad de codificar la aspartil proteasa vacuolar (*pep4*), ya que esta proteinasa A (*PEP4*) es capaz de activarse a sí misma y a otras proteasas como la carboxipeptidasa Y (*PRC1*) y la proteinasa B (*PRB1*), por lo que es de gran ayuda para prevenir la degradación de las proteínas recombinantes expresadas<sup>20</sup>.

## CAPÍTULO II

### 2. ANTECEDENTES

#### 2.1 Mutación de la glucosa oxidasa

A pesar de que la GOx proveniente de *A. niger* es la más resistente, ya que tiene un mayor rango de estabilidad a diferentes pHs y temperaturas, se ha buscado mejorar sus propiedades catalíticas, así como lo hicieron Holland y su equipo de investigación en el 2012. Ellos combinaron las mejores características de las GOx provenientes de *A. niger* y *P. amagasakiense*, esta última cataliza la oxidación de  $\beta$ -D-glucosa más eficientemente; realizaron la alineación de las secuencias de aminoácidos para detectar variaciones dentro de las regiones conservadas, así como posibles objetivos para mutagénesis. Utilizaron como microorganismo de expresión a *S. cerevisiae*. Una de las secuencias mutantes, teniendo como base la secuencia de aminoácidos de GOx de *A. niger*, con mejores parámetros cinéticos y mejor estabilidad a una alta temperatura fue la secuencia T132S/T56V (posiciones que incluyen el péptido líder), con una constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ):  $20.8 \pm 6.0$  mM, y  $T_{1/2}$ :  $39.6 \pm 2.4$  h, en comparación con una GOx comercial de *A. niger* que presenta una  $K_M$  que varía desde 3.5 – 38 mM y  $T_{1/2}$ :  $20.1 \pm 0.9$  h<sup>16</sup>.

A esa secuencia T132S/T56V le cambiaron una treonina por una serina de la posición 132, en el cual el remplazo de ese aminoácido por uno menos voluminoso podría reducir el impedimento estérico del reordenamiento con el anillo de isoaloxazina y sigue siendo formador de puentes de hidrógeno; con el cambio de una treonina por una valina de la posición 56 solo detectaron que no se encuentra directamente involucrado en la unión a FAD, ya que no llegaron a descifrar el reordenamiento estructural por el modelado computacional de ese cambio<sup>16</sup>.

## 2.2 *Pichia pastoris* como sistema de expresión de proteínas recombinantes

En los años 70's, *P. pastoris* era utilizada para la generación de biomasa o proteínas como alimento para ganado, por la compañía Phillips Petroleum en Bartlesville, Oklahoma, porque empleaba metanol como fuente de carbono económicamente sintetizable a partir de metano. Pero, en el mismo período ocurrió la “crisis del petróleo”, y esto ocasionó el aumento del precio del metano haciendo no factible el proceso de generación de biomasa a partir de *P. pastoris*; lo que originó que la compañía contratara al instituto de biotecnología Salk Institute Biotechnology/Industrial Associate en La Jolla, California, para desarrollar a *P. pastoris* como un sistema de expresión de proteínas recombinantes, por lo cual, la compañía obtuvo mejores rendimientos. Aislaron el gen *AOX1* y su promotor, desarrollaron vectores, cepas y métodos para la manipulación genética de *P. pastoris*<sup>23</sup>.

A partir de ahí, se ha investigado su capacidad como sistema de expresión génica de diversas proteínas exógenas, como las provenientes de organismos eucarióticos.

Escamilla en 1996, en su trabajo de tesis, expresó la hormona del crecimiento humano (HGHr) en dos sistemas de expresión: en *E. coli* TB1 y en *P. pastoris* GS115 (la cual tiene un defecto en el gen *his4*), y las construcciones pMalchGH22K para *E. coli* y pPIC9hGH22K (pPIC9 es un vector para expresión extracelular ya que tiene la señal de secreción del factor  $\alpha$ , es inducible con metanol, y tiene el gen *HIS4* para la selección de las clonas) para *P. pastoris*, obtuvo clonas de ambos sistemas que expresaron esa hormona recombinante, concluyendo que la HGHr proveniente de *P. pastoris* se obtiene con una mayor pureza y es biológicamente activa, a pesar que en *E. coli* se obtienen mayores niveles de producción<sup>24</sup>.

Wang y Edmondson en el 2010 realizaron la expresión de la enzima monoamino oxidasa A (MAO A) de rata Fisher en la cepa de *P. pastoris* KM71 (cepa en la que el gen *AOX1* está remplazado por el gen *ARG4* de *S. cerevisiae*, y además tiene los genes defectuosos *his4* y *arg4*, lo que le impide crecer en medios de cultivo deficientes en histidina y arginina) con la construcción pPIC3.5K/rMAO, por la técnica de transformación de esferoplastos, obtuvieron altos niveles de expresión en comparación con un trabajo anterior en el que como sistema de expresión emplearon *S. cerevisiae*, además el 90 % de la secuencia de esta enzima es idéntica a la MAO A humana, pero presenta una mayor estabilidad térmica y una mejor capacidad catalítica que la humana<sup>25</sup>.

### 2.2.1 Expresión de glucosa oxidasa en *Pichia pastoris*

Existen distintas investigaciones para la expresión del gen *gox* proveniente de *A. niger*, con diferentes cepas de *P. pastoris* y diferentes vectores para una expresión inducible o constitutiva; como en el trabajo de Yamaguchi y su equipo de investigación en el 2007, expresaron la enzima en la cepa de *P. pastoris* X-33 (tipo salvaje) utilizando el vector pGAPZ $\alpha$ C (para una expresión extracelular y continua de la enzima, tiene el promotor del gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), usaron la electroporación para la transformación; en el medio de cultivo de extracto de levadura con peptona y dextrosa (YPD) con zeocina a 30 °C con agitación crecieron las clonas que obtuvieron, y se expresó la enzima hacia el medio de cultivo. La enzima expresada tuvo una masa molecular de una de sus subunidades entre 75 – 100 kDa determinado por la técnica SDS-PAGE y una máxima actividad a pH 6 y a 37 °C, conservando una actividad de más del 80 % de la actividad máxima entre el rango de pH 5 – 7, y no menos del 92 % entre el rango de temperatura 10 – 45 °C. Después de 48 h de expresión obtuvieron una actividad de 0.83 U/mL, y entre 240 – 600 h una actividad de 1.62 U/mL<sup>26</sup>.

Meng y su equipo de trabajo en el 2013, también expresaron GOx, pero en la cepa de *P. pastoris* GS115 y el vector pPIC9; obtuvieron una glicoproteína por fermentación fed-batch a 30 °C durante 48 h, usando metanol como inductor, con una masa molecular de su subunidad de 75 kDa, una actividad máxima de 144 U/mL y una actividad específica de 155 U/mg a pH 6 y a 40 °C, siendo estable entre el rango de pH de 4 – 9 y a temperaturas menores de 55 °C, una  $K_M$  de

21.06 mM y un pl de 4.2; usaron una cromatografía de intercambio iónico para su purificación<sup>17</sup>.

Para aumentar la producción de la enzima en un fermentador de 3 L, Gu y colaboradores en el 2015, utilizaron para la fermentación manitol como cosustrato, para mejorar el metabolismo celular y reducir la demanda de O<sub>2</sub> durante la fase de producción de proteínas, junto con el inductor metanol (1:20 v/v) para la expresión de GOx junto con el *general control non-derepressible 4* (GCN4), el cual regula la biosíntesis de glutatión y protege al huésped frente a la acumulación de las ERO. La cepa empleada fue *P. pastoris* GS115 y el vector pPIC9K, utilizaron la electroporación para la transformación. Obtuvieron una proteína de un tamaño de aproximadamente 85 kDa determinado por SDS-PAGE y, una actividad enzimática de 1208.2 U/mL en comparación con la fermentación en la que solo se utilizó metanol como fuente de carbono que fue de 427.6 U/mL, durante un período de inducción de 156 h<sup>18</sup>.

Concluyeron que la utilización de manitol como cosustrato aumentó la producción de glicoproteínas y la expresión de GCN4 mejoró la viabilidad celular<sup>18</sup>.

Qiu y su equipo de investigación en el 2016, expresaron GOx en una cepa de *P. pastoris* deficiente de proteasas (SMD1168) con el vector pGAPZαA, transformada por electroporación. El tamaño de la proteína fue de aproximadamente 70 kDa en el SDS-PAGE. La actividad de la enzima en el sobrenadante del medio de cultivo YPD con zeocina, en donde se llevó a cabo la

expresión a 30 °C a pH 6 por 120 h, fue de 107.18 U/mL, demostraron que su actividad era 1.35 veces mayor que la enzima comercial<sup>27</sup>.

### 2.3 Peróxido de hidrógeno como un agente citotóxico

GOx ya ha sido estudiada como un agente antitumoral. Nathan y Cohn en 1981, desarrollaron una manera de hacer llegar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las células tumorales y probar su actividad antitumoral, sin tener que inyectar directamente este compuesto; ellos eligieron unir covalentemente GOx con microesferas de poliestireno para la producción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in situ* y prolongar mayor tiempo su generación, además esta enzima utiliza como sustratos glucosa y O<sub>2</sub> que se encuentran presentes en la sangre. La actividad enzimática de las microesferas fue del 17 %, en comparación con la solución inicial de la enzima<sup>28</sup>.

La actividad antitumoral fue probada en ratones con células de linfoma y mastocitoma inyectados por vía intraperitoneal e *in vitro*. Se observó un aumento de la supervivencia del 27 % en los ratones con linfoma que fueron tratados con las microesferas de GOx, en comparación con el grupo control, la prolongación de la supervivencia fue consistente con la destrucción de un promedio de 97.6 % del inóculo de células tumorales. Para las células con mastocitoma se requirió 4.2 veces más de las microesferas para lisar el 50 % de las células con linfoma, y en los ratones con mastocitoma, fue necesario el uso de Carmustina (BCNU), fármaco de quimioterapia inhibidor de la enzima glutatión reductasa, para provocar sinergismo junto con GOx; en los ratones la supervivencia fue del 86 %,



en comparación con el tratamiento de BCNU solo fue de 15 % y con las microesferas de GOx ninguno. También se probó la toxicidad en ratones aparentemente sanos, en los cuales no se observó alguna defunción atribuida a GOx<sup>28</sup>.

Jeong-Chae y su grupo de investigación en el 2006, determinaron que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por GOx induce muerte celular por apoptosis en un 80 % en la línea celular BJAB (hibridoma de linfocitos B) y en un menor porcentaje por necrosis. Observaron que en esta línea ocurre una disminución de la proliferación y de la viabilidad celular a una concentración de 10 mU/mL de la enzima, presentándose un comportamiento dosis dependiente.

Cheng y sus colaboradores en el 2015, realizaron la encapsulación de GOx en microesferas de alginato-quitosano de diferentes diámetros para producir ERO *in situ* y probarlos en células de cáncer de mama murino resistentes a múltiples fármacos (EMT6/AR1.0) y en la de tipo salvaje (EMT6/WT). Las microesferas de menor tamaño (4 µm) produjeron una mayor cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (560 µM) con una concentración de 400 mU/mL equivalente a la actividad de GOx, y una mayor citotoxicidad en ambas células, utilizaron el ensayo de MTT (metil tiazolil tetrazolio) ya que por medio de un microscopio confocal láser de barrido observaron que las células absorbían más las microesferas de menor tamaño y no las más grandes (140 µm). Observaron un mayor daño en la membrana y una mayor peroxidación lipídica en las células EMT6/AR1.0 que en las EMT6/WT<sup>7</sup>.

## **CAPÍTULO III**

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Debido a que el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, a su alta prevalencia y a la formación de células cancerosas que se hacen cada vez más resistentes, se hace evidente la necesidad de mejorar y desarrollar nuevos agentes terapéuticos que combatan este padecimiento.

Es por eso que, en el presente trabajo de investigación, se propone la utilización de la enzima glucosa oxidasa recombinante (GOxr) como un agente anticancerígeno, para probar su actividad en una línea celular cancerígena y en una normal, ya que las células cancerosas tienen más elevados los niveles de las ERO que las células normales, lo que las hace que sean más susceptibles a estas especies.

## CAPÍTULO IV

### 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 4.1 Hipótesis

La glucosa oxidasa recombinante, producida a partir del gen *gox* mutado de *Aspergillus niger*, expresada en *Pichia pastoris*, es capaz de formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la superficie de las membranas celulares y tener una actividad citotóxica mayor en células cancerígenas que en células normales.

#### 4.2 Objetivos

##### 4.2.1 Objetivo general

Producir la enzima glucosa oxidasa recombinante a partir del gen mutado *gox* de *Aspergillus niger* y expresada en *Pichia pastoris*, y evaluar su actividad catalítica y citotóxica *in vitro*.

##### 4.2.2 Objetivos específicos

- ◆ Diseñar y optimizar el gen mutado de la glucosa oxidasa madura (*goxM*)
- ◆ Construir y propagar el plásmido pPIC3.5K-*goxM*

- ◆ Clonar el plásmido pPIC3.5K-goxM en *P. pastoris* SMD1168
- ◆ Expresar y purificar la enzima GOxr proveniente de *P. pastoris* SMD1168
- ◆ Evaluar la actividad enzimática de la GOxr
- ◆ Evaluar la actividad citotóxica y anticancerígena *in vitro* del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado a partir de la GOxr

## CAPÍTULO V

### 5. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 5.1 Material, reactivos y equipo

El gen *goxM* empleado para la expresión de la enzima GOxr fue sintetizado e insertado en el vector pUC57 por la empresa General Biosystems, y los oligonucleótidos M13F, M13R, 5'AOX1 y 3'AOX1 por la empresa T4OLIGO. El vector pPIC3.5K proviene de la colección de plásmidos del Laboratorio de Biotecnología 2 de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Enzimas de restricción utilizadas *EcoRI*, *PstI*, *BamHI*, *NotI*, *Clal* y *SacI* (Promega); Dream Taq DNA Polimerasa (Thermo Fisher Scientific); T4 DNA Ligasa (Invitrogen), glucosa oxidasa de *A. niger* y peroxidasa de rábano picante (Bio Basic Inc.).

Las cepas y líneas celulares empleadas fueron: *E. coli* DH5 $\alpha$  proviene de la colección de bacterias del Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica de la mencionada División de Estudios de Posgrado; *P. pastoris* SMD1168 (Invitrogen); Vero ATCC® CCL-81™ y SiHa ATCC® HTB-35™.

Kits de extracción de DNA: PureLink Quick Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific) y Monarch Plasmid Miniprep (New England Biolabs). Los distintos reactivos y medios de cultivo que se requirieron provienen de Sigma, Amresco, Bio Basic Inc., Caisson, Bio Rad, Gibco, J. T. Baker.

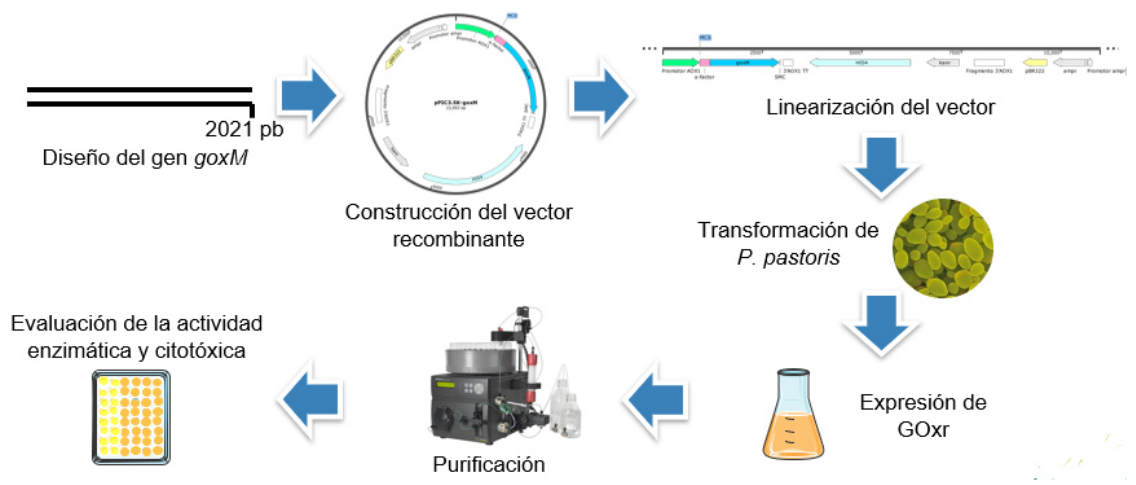
Dentro del material utilizado se encuentran tubos de 200  $\mu$ L, 1.5 mL y 2 mL (Eppendorf); tubos de 15 mL y 50 mL, puntillas para micropipeta de 10  $\mu$ L, 200  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L, frascos de cultivo y placas de 96 pocillos (Corning); matraces de 150 mL y 250 mL (Pyrex); matraces triptinizados de 500 mL (Kimax); cubeta para electroporación 0.1 cm (Bio Rad); centricon Amicon ultra-4 y ultra-15 (Millipore); tubo de diálisis SnakeSkin (Thermo Scientific); columna cromatográfica HiTrap Q FF (GE Healthcare).

Equipos: Espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c, espectrofotómetro Jenway 7305, microincubadora con agitación SelectBioproducts Mix 56, incubadora con agitación Labnet 311DS, incubadora con CO<sub>2</sub> Thermo Scientific 3403, White/UV transiluminador UVP, fuente de poder Thermo Scientific EC 1000-90, cámara para electroforesis Life Technologies Mini-V 8.10, microcentrifuga refrigerada Thermo Scientific MicroC, centrifuga refrigerada Thermo Scientific Sorval, termociclador Thermo Fisher Scientific Simpli Amp, electroporador Eppendorf Eporator, cromatógrafo FPLC ÄKTAprime plus General Electric, lector de placas ELISA Biotek ELX800, microscopio invertido Carl Zeiss Primovert, campana de bioseguridad nivel II Baker SG-302, pH-metro Orion 3 Star pH Benchtop Thermo, plancha de calentamiento Corning, balanza analítica AND HR200, sistema de purificación de agua Millipore Simplicity UV, esterilizador

eléctrico autoclave All American 75x, refrigerador horizontal Torrey, congelador horizontal -20 °C Torrey.

## 5.2 Metodología general

En la figura 3 se esquematiza la metodología general empleada para el cumplimiento de cada uno de los objetivos que se encuentran en el presente trabajo de investigación.



**Figura 3.** Representación esquemática de la metodología general de trabajo.

## 5.3 Diseño y optimización del gen mutado de la glucosa oxidasa madura

Para el diseño del gen *goxM* se utilizó como base la secuencia de DNA del gen *gox* obtenida de la base de datos GenBank de NCBI con la clave KJ774107.1, de la cual se tomó solo la región que codifica a la enzima madura, a esta secuencia se le cambiaron los codones que codifican una Thr por una Ser

de la posición 132 y una Thr por una Val de la posición 56 de la secuencia de aminoácidos con la clave AID13306.1. Al inicio de la cadena se le añadió la secuencia de DNA que codifica la señal de secreción del factor  $\alpha$  ( $\alpha$ -Factor), y en los extremos se le agregaron los sitios de restricción para las endonucleasas: al inicio *Bam*HI y al final *Not*I.

Este gen se sintetizó en un laboratorio de servicios moleculares comerciales General Biosystems, en donde se realizó la optimización de codones adecuado para levaduras.

Posteriormente se realizó un análisis con programas computacionales de la secuencia final, se analizó el marco abierto de lectura, la composición de aminoácidos que codifica y el procesamiento del péptido líder, utilizando los programas ORFfinder de NCBI y SignalP 4.1 Server.

#### 5.4 Construcción y propagación del plásmido pPIC3.5K-goxM

##### 5.4.1 Clonación, propagación y extracción de los plásmidos pPIC3.5K y pUC57-goxM

El plásmido pUC57-goxM, se recibió liofilizado, fue adquirido por la empresa General Biosystems, contiene el gen sintetizado *goxM*. El plásmido fue resuspendido con 50  $\mu$ L de agua ultra pura y se determinó su concentración en el espectrofotómetro, la cual fue de 253.9 ng/ $\mu$ L.

Se transformaron células de *E. coli* DH5 $\alpha$  rubidio competentes con los plásmidos pPIC3.5K, utilizado como vector de expresión con una concentración



de 56.3 ng/ $\mu$ L, y pUC57-goxM por separado, empleando la técnica de choque térmico. A 20  $\mu$ L de células rubidio competentes se les añadió 1  $\mu$ L de la solución del plásmido, se incubaron en hielo por 20 min, después de ese tiempo se realizó el choque térmico a 42 °C en baño de agua por 45 s y se volvió a incubar en hielo por 2 min. Se agregaron 800  $\mu$ L del medio de cultivo Luria-Bertani (LB) y se incubó con agitación a 37 °C por 30 min. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 4 min, se decantó una parte del sobrenadante y con lo que quedó del medio se resuspendió la pastilla de células, y se sembró en una caja con medio LB más Ampicilina (Amp 100  $\mu$ g/mL) con agar, se incubó a 37 °C por 16 h (caja invertida).

De las colonias obtenidas se tomó una de ellas de cada transformación, se sembraron en tubos cónicos de 15 mL conteniendo 5 mL de LB/Amp (100  $\mu$ g/mL) y se incubaron a 37 °C con agitación de 220 rpm por 16 h. Después se realizó la extracción de DNA plasmídico por la técnica de lisis alcalina, se tomaron 1.5 mL de cada cultivo bacteriano y se transfirieron a tubos de 2 mL. Estos tubos se centrifugaron a 13000 rpm por 2 min y se descartó el sobrenadante. Cada pellet de células se resuspendió con 300  $\mu$ L del buffer Tris-EDTA-NaOH-SDS (TENS) y se agitó en el vortex por 10 s, se adicionaron 150  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M y de nuevo se agitó por 10 s. Luego se centrifugó a 13300 rpm por 10 min y se pasó el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL, se le agregaron 900  $\mu$ L de etanol absoluto y se incubó a -20 °C por 30 min. Después de este tiempo se centrifugó a 13300 rpm por 15 min y se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet de DNA con 500  $\mu$ L de etanol al 70 % para eliminar el exceso de sales, se volvió a

centrifugar a 13000 rpm por 2 min y se retiró el sobrenadante para secar el pellet a temperatura ambiente por 10 min, y finalmente se disuelve con 50 µL de agua ultra pura. Se midió la concentración del DNA disuelto en el espectrofotómetro y se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

Para la caracterización del vector de expresión pPIC3.5K se le realizaron dos digestiones enzimáticas en tubos de 200 µL, en la primera con *EcoRI* se lineariza el vector observando en el gel de electroforesis una banda de 9004 pb, y la segunda con *PstI* (ambas enzimas de Promega) se corta el vector dejando tres fragmentos uno de 5208 pb, otros de 2555 pb y 1241 pb, dicha predicción de los cortes virtuales se realizó con el programa computacional SerialCloner. Los componentes y las condiciones de la digestión se observan en la tabla 1; se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, corrido a 75 V por 5 min y a 110 V por 25 min, en buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1 X para observar las bandas predichas en el transiluminador.

**Tabla 1.** Reacción de digestión enzimática de pPIC3.5K con las enzimas *EcoRI* y *PstI*.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Condiciones</b>
H <sub>2</sub> O ultra pura	10 µL	Temperatura: 37 °C Tiempo: 3 h
Buffer H 10 X	2 µL	
BSA acetilado 10 µg/ µL	0.2 µL	
DNA	1 µg	
<i>EcoRI</i> o <i>PstI</i> 10 U/µL	5 U	
Volumen	20 µL	

#### 5.4.2 Amplificación del gen *goxM*

Se realizó una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para obtener el amplicón de 2112 pb del SMC del plásmido pUC57-*goxM* donde se encuentra el

gen *goxM* para su posterior digestión. En un tubo de 200  $\mu\text{L}$  se mezclaron los componentes que se mencionan en la tabla 2 para la reacción, se utilizó la enzima Dream Taq DNA Polimerasa (Thermo Fisher Scientific) y los primers M13 Forward: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' y M13 Reverse: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC -3' por la empresa T4OLIGO; en la tabla 3 se encuentran las condiciones que se programaron en el termociclador. Después se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1 X para verificar que se haya realizado la amplificación.

**Tabla 2.** Componentes de la reacción de PCR para la amplificación del SMC de pUC57-*goxM*.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
H <sub>2</sub> O ultra pura	33.5 $\mu\text{L}$
Dream Taq Buffer 10 X	5 $\mu\text{L}$
DNTPs 2 $\mu\text{M}$ de cada uno	5 $\mu\text{L}$
M13 Forward 20 $\mu\text{M}$	2.5 $\mu\text{L}$
M13 Reverse 20 $\mu\text{M}$	2.5 $\mu\text{L}$
DNA	86.4 ng
Dream Taq DNA polimerasa 5 U/ $\mu\text{L}$	2.5 U
Volumen	50 $\mu\text{L}$

**Tabla 3.** Programa de PCR establecido en el termociclador para la amplificación del SMC de pUC57-goxM.

<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95 °C	2 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 s	35
Alineación	59 °C	30 s	
Extensión	72 °C	1 min 30 s	
Extensión final	72 °C	10 min	1

Cuando terminó la electroforesis, el gel de agarosa se colocó en el transiluminador para observar los resultados de la reacción de PCR (no exponer por mucho tiempo a la luz UV), y a partir de este se realizó la extracción de DNA a partir del gel de agarosa de acuerdo con las instrucciones del kit “PureLink Quick Gel Extraction” (Thermo Fisher Scientific) y se procedió a cuantificar el DNA obtenido.

#### 5.4.3 Doble digestión enzimática del amplicón del gen *goxM* y del vector de expresión pPIC3.5K

Una vez obtenido el DNA del amplicón del SMC del plásmido pUC57-goxM se procedió a realizar la doble digestión enzimática para la liberación del fragmento correspondiente al gen *goxM* que se encuentra en esa región, exponiendo los sitios de restricción de las enzimas *Bam*HI y *Not*I para la posterior ligación del gen con el vector de expresión pPIC3.5K. Los componentes y las condiciones de la digestión se observan en la tabla 4. Luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1 X para extraer el fragmento de

2021 pb utilizando el kit de extracción de DNA a partir del gel de agarosa y se determinó su concentración.

**Tabla 4.** Doble digestión enzimática del amplicón del SMC del plásmido pUC57-goxM con las enzimas *Bam*HI y *Not*I.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Condiciones</b>
H <sub>2</sub> O ultra pura	0.5 µL	Temperatura: 37 °C Tiempo: 4 h
Buffer D 10 X	4 µL	
BSA acetilado 10 µg/ µL	0.4 µL	
DNA	3.6 µg	
<i>Bam</i> HI 10 U/µL	36 U	
<i>Not</i> I 10 U/µL	25 U	
Volumen	40 µL	

Se sembraron en tubos cónicos de 15 mL conteniendo 5 mL de LB/Amp (100 µg/mL) colonias de *E. coli* DH5α transformadas con el vector pPIC3.5K y se incubaron a 37 °C con agitación de 220 rpm por 16 h. Después de ese tiempo se realizó la extracción de DNA plasmídico de acuerdo con las instrucciones del kit “Monarch Plasmid Miniprep” (New England Biolabs) y se midió su concentración.

Se realizó la doble digestión enzimática para liberar un fragmento del SMC de pPIC3.5K y exponer los sitios de restricción de las enzimas *Bam*HI y *Not*I para la posterior ligación del vector con el gen. Los componentes y las condiciones de la digestión se observan en la tabla 5 y se procedió a extraer el fragmento digerido de igual manera que el gen.

**Tabla 5.** Doble digestión enzimática de pPIC3.5K con las enzimas *Bam*HI y *Not*I.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Condiciones</b>
H <sub>2</sub> O ultra pura	4.5 µL	Temperatura: 37 °C Tiempo: 4 h
Buffer D 10 X	5 µL	
BSA acetilado 10 µg/ µL	0.5 µL	
DNA	4.1 µg	
<i>Bam</i> HI 10 U/µL	40 U	
<i>Not</i> I 10 U/µL	30 U	
Volumen	50 µL	

#### 5.4.4 Reacción de ligación del vector pPIC3.5K con el inserto *goxM*

La reacción de ligación se llevó a cabo con un relación molar vector:inserto de 1:3 (pPIC3.5K:*goxM*) en un tubo de 200 µL, utilizando la enzima T4 DNA Ligasa (Invitrogen). Los componentes y las condiciones de la reacción se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6.** Reacción de ligación del vector pPIC3.5K con el inserto *goxM* con una relación molar de 1:3.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Condiciones</b>
Buffer 5 X	5 µL	Temperatura: 16 °C Tiempo: 16 h
Vector	124.6 ng	
Inserto	82.2 ng	
T4 DNA ligasa 5 U/µL	10 U	
Volumen	25 µL	

Para determinar la funcionalidad de la enzima T4 DNA ligasa se realizó una reacción de ligación del vector pPIC3.5K digerido con una sola enzima *Bam*HI para volver a unir al plásmido, los componentes y las condiciones de la digestión se observan en la tabla 7 y los de la reacción de ligación en la tabla 8.

**Tabla 7.** Reacción de digestión enzimática de pPIC3.5K con la enzima *Bam*HI.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Condiciones</b>
H <sub>2</sub> O ultra pura	3.2 µL	Temperatura: 37 °C Tiempo: 2 h
Buffer E 10 X	2 µL	
BSA acetilado 10 µg/ µL	0.2 µL	
DNA	1 µg	
<i>Bam</i> HI 10 U/µL	5 U	
Volumen	20 µL	

**Tabla 8.** Reacción de ligación del vector pPIC3.5K.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Condiciones</b>
H <sub>2</sub> O ultra pura	2.5 µL	Temperatura: 16 °C Tiempo: 16 h
Buffer 5 X	5 µL	
Vector	98.7 ng	
T4 DNA ligasa 5 U/µL	10 U	
Volumen	25 µL	

#### 5.4.5 Transformación de *Escherichia coli* DH5α con el vector construido pPIC3.5K-goxM y su caracterización

Se transformaron células de *E. coli* DH5α rubidio competentes con 10 µL de la reacción de ligación del vector pPIC3.5K con el inserto *goxM* y 10 µL de la reacción de ligación del vector pPIC3.5K solo, por la técnica de choque térmico (5.4.1) usando 50 µL de células competentes. Se tomaron colonias de la transformación de la reacción de ligación del vector con el inserto, se sembraron en tubos cónicos de 15 mL conteniendo 5 mL de LB/Amp (100 µg/mL) y se incubaron a 37 °C con agitación de 220 rpm por 16 h. Después se realizó la extracción de DNA plasmídico por la técnica de lisis alcalina (5.4.1).

Se realizó una PCR para obtener el amplicón de 2210 pb del SMC del plásmido pPIC3.5K-goxM para la caracterización de las clonas obtenidas. Los

componentes se mencionan en la tabla 9 para la reacción, se utilizó la enzima Dream Taq DNA polimerasa y los primers 5'AOX1 Forward: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' y 3'AOX1 Reverse: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3', y en la tabla 10 se encuentran las condiciones que se programaron en el termociclador. Después se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1 X para caracterización de las bandas obtenidas.

**Tabla 9.** Componentes de la reacción de PCR para la amplificación del SMC de pPIC3.5K-goxM.

Componente	Cantidad
H <sub>2</sub> O ultra pura	36 µL
Dream Taq Buffer 10 X	5 µL
DNTPs 2 µM de cada uno	5 µL
5'AOX1 Forward 20 µM	1.25 µL
3'AOX1 Reverse 20 µM	1.25 µL
DNA	1 µL
Dream Taq DNA polimerasa 5 U/µL	2.5 U
Volumen	50 µL

**Tabla 10.** Programa de PCR establecido en el termociclador para la amplificación del SMC de pPIC3.5K-goxM.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	95 °C	45 s	
Alineación	60 °C	1 min	35
Extensión	72 °C	2 min 15 s	
Extensión final	72 °C	10 min	1

Se inoculó la clona de *E. coli* DH5α que presentó la banda esperada de 2210 pb de la reacción de PCR en tubos cónicos de 15 mL conteniendo 5 mL de LB/Amp (100 µg/mL) y se incubaron a 37 °C con agitación de 220 rpm por 16 h.



Después de ese tiempo se realizó la extracción de DNA plasmídico utilizando el kit miniprep antes mencionado y se midió su concentración.

Para confirmar que sea el plásmido pPIC3.5K-goxM se le realizó una digestión enzimática con la enzima *ClaI* (Promega), la cual corta el plásmido dejando tres fragmentos: 4030 pb, 3584 pb y 3379 pb; y como control se utilizó el plásmido pPIC3.5K, esta enzima lo corta en tres fragmentos: 4030 pb, 3584 pb y 1390 pb. Los componentes y las condiciones de la digestión se observan en la tabla 11; se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1 X para observar las bandas predichas.

**Tabla 11.** Reacción de digestión enzimática de pPIC3.5K y pPIC3.5K-goxM con la enzima *ClaI*.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad pPIC3.5K</b>	<b>Cantidad pPIC3.5K-goxM</b>	<b>Condiciones</b>
H <sub>2</sub> O ultra pura	10.1 µL	12.9 µL	Temperatura: 37 °C Tiempo: 4 h
Buffer C 10 X	2 µL	2 µL	
BSA acetilado 10 µg/ µL	0.5 µL	0.5 µL	
DNA	1 µg	1 µg	
<i>ClaI</i> 10 U/µL	20 U	20 U	
Volumen	20 µL	20 µL	

## 5.5 Clonación del plásmido pPIC3.5K-goxM en *Pichia pastoris* SMD1168

### 5.5.1 Linearización del plásmido pPIC3.5K-goxM con *SacI*

Se realizó una digestión enzimática del plásmido pPIC3.5K-goxM para linearizarlo con la enzima *SacI* (Promega), la cual corta dentro de la secuencia del promotor AOX1 lo que favorece la inserción génica del plásmido en el locus AOX1. Los componentes y las condiciones de la digestión se observan en la tabla

12. También se linearizó el vector pPIC3.5K para posteriormente transformar *P. pastoris* y utilizar esa cepa como control.

**Tabla 12.** Reacción de digestión enzimática para la linearización del plásmido pPIC3.5K-goxM con la enzima *SacI*.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad pPIC3.5K-goxM</b>	<b>Cantidad pPIC3.5K</b>	<b>Condiciones</b>
H <sub>2</sub> O ultra pura	3 µL	3 µL	Temperatura: 37 °C Tiempo: 4 h
Buffer J 10 X	4.5 µL	4.5 µL	
BSA acetilado 10 µg/ µL	0.5 µL	0.5 µL	
DNA	10 µg	10 µg	
<i>SacI</i> 10 U/µL	30 U	30 U	
Volumen	45 µL	45 µL	

Después del tiempo de incubación se inactivó la enzima a 65 °C por 15 min, y posteriormente se precipitó el DNA plasmídico linearizado con 900 µL de etanol absoluto, se mantuvo a -20 °C por 30 min. Luego se centrifugó a 13300 rpm por 15 min y se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet de DNA con 500 µL de etanol al 70 % para eliminar el exceso de sales, se volvió a centrifugar a 13000 rpm por 2 min y se retiró el sobrenadante para secar el pellet a temperatura ambiente por 10 min, y finalmente se disuelve con 10 µL de agua ultra pura. Se midió la concentración del DNA disuelto en el espectrofotómetro y se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

#### 5.5.2 Transformación por electroporación de *Pichia pastoris* SMD1168 con el plásmido pPIC3.5K-goxM

Antes de realizar la electroporación se tiene que preparar células de *P. pastoris* electro-competentes para eliminar el exceso de sales. Primero se inoculó

una colonia de *P. pastoris* en un tubo cónico de 15 mL conteniendo 10 mL de YPD, se incubó a 30 °C con agitación de 220 rpm por 14 h. Después de ese tiempo se tomaron 250 µL del cultivo y se inocularon en 250 mL de YPD contenidos en un matraz de 500 mL, se incubó a 30 °C con agitación de 220 rpm hasta una densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) entre 1 – 1.3. Posteriormente se centrifugó el medio de cultivo a 3700 rpm por 5 min a 4 °C (en los siguientes pasos de centrifugación se usaron estas condiciones) y se descartó el sobrenadante. El pellet celular se resuspendió con 250 mL de agua desionizada estéril y fría. Se centrifugó, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 125 mL de agua. Se volvió a centrifugar, a desechar el sobrenadante y a resuspender el pellet con 20 mL de sorbitol 1 M estéril y frío. Se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular con 500 µL de sorbitol 1 M, se transfirió la solución a un criotubo para almacenarlo a -80 °C hasta su uso.

Para la electroporación de *P. pastoris* SMD1168 electro-competente se requirieron 10 µL del plásmido pPIC3.5K-goxM linearizado (5 – 10 µg de DNA), los cuales se añadieron a 80 µL de células electro-competentes, se mezcló y se transfirió a una cubeta previamente enfriada, se incubó en hielo por 5 min. Se secó la cubeta antes de colocarla en el electroporador, y se realizó el choque eléctrico con las siguientes condiciones: 2500 V, 25 µF y 200 Ω, e inmediatamente se añadió a la cubeta 1 mL de sorbitol 1 M frío. Se transfirió la muestra a un tubo de 2 mL y se incubó a 30 °C por 2 h. Después se tomaron 200 µL de esa muestra y se sembraron en cajas con el medio de cultivo mínimo de

dextrosa (MD) con agar, medio con deficiencia de aminoácidos en el cual solo las células que integraron el plásmido linearizado en su genoma serán capaces de sintetizar histidina (His<sup>+</sup>) necesaria para su crecimiento, y en cajas con medio YPD agar para observar viabilidad celular. Se incubó a 30 °C hasta la aparición de colonias. También se electroporó *P. pastoris* SMD1168 electro-competente con el vector pPIC3.5K linearizado y se sembró sin transformar en el medio MD agar para usarlos como controles.

### 5.5.3 Caracterización de la integración del plásmido pPIC3.5K-goxM al genoma de *Pichia pastoris* SMD1168

Se tomaron colonias que crecieron en el medio MD agar de *P. pastoris* transformada con el plásmido pPIC3.5K-goxM, se sembraron en cajas con el medio YPD/G418 agar (200 µg/mL) y se incubaron a 30 °C hasta la aparición de colonias. Posteriormente se tomaron las colonias y se inocularon en tubos cónicos de 15 mL conteniendo 5 mL de medio YPD/G418 (200 µg/mL) y se incubaron a 30 °C con agitación de 220 rpm por 3 días, solo las células que integraron el plásmido en su genoma son capaces de crecer en el medio de cultivo con ese antibiótico.

Después se procedió a realizar la extracción de DNA genómico con Tritón-SDS-NaCl-Tris-HCl-EDTA (TSNT), se tomaron 4 mL de cada cultivo de levaduras y se transfirieron a tubos de 2 mL. Se centrifugaron a 12000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante. El pellet de células se resuspendió con 200 µL de TSNT y se agitó en el vortex por 30 s, se adicionaron 200 µL de fenol y se agitó

por otros 30 s, se agregaron 200  $\mu$ L de SEVAG y se agitó por 5 min, se adicionaron 300  $\mu$ L de Tris-HCl-EDTA (TE) y se agitó por 30 s. Luego se centrifugó a 13000 rpm por 7 min y se transfirió la fase acuosa a un tubo de 2 mL, se le agregaron 2 mL de etanol absoluto y se mezcló ligeramente por inversión. Después de este tiempo se centrifugó a 13000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet de DNA con 500  $\mu$ L de etanol al 70 %, se volvió a centrifugar a 13000 rpm por 10 min y se retiró el sobrenadante para secar el pellet a temperatura ambiente por 10 min, y finalmente se disolvió con 30  $\mu$ L de agua ultra pura y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1 X. Se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

Se realizó una PCR para confirmar la integración del plásmido pPIC3.5K-goxM en el genoma de *P. pastoris* SMD1168. Si ocurrió la integración se obtendrá el amplicón de 2210 pb del SMC del plásmido pPIC3.5K-goxM. Los componentes se encuentran en la tabla 13 para la reacción, se utilizó la enzima Dream Taq DNA polimerasa y los primers 5'AOX1 Forward y 3'AOX1 Reverse, y se utilizaron las mismas condiciones de la tabla 10 para programar el termociclador.

**Tabla 13.** Componentes de la reacción de PCR para la confirmación de la integración del plásmido pPIC3.5K-goxM al genoma de *P. pastoris*.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
H <sub>2</sub> O ultra pura	35.5 $\mu$ L
Dream Taq Buffer 10 X	5 $\mu$ L
DNTPs 2 $\mu$ M de cada uno	5 $\mu$ L
5'AOX1 Forward 20 $\mu$ M	1.25 $\mu$ L
3'AOX1 Reverse 20 $\mu$ M	1.25 $\mu$ L
DNA	1.5 $\mu$ L
Dream Taq DNA polimerasa 5 U/ $\mu$ L	2.5 U
Volumen	50 $\mu$ L

Después se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1 X para observar los resultados de la amplificación. También se realizó la extracción y PCR de DNA genómico de *P. pastoris* transformada con el vector pPIC3.5K para comparar los resultados obtenidos.

## 5.6 Expresión y purificación de la enzima glucosa oxidasa recombinante proveniente de *Pichia pastoris* SMD1168

### 5.6.1 Expresión piloto de la enzima glucosa oxidasa recombinante y caracterización por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se realizó una primera expresión de GOxr para determinar las condiciones óptimas de crecimiento e inducción.

Primeramente, se seleccionaron dos clonas de *P. pastoris* portadoras del gen *goxM* y una clona transformada con el vector pPIC3.5K y se inocularon en tubos cónicos de 15 mL conteniendo 5 mL de medio YPD/G418 (200 µg/mL) y se incubaron a 30 °C con agitación a 220 rpm por 3 días. Después de ese tiempo se centrifugaron los cultivos a 5000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. Cada pellet de células se resuspendió con el medio enriquecido amortiguado adicionado con glicerol (BMGY) y se transfirió a un matraz de 150 mL conteniendo 25 mL del medio BMGY, y se incubaron los cultivos a 30 °C con agitación de 250 rpm hasta obtener una DO<sub>600</sub> entre 4 – 6. Posteriormente para la inducción se procedió a cambiar el medio de cultivo, se centrifugaron los

cultivos a 5000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. Cada pellet de células se resuspendió con agua desionizada estéril y se centrifugó con las mismas condiciones, este paso se realizó dos veces, y finalmente el pellet obtenido se resuspendió con el medio enriquecido amortiguado adicionado con metanol (BMMY) y se transfirió cada pellet a un matraz de 150 mL conteniendo 25 mL del medio BMMY y se incubaron a 30 °C con agitación de 250 rpm por 96 h, cada 24 h se adicionó metanol para una concentración final al 1 %, se tomaron muestras de 4 mL a las 48 h, 72 h y 96 h.

Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min para obtener el sobrenadante libre de levadura, el cual se concentró utilizando un centrífugo de corte de 50 kDa, se centrifugó a 5000 rpm por 7 min, se descartó el eluato y las muestras concentradas se transfirieron a un tubo de 1.5 mL y se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis.

Se realizó una electroforesis de proteínas SDS-PAGE de las muestras concentradas, se espera observar una banda de aproximadamente 63 kDa correspondiente al homodímero de la GOxr madura, predicha por el servidor virtual ExPASy - ProtParam. Se tomaron 120 µL de las muestras y se les adicionaron 40 µL de buffer 4 X de carga para proteínas, las soluciones se mezclaron y calentaron a 95 °C en baño de agua por 4 min. Se cargaron 20 µL de cada muestra y 7 µL del marcador de peso molecular para proteínas a los carriles de la fase concentradora del gel de poliacrilamida al 4 %, se aplicó una primera corriente de 80 V por 10 min y una segunda corriente de 140 V por 70 min en buffer Tris-Glicina-SDS (TGS) 1 X para que las proteínas pasen por la

fase separadora del gel de poliacrilamida al 11 %, las composiciones de las fases del gel de poliacrilamida se encuentran en la tabla 14 y 15. Después de ese tiempo se retiró el gel de los cristales, se lavó con agua desionizada y se colocó en un recipiente para teñirlo con la solución colorante de Coomassie, en donde permaneció en agitación lenta por una noche a temperatura ambiente. Luego se retiró la solución colorante, se agregó la solución decolorante y se agitó por 5 min, se retiró esa solución y se volvió añadir solución decolorante para observar las bandas azules correspondientes a las proteínas con un fondo claro del gel.

**Tabla 14.** Fase concentradora del gel para SDS-PAGE al 4 %.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
H <sub>2</sub> O ultra pura	6.1 mL
Acrilamida/Bis 30 %	1.3 mL
Gel buffer Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	2.5 mL
SDS 10 %	100 µL
Persulfato de amonio 10 %	50 µL
TEMED	10 µL

**Tabla 15.** Fase separadora del gel para SDS-PAGE al 11 %.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
H <sub>2</sub> O ultra pura	3.7 mL
Acrilamida/Bis 30 %	3.7 mL
Gel buffer Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 mL
SDS 10 %	100 µL
Persulfato de amonio 10 %	50 µL
TEMED	5 µL



### 5.6.2 Escalamiento de la expresión de la enzima glucosa oxidasa recombinante

Se inoculó una colonia de *P. pastoris* SMD1168 portadora del gen *goxM* en un tubo cónico de 15 mL conteniendo 5 mL de medio YPD/G418 (200 µg/mL) y se incubaron a 30 °C con agitación de 220 rpm por 3 días. Después de ese tiempo se centrifugó el cultivo a 5000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. El pellet de células se resuspendió con el medio BMGY y se transfirió a un matraz de 250 mL conteniendo 100 mL del medio BMGY, y se incubó a 30 °C con agitación de 250 rpm hasta obtener una DO<sub>600</sub> entre 4 – 6. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 5000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió con agua desionizada estéril y se centrifugó con las mismas condiciones, este paso se realizó dos veces, y finalmente el pellet obtenido se resuspendió con el medio BMMY y se transfirió a cuatro matraces triptinizados de 500 mL conteniendo cada uno 125 mL del medio BMMY, se incubaron a 30 °C con agitación de 250 rpm por 96 h.

Luego el medio de cultivo se centrifugó a 5000 rpm por 10 min para obtener el sobrenadante libre de levadura, el cual se concentró utilizando un centrifugador de corte de 50 kDa, se centrifugó a 5000 rpm por 7 min, se descartó el eluato.

La muestra concentrada se dializó con una membrana de diálisis de 10 kDa, en buffer de fosfatos 0.02 M pH 7. Se cambió el buffer dos veces cada dos horas, y después se dejó dializando por 12 h. Después se centrifugó a 5000 rpm por 5 min, para quitar las burbujas presentes.

### 5.6.3 Purificación de la enzima glucosa oxidasa recombinante

La purificación de la enzima se realizó por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) en el equipo ÄKTAprime plus (General Electric), la columna usada fue HiTrap QFF de 5 mL (GE Healthcare) de intercambio aniónico empacada con agarosa y el grupo cargado  $-N^+(CH_3)_3$ . Esta cromatografía se basa en la unión de moléculas de carga opuesta por enlaces iónicos.

Primero se equilibró la columna con 5 volúmenes del buffer de unión: buffer de fosfatos 0.02 M pH 7, luego se cargó la muestra dializada y centrifugada, se lavó la columna con 5 volúmenes del buffer de unión o hasta que disminuya la absorbancia y se mantenga constante. A continuación, se realizó la elución por gradiente al 100 % con 40 volúmenes del buffer de elución: buffer de fosfatos 0.02 M más NaCl 1 M pH 7, se recolectaron las fracciones y se analizaron por SDS-PAGE aquellas que presentaron un incremento en la absorbancia, para observar la presencia de la proteína de interés y su pureza.

### 5.7 Evaluación de la actividad enzimática de la glucosa oxidasa recombinante

Se tomaron 2.4 mL de solución de o-dianisidina 0.21 mM disuelto en buffer de fosfato 0.1 M a pH 6 en una cubeta, 0.5 mL de solución de  $\beta$ -D-glucosa al 5 % v/v disuelto en buffer de fosfato, y 100  $\mu$ L de solución de peroxidasa de rábano picante 60 U/mL en buffer de fosfato, se mezclaron las soluciones y se incubaron a 35 °C en una cubeta. Después se agregaron 100  $\mu$ L de la muestra o el estándar y se mezcló inmediatamente. Se midió el incremento de la absorbancia a 500 nm

en un espectrofotómetro UV-Vis a los 30 s y cada minuto por 5 min<sup>18</sup>. Se realizó una curva de calibración con un estándar de GOx comercial.

## 5.8 Cuantificación de proteínas

Para la determinación de las proteínas totales se utilizó la técnica de Bradford, en la cual se tomaron 10 µL de muestra a analizar por triplicado y se mezclaron con 200 µL del reactivo Bradford 1 X, se incubó la muestra a temperatura ambiente por 5 min, y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se realizó una curva de calibración con un estándar de albúmina sérica bovina<sup>29</sup>.

## 5.9 Evaluación de la actividad citotóxica y anticancerígena *in vitro* del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado a partir de la glucosa oxidasa recombinante

### 5.9.1 Proliferación de las líneas celulares Vero y SiHa

Primero se realizó el descongelamiento de las líneas celulares en un baño de agua a 37 °C, después se desinfectaron los viales con etanol al 70 %, se tomaron 500 µL de células y se transfirieron a un frasco de cultivo, se añadieron 3 ml del medio apropiado para cada línea celular, Vero ATCC® CCL-81™ (células de riñón de mono verde) y SiHa ATCC® HTB-35™ (células de cáncer de cérvix humano) con medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB). Se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub> hasta la formación de la monocapa celular (cuando las células se adhieren al

frasco de cultivo), se observó su formación con el microscopio utilizando el objetivo de 10 X. Se renovó el medio de cultivo cada 2 o 3 días<sup>30</sup>.

Cuando el cultivo alcanzó un nivel de confluencia de aproximadamente del 80 % de proliferación se realizó un subcultivo para mantener a las células en crecimiento exponencial, en el cual primero se desprendió la monocapa del frasco de cultivo con la ayuda de la enzima proteolítica tripsina que rompe las uniones intercelulares. Para eso se retiró el medio de cultivo, se hizo un lavado celular con solución salina de buffer de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés), se retiró esa solución y se adicionaron 500  $\mu$ L de tripsina 0.25 % - EDTA (preincubada a 37 °C), posteriormente se incubó a 37 °C de 3 – 5 min, se observó el desprendimiento de la monocapa por el microscopio, se añadió 1 mL de medio de cultivo para la inactivación de la tripsina, se transfirió a un tubo cónico para centrifugar las células a 1300 rpm por 10 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células con 5 mL de medio de cultivo, posteriormente se calculó la concentración de células que se encuentran en suspensión con la cámara de Neubauer y se realizaron diluciones de la suspensión celular para añadir a un nuevo frasco de cultivo alrededor de 50,000 células/mL o a placas de 96 pocillos, cada uno con 5,000 células en 100  $\mu$ L. Se incubaron las células con las condiciones antes mencionadas.

#### 5.9.2 Evaluación de la actividad citotóxica y anticancerígena *in vitro*

Para el ensayo se usó la sal de tetrazolio WST-1, es una técnica colorimétrica cuantitativa, en la cual el reactivo WST-1 es reducido a formazán

por el sistema succinato-tetrazolio reductasa perteneciente al proceso metabólico de fosforilación oxidativa de aquellas células que se encuentran metabólicamente activas<sup>31,32</sup>.

Se evaluó la viabilidad, por ende, la citotoxicidad de la enzima GOxr en la línea celular Vero, y la actividad anticancerígena en la línea celular SiHa; y la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) en las dos líneas celulares.

Después de 24 h de incubación de las células en las placas de 96 pocillos se añadió la enzima GOxr por microdilución partiendo de la concentración de 100 mU/mL, se realizó por triplicado. Se incubó a 37 °C con una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> por 2 h, luego se reemplazó el medio de cultivo por nuevo libre de GOxr, se siguió incubando por 22 h más. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se añadió a cada pocillo 95 µL de medio fresco y 5 µL del reactivo WST-1, y se incubó a 37 °C con una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> por 2 h. Después se midió la DO<sub>450</sub> en el lector de placas.

Con las absorbancias obtenidas se puede calcular el porcentaje de viabilidad celular con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Viabilidad celular} = \left( \frac{\text{Abs. analito} - \text{Abs. blanco}}{\text{Abs. control negativo} - \text{Abs. blanco}} \right) \times 100$$

En la cual la absorbancia del analito es de las células que fueron tratadas con la enzima GOxr, la absorbancia del control negativo fue de las células sin tratar, el blanco es el medio de cultivo con el reactivo WST-1. Con el porcentaje de viabilidad se puede obtener el porcentaje de citotoxicidad, y se determinó el IC<sub>50</sub> en cada línea celular.

$$\% \text{ de Citotoxicidad} = 100 \% - \% \text{ de Viabilidad celular}$$

Los resultados obtenidos se compararon con la enzima GOx comercial proveniente de *A. niger*.

#### 5.10 Disposición de los residuos generados

Se dispusieron los residuos generados de acuerdo con lo establecido por el Departamento de Manejo y Control de Residuos de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL.

Primero se identificaron y clasificaron los tipos de residuos, tanto los químicos como los biológicos, para su posterior disposición en los diferentes colectores que se encuentran en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica de la División de Estudios de Posgrado, FCQ.

## **CAPÍTULO VI**

### **6. RESULTADOS**

#### 6.1 Diseño y optimización del gen mutado de la glucosa oxidasa madura

Se buscó el gen *gox* con la clave KJ774107.1 en la base de datos de GenBank, cuya secuencia es de 1818 pb y se muestra en la figura 4<sup>33</sup>.

```

0001 ATGCAGACTC TCCTTGTGAG CTCGCTTGTG GTCTCCCTCG CTGCGGCCCT
0051 GCCACACTAC ATCAGGAGCA ATGGCATTGA AGCCAGCCTC CTGACTGATC
0101 CCAAGGATGT CTCCGGCCGC ACAGTCGACT ACATCATCGC TGGTGGAGGT
0151 CTGACTGGAC TCACCACCGC TGCCCGTCTG ACGGAGAATC CCAACATCAG
0201 CGTGCTCGTC ATCGAAAAGTG GCTCCTACGA GTCGGATAGA GGTCTATCA
0251 TTGAGGACCT GAACGCCTAC GGCACATCT TTGGCAGCAG TGTAGACCAC
0301 GCCTACGAGA CCGTGGAGCT CGCTACCAAC AATCAAACCG CGCTGATCCG
0351 CTCCGGAAAT GGTCTCGGTG GCTCTACTCT AGTGAATGGT GGCACCTGGA
0401 CTCGCCCCCA CAAGGCACAG GTTACTCTT GGGAGACTGT CTTTGGAAAT
0451 GAGGGCTGGA ACTGGGACAA TGTGGCCGCC TACTCCCTCC AGGCTGAGCG
0501 TGCTCGCGCA CCAAATGCCA AACAGATCGC TGCTGGCCAT TACTTCAACG
0551 CATCCTGTCA TGGTACCAAT GGTACTGTCC ATGCCGGACC CCGTGACACC
0601 GGCATGACT ATTCCCCCAT CGTCAAGGCT CTCATGAGCG CTGTGGAAGA
0651 CCGAGGCGTT CCCACCAAGA AGGACTTCGG ATGCGGTGAC CCTCATGGTG
0701 TGTCCATGTT CCCCAACACC TTGCACGAAG ACCAAGTTCG CTCCGATGCC
0751 GCTCGCGAAT GGCTCCTTCC CAACTACCAA CGTCCCAACC TGCAAGTCCT
0801 GACCGGACAA TATGTTGTA AGGTGCTCCT TAGCCAGAAC GGCACCACCC
0851 CTCGTGCCGT CGGCGTGAA TTCGGCACCC ACAAGGGCAA CACCCACAAC
0901 GTTTACGCTG AGCACGAGGT CCTCCTGGCC GCGGGCTCCG CTGTCTCTCC
0951 CACAATCCTG GAATATTCCG STATCGGAAT GAAGTCCATC CTGGAGCCCC
1001 TTGGTATCGA CACCGTCGTT GACCTGCCCG TCGGCCTGAA CCTGCAGGAC
1051 CAGACCACCG CTACCGTCCG CAGCCGCATC ACCTCTGCTG GTGCCGGACA
1101 GGGTCAGGCC GCTTGGTTCG CCACCTTCAA CGAGACCTTT GGTGACTATT
1151 CCGAAAAGGC ACACGAGCTG CTCAACACCA AGCTGGAGCA GTGGGCCGAA
1201 GAGGCCGTCG CCCGTGGCGG ATTCCACAAC ACTACCGCCT TGCTCATCCA
1251 GTACGAGAAC TACCGCGACT GGATTGTCAA CCACAACGTC GCGTACTCGG
1301 AACTCTTCCT CGACACTGCC GGAGTAGCCA GCTTCGATGT GTGGGACCTT
1351 CTGCCCTTCA CCCGAGGATA CGTTCACATC CTCGACAAGG ACCCCTACCT
1401 TCACCACTTC GCCTACGACC CTCAGTACTT CCTCAACGAG CTGGACCTGC
1451 TCGGTCAGGC TGCCGCTACT CAACTGGCCC GCAACATCTC CAACTCCGGT
1501 GCCATGCAGA CCTACTTCGC TGGGGAGACT ATCCCCGGTG ATAACCTCGC
1551 GTATGATGCC GATTTGAGCG CCTGGACTGA GTACATCCCG TACCACTTCC
1601 GTCCTAACTA CCATGGCGTG GGTACTTGCT CCATGATGCC GAAGGAGATG
1651 GCGGGTGTG TTGATAATGC TGCCCGTGTG TATGGTGTGC AGGGACTGCG
1701 TGTCATTGAT GGTTCTATTC CTCCTACGCA AATGTCGTCC CATGTCATGA
1751 CGGTGTCTA TGCCATGGCG CTA AAAAATTT CGGATGCTAT CTTGGAAGAT
1801 TATGCTTCCA TGCAGTGA

```

**Figura 4.** Secuencia de 1818 pb del gen *gox* de *A. niger*.

Posteriormente se le realizaron las respectivas modificaciones y la optimización del gen, obteniendo como resultado una secuencia de un tamaño de 2021 pb, de los cuales 2007 pb corresponden al gen *goxM*, y los demás son de los sitios de restricción que se encuentran en los extremos como se señala en la figura 5.



```

0001 GGATCCATGA GATTCCCCTC CATCTTCACC GCTGTTTTGT TCGCTGCTTC
0051 TTCTGCTTTG GCTGCTCCAG TTAACACTAC TACTGAGGAC GAGACTGCTC
0101 AGATTCCAGC TGAAGCTGTT ATTGGTTACT CCGACTTGGG AGGTGACTTC
0151 GACGTTGCTG TTTTGCCATT CTCCAACCTC ACCAACAACG GTCTGTTGTT
0201 CATCAACACC ACTATCGCTT CCATTGCCGC TAAAGAAGAA GGCCTTTCTT
0251 TGGAGAAGAG ATCCAACGGT ATTGAGGCTT CCTTGCTGAC TGATCCAAAG
0301 GACGTTTCCG GTAGAACCGT CGACTACATT ATTGCTGGTG GTGGTTTGAC
0351 CGGTTTGACT GTTGCTGCTA GATTGACTGA GAACCCCAAC ATCTCCGTTT
0401 TGGTTATTGA GTCCGGTTCC TACGAATCCG ACAGAGGTCC AATTATCGAG
0451 GACTTGAACG CTTACGGTGA CATCTTCGGT TCTTCCGTTG ATCACGCTTA
0501 CGAGACTGTT GAGCTGGCTA CAAACAACCA GACTGCCTTG ATTAGATCCG
0551 GTAACGGTCT TGGTGGTTCC ACCTTGGTTA ATGGTGGTTC TTGGACTAGA
0601 CCACACAAGG CTCAAGTTGA CTCTTGGGAG ACTGTTTTTCG GTAACGAAGG
0651 TTGGAACTGG GACAACGTTG CTGCTTACTC CTTGCAAGCT GAAAGAGCTA
0701 GAGCACCAA CGCTAAGCAA ATTGCTGCTG GTCACTACTT CAACGCCTCT
0751 TGTCATGGAA CTAACGGTAC TGTTTCATGCC GGTCCAAGAG ATACTGGTGA
0801 TGACTACTCT CCAATCGTCA AGGCTTTGAT GTCTGCCGTT GAGGATAGAG
0851 GTGTCCCTAC CAAGAAAGAC TTCGGTTGTG GTGATCCACA CGGTGTCTCT
0901 ATGTTTCCAA ACACCTTGCA CGAGGACCAG GTTAGATCAG ACGCTGCTAG
0951 AGAATGGTTG CTGCCAAACT ACCAAAGACC AACTTTGCAG GTCCTGACTG
1001 GTCAGTACGT TGGTAAGGTT TTGCTGTCCC AGAACGGTAC TACTCCAAGA
1051 GCTGTTGGTG TTGAGTTCGG TACTCACAAG GGTAACACCC ACAACGTTTA
1101 CGCTGAACAC GAGGTTTTGT TGGCAGCTGG TTCTGCTGTT TCCCCAACCA
1151 TTTTGAATA CTCCGGTATC GGTATGAA GTTCCATCTTGA GCCATTGGGT
1201 ATCGACACTG TTGTTGACTT GCCAGTCGGT TTGAACCTGC AAGACCAGAC
1251 TACTGCTACC GTCAGATCCA GAATTACTTC TGCTGGTGCT GGTCAAGGTC
1301 AGGCTGCTTG GTTTGCTACT TTCAACGAAA CCTTCGGTGA CTACTCCGAA
1351 AAGGCTCACG AGTTGTTGAA CACCAAGTTG GAACAATGGG CTGAAGAGGC
1401 TGTGCTAGA GGTGGTTTTT ACAACACTAC CGCCTTGTTG ATCCAGTACG
1451 AGAACTACAG AGACTGGATC GTCAACCAACA ACGTCGCTTA CTCTGAGTTG
1501 TTCTTGATA CTGCTGGTGT TGCTTCTTTC GACGTCTGGG ATTTGTTGCC
1551 ATTCACCAGA GGTTACGTCC ACATCTTGA TAAGGACCCA TACTTGACC
1601 ACTTCGCCTA CGATCCTCAG TACTTCTTGA ACGAGTTGGA CTTGTTGGGT
1651 CAAGCTGCTG CTAATCAGTT GGCTAGAAAC ATCTCTAACT CCGGTGCTAT
1701 GCAGACTTAC TTCGCCGGTG AACTATATCC AGGTGACAAC TTGGCTTACG
1751 ACGCTGATTT GTCTGCTTGG ACTGAGTACA TCCCATAACA CTTGAGACTT
1801 AACTACCACG GTGTTGGTAC TTGCTCCATG ATGCCAAAAG AAATGGGTGG
1851 TGTCGTTGAC AACGCTGCCA GAGTTTACGG TGTTGAGGTTT TTGAGAGTTA
1901 TCGACGGATC TATCCCACCA ACTCAGATGT CCTCTCACGT CATGACTGTG
1951 TTCTACGCTA TGGCCTTGAA GATCTCCGAC GCTATTTTGG AGGACTACGC
2001 CTCCATGCAG TAAGCGGCCG C

```

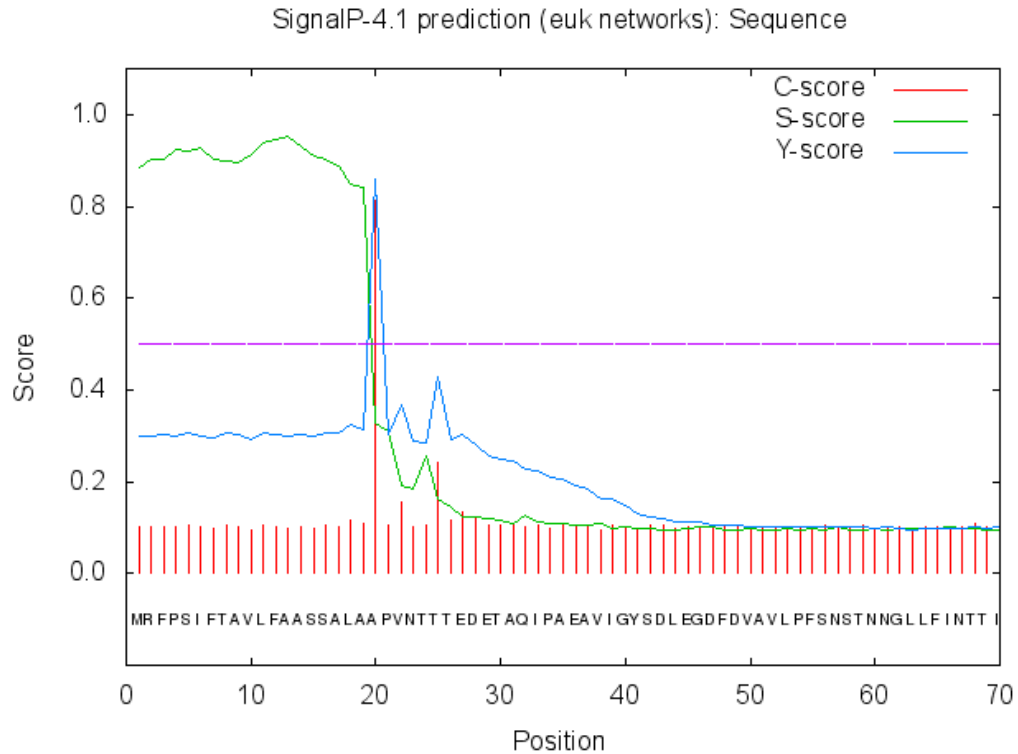
**Figura 5.** Secuencia de 2021 pb que codifica GOxr. En cursiva se encuentran los sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Not*I, en negrita la secuencia del  $\alpha$ -Factor y las mayúsculas restantes corresponden a la secuencia que codifica a la GOxr madura.

El servidor ORFfinder mostró el marco de lectura abierto que codifica para una secuencia de 668 aminoácidos, mostrada en la figura 6.

```
001 MRFPSIFTAV LFAASSALAA PVNTTTEDET AQIPAEAVIG YSDLEGDFDV
051 AVLPFSNSTN NGLLFINTTI ASIAAKEEGV SLEKRSNGIE ASLLTDPKDV
101 SGRTVDYIIA GGGLTGLTVA ARLTENPNIS VLVIESGSYE SDRGPIIEDL
151 NAYGDIFGSS VDHAETVEL ATNNQTALIR SGNGLGGSTL VNGGSWTRPH
201 KAQVDSWETV FNEGWNWDN VAAYSLQAER ARAPNAKQIA AGHYFNASCH
251 GTNGTVHAGP RDTGDDYSPI VKALMSAVED RGVPTKKDFG CGDPHGVSME
301 PNTLHEDQVR SDAAREWLLP NYQRPNLQVL TGQYVGKVLL SQNGTTPRAV
351 GVEFGTHKGN THNVYAEHEV LLAAGSAVSP TILEYSGIGM KSILEPLGID
401 TVVDLPVGLN LQDQTTATVR SRITSAGAGQ GOAAWFATFN ETFGDYSEKA
451 HELLNTEKLEQ WAEAEVARGG FHNTTALLIQ YENYRDWIVN HNVAYSELFL
501 DTAGVASFDV WDLLPFTRGY VHILDKDPYL HFFAYDPQYF LNELDLLGQA
551 AATQLARNIS NSGAMQTYFA GETIPGDNLA YDADLSAWE YIPYHFRPNY
601 HGVGTCMMMP KEMGGVVDNA ARVYGVQGLR VIDGSIPPTQ MSSHVMTVFY
651 AMALKISDAI LEDYASMQ
```

**Figura 6.** Secuencia de 668 aminoácidos de GOxr. En negrita se encuentra la secuencia del  $\alpha$ -Factor y las mayúsculas restantes corresponden a la secuencia de la GOxr madura.

Se realizó un análisis virtual del procesamiento de la secuencia de aminoácidos con el programa SignalP 4.1 Server, el cual arroja una gráfica donde se observa que se realiza el corte de la primera parte del péptido señal (región pre del  $\alpha$ -Factor) entre los aminoácidos Ala19 y Ala20 por una proteasa en el retículo endoplásmico.



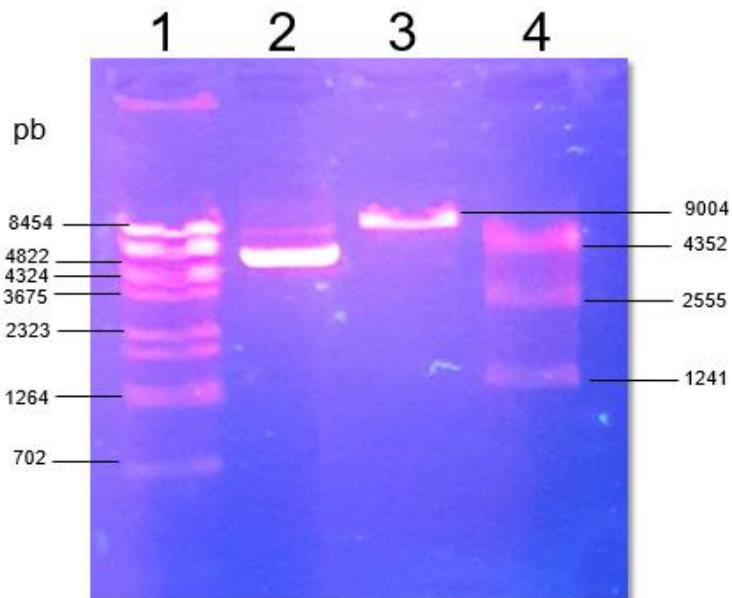
**Figura 7.** Predicción del procesamiento del péptido señal de la secuencia de aminoácidos de GOxr.

## 6.2 Construcción y propagación del vector pPIC3.5K-goxM

### 6.2.1 Clonación, propagación y extracción de los plásmidos pPIC3.5K y pUC57-goxM

Se logró la transformación de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  rubidio competentes con los plásmidos pPIC3.5K y pUC57-goxM, así como su extracción por lisis alcalina, de los cuales se obtuvo DNA plasmídico que se encontraba dentro de los parámetros de calidad obtenidos por espectrofotometría, al obtener valores que se encontraban dentro de 1.8 – 2.0 de la relación de absorbancias A260/280 y dentro de 1.5 – 2.2 de A260/230.

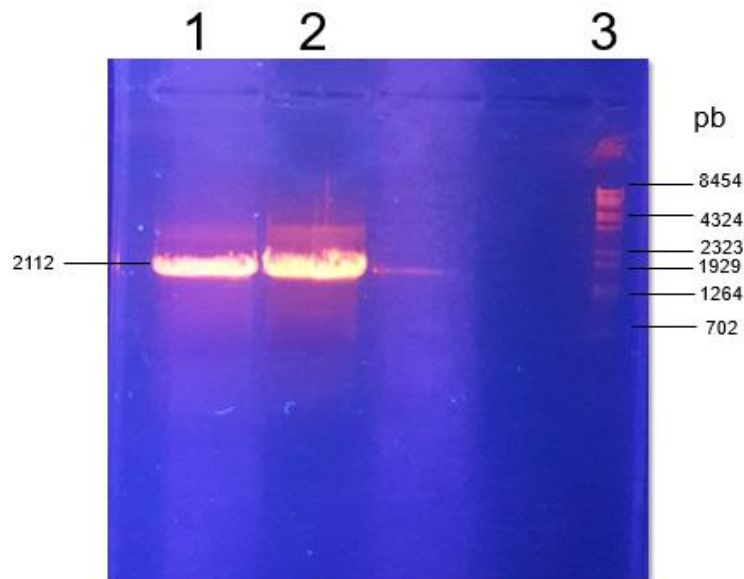
En la figura 8 se presenta un gel de agarosa al 1 % donde se observan los fragmentos que resultaron de las digestiones del vector de expresión pPIC3.5K con las enzimas *EcoRI* y *PstI*. La digestión con *EcoRI* dio una banda que se encuentra por encima de la banda de 8454 pb del marcador de peso molecular del DNA del fago  $\lambda$  digerido con *BstEII*, de acuerdo con el corte virtual corresponde a la banda de 9004 pb lo que indica que el vector se encuentra linearizado. En la digestión con *PstI* se observan tres fragmentos que se encuentran próximos a las bandas 5686 pb, 2323 pb y 1264 pb del marcador de peso molecular los cuales corresponden a los fragmentos 5208 pb, 2555 y 1241 pb.



**Figura 8.** Caracterización enzimática del vector pPIC3.5K. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Carril 1: Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/*BstEII*. Carril 2: pPIC3.5K sin digerir. Carril 3: Digestión con *EcoRI*. Carril 4: Digestión con *PstI*.

### 6.2.2 Amplificación del gen *goxM*

En la figura 9 se encuentra un gel de agarosa al 1 % donde se observa por debajo de la línea del marcador de peso molecular de 2323 pb una banda, la cual corresponde al amplicón de 2112 pb del SMC del plásmido pUC57-*goxM* donde se encuentra la secuencia del gen *goxM*.

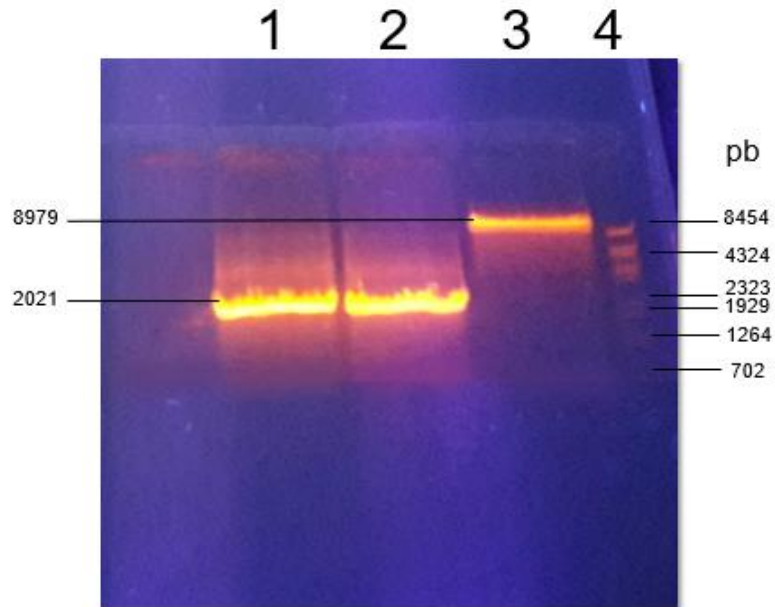


**Figura 9.** Amplificación del gen *goxM*. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Carril 1 y 2: Amplicón del SMC del plásmido pUC57-*goxM* Carril. 3: Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/*BstEII*.

### 6.2.3 Doble digestión enzimática del amplicón del gen *goxM* y del vector de expresión pPIC3.5K

La doble digestión enzimática del amplicón del SMC de pUC57-*goxM* generó tres fragmentos uno de 2021 pb, que corresponde al gen *goxM* con los sitios de restricción de las enzimas *Bam*HI y *Not*I, y los otros de 56 pb y 35 pb, estos últimos no se alcanzan a observar en el gel de agarosa al 1 % que se

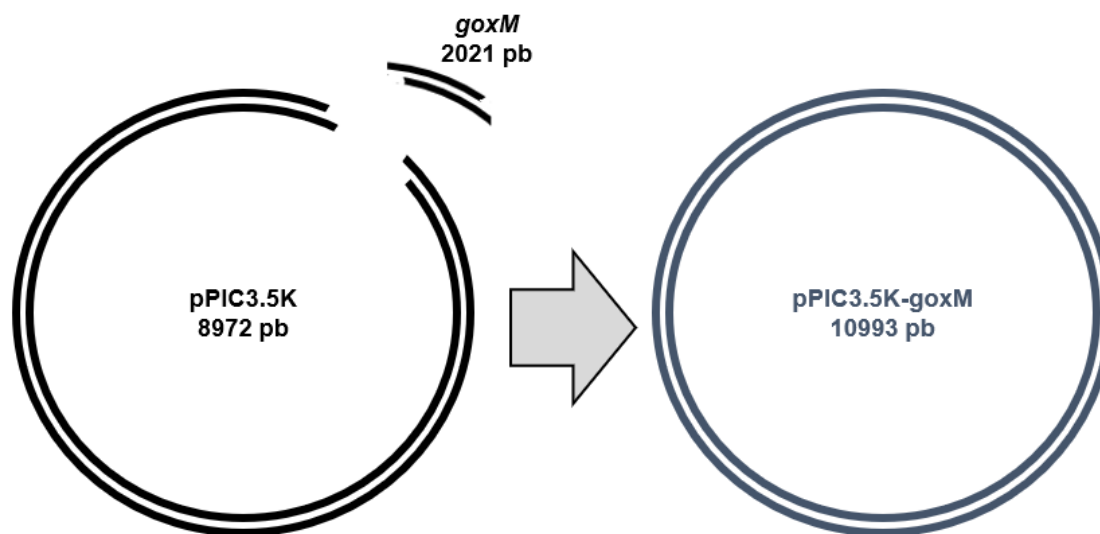
encuentra en la figura 10. En ese mismo gel se encuentra la banda de 8979 pb del vector pPIC3.5K digerido con las dos enzimas mencionadas, el otro fragmento de 25 pb que se liberó de esta digestión no se observa en el gel.



**Figura 10.** Doble digestión enzimática del amplicón del SMC de pUC57-goxM y pPIC3.5K. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Carril 1 y 2: SMC de pUC57-goxM digerido con las enzimas *Bam*HI y *Not*I. Carril 3: pPIC3.5K digerido con las enzimas *Bam*HI y *Not*I. Carril 4: Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/*Bst*EII.

#### 6.2.4 Reacción de ligación del vector pPIC3.5K con el inserto *goxM*

En la figura 11 se observa una representación esquemática de la reacción de ligación del vector pPIC3.5K con el inserto *goxM* manteniendo la relación molar 1:3.



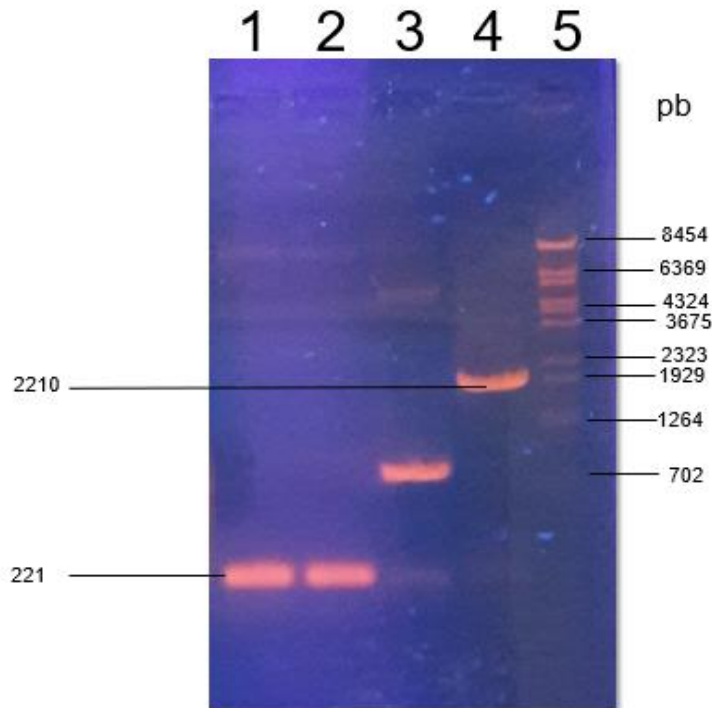
**Figura 11.** Representación esquemática de la construcción del vector pPIC3.5K-goxM.

#### 6.2.5 Transformación de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ con el vector construido pPIC3.5K-goxM y su caracterización

De ambas transformaciones se obtuvieron colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$ , de la reacción de ligación del vector pPIC3.5K con el inserto *goxM* y el vector pPIC3.5K solo, lo que nos indica la funcionalidad de la enzima.

Para la caracterización de las clonas transformadas con la reacción de ligación del vector pPIC3.5K con el inserto *goxM* se le realizó una PCR a cuatro colonias. En la figura 12 se encuentra un gel de agarosa al 1 % donde se observan las amplificaciones del DNA plasmídico obtenido de las clonas, en los carriles 1 y 2 se ve una banda que se encuentra por debajo de la línea del marcador de peso molecular de 702 pb, lo que nos podría indicar que se trata de la banda de 221 pb del plásmido pPIC3.5K, ya que los primers 5'AOX1 Forward y 3'AOX1 Reverse también amplifican una parte del promotor AOX1, el SMC y

una parte del 3'AOX1 TT de este plásmido; en el carril 3 se observa una banda inespecífica; y en el carril 4 se encuentra una banda por debajo de la línea del marcador de peso molecular de 2323 pb, la cual corresponde al amplicón de 2210 pb del SMC del plásmido pPIC3.5K-goxM.

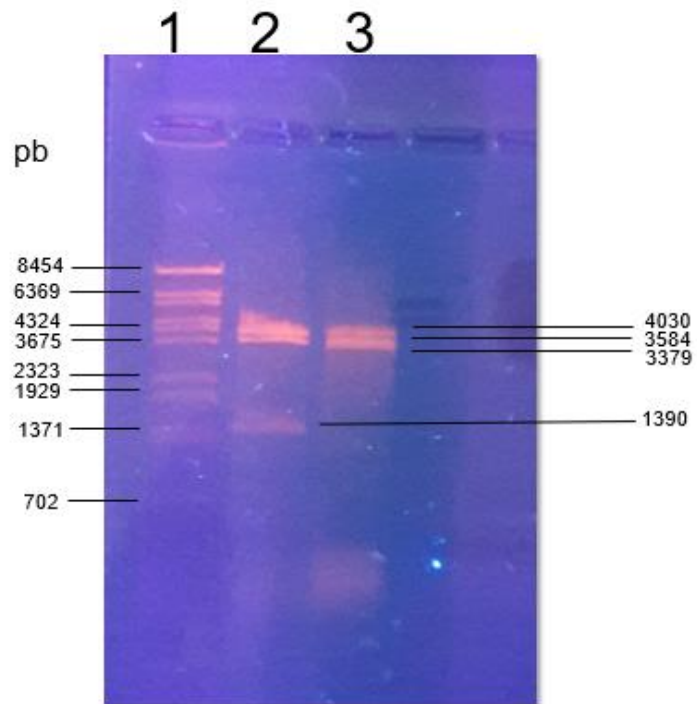


**Figura 12.** Análisis por PCR de las clonas de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con pPIC3.5K-goxM. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Carril 1 y 2: Amplicón del SMC del vector pPIC3.5K. Carril 3: Amplicón inespecífico. Carril 4: Amplicón del SMC del plásmido pPIC3.5K-goxM. Carril 5: Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/*Bst*EII.

Al DNA de la clona de *E. coli* DH5 $\alpha$  que presentó la banda esperada de 2210 pb de la reacción de PCR se le realizó una digestión enzimática para corroborar que sea el plásmido pPIC3.5K-goxM. En la figura 13 se presenta un gel de agarosa al 1 % donde se observan los fragmentos que resultaron de la

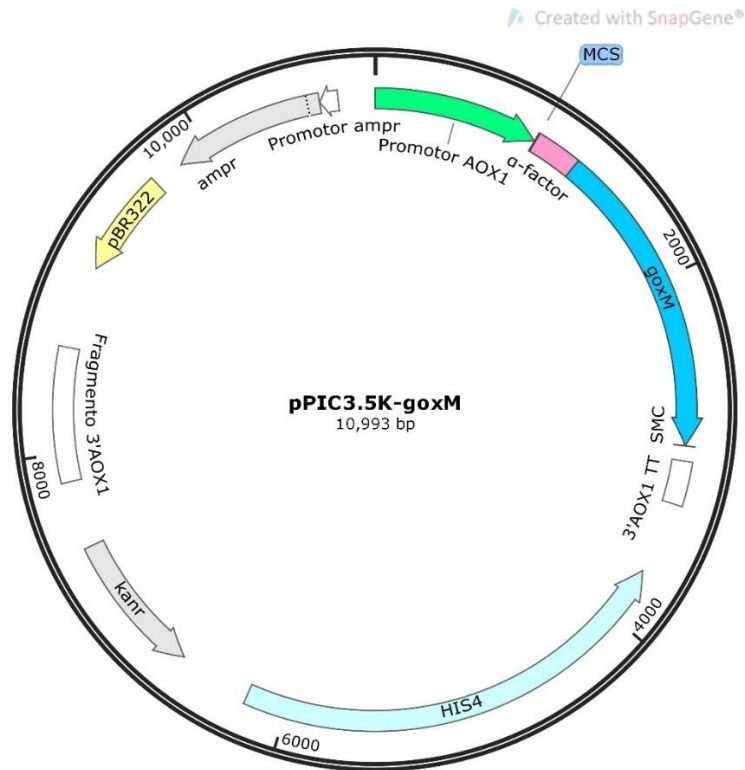


digestión del plásmido construido con la enzima *ClaI*, en el carril 2 se observan tres fragmentos que se encuentran próximos a las bandas 4324 pb, 3675 pb y 1371 pb del marcador de peso molecular los cuales corresponden a los fragmentos 4030 pb, 3584 pb y 1390 pb del vector pPIC3.5K, y en el carril 3 se encuentran tres bandas próximas entre sí, las cuales corresponden a las bandas 4030 pb, 3584 pb y 3379 pb que coinciden con el corte virtual del plásmido construido pPIC3.5K-goxM.



**Figura 13.** Caracterización enzimática del plásmido pPIC3.5K-goxM. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Carril 1: Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/*BstEII*. Carril 2: pPIC3.5K digerido con *ClaI*. Carril 3: pPIC3.5K-goxM digerido con *ClaI*.

En la figura 14 se encuentra la composición del plásmido construido.



**Figura 14.** Plásmido pPIC3.5K-goxM con los siguientes componentes: promotor AOX1, sitio múltiple de clonación (SMC) donde se encuentra el  $\alpha$ -Factor y el gen *goxM*, terminador de la transcripción (3'AOX1 TT), gen *HIS4* (*HIS4*), gen de resistencia a kanamicina (*kanr*), fragmento 3'AOX1, origen de replicación en *E. coli* (pBR322) y gen de resistencia a ampicilina (*amp<sup>r</sup>*).

### 6.3 Clonación del plásmido pPIC3.5K-goxM en *Pichia pastoris* SMD1168

#### 6.3.1 Linearización del plásmido pPIC3.5K-goxM con *SacI*

Se realizó la linearización del plásmido pPIC3.5K-goxM con la enzima de restricción *SacI* para permitir la recombinación homóloga del plásmido con el genoma de *P. pastoris* en el locus AOX1.

### 6.3.2 Transformación por electroporación de *Pichia pastoris* SMD1168 con el plásmido pPIC3.5K-goxM

La transformación de *P. pastoris* SMD1168 electro-competente con el plásmido linearizado pPIC3.5K-goxM dio como resultado el crecimiento de 54 colonias His<sup>+</sup> en el medio MD agar. Hubo crecimiento en la caja de *P. pastoris* transformada con el vector linearizado pPIC3.5K y no en el control negativo de *P. pastoris* sin transformar.

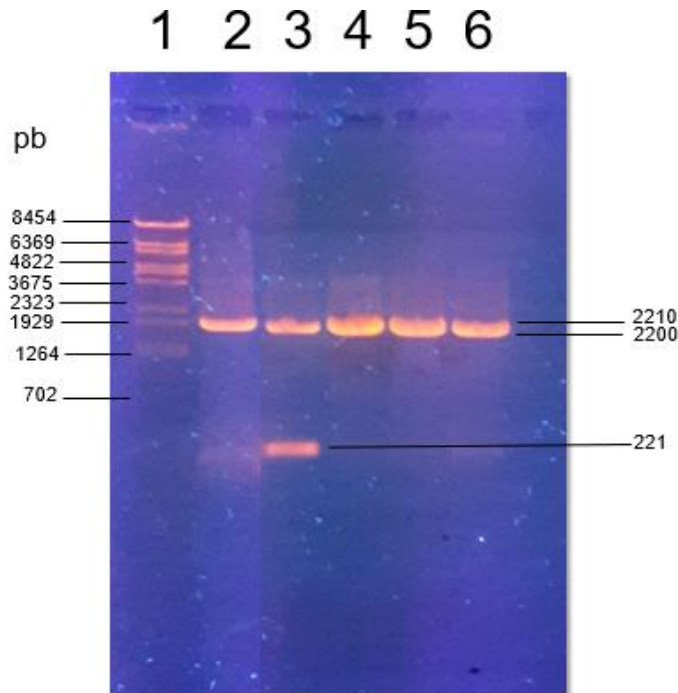
**Tabla 16.** Resultados de la electroporación de *P. pastoris* SMD1168 electro-competente.

<b>Prueba</b>	<b>Muestra</b>	<b>Medio con agar</b>	<b>No. de colonias</b>
Viabilidad de las células electroporadas	<i>P. pastoris</i> transformada con pPIC3.5K-goxM	YPD	Incontable
Electroporación	<i>P. pastoris</i> transformada con pPIC3.5K-goxM	MD	54
Electroporación	<i>P. pastoris</i> transformada con pPIC3.5K	MD	Incontable
Control negativo	<i>P. pastoris</i> sin transformar	MD	0

### 6.3.3 Caracterización de la integración del plásmido pPIC3.5K-goxM al genoma de *Pichia pastoris* SMD1168

Las colonias de *P. pastoris* transformadas con el plásmido pPIC3.5K-goxM y con el vector pPIC3.5K-goxM provenientes del medio MD agar fueron capaces de crecer en las cajas con el medio YPD/G418 a una concentración de 200 µg/mL.

Para la caracterización de esas colonias de *P. pastoris* obtenidas de la transformación se realizó una PCR para identificar la integración del plásmido pPIC3.5K-goxM, que contiene el gen de interés, en el genoma de la levadura. En el gel de agarosa al 1 % de la figura 14 se observan en los carriles correspondientes al DNA proveniente de *P. pastoris* transformada con el plásmido pPIC3.5K-goxM una banda gruesa que se encuentra entre las bandas 2323 pb y 1929 pb del marcador de peso molecular, debido a que se encuentran solapadas o muy próximas dos bandas, de las cuales una de ellas es de 2210 pb correspondiente al amplicón del SMC del plásmido pPIC3.5K-goxM integrado al genoma de la levadura por recombinación homóloga y la otra corresponde al amplicón de 2200 pb del gen AOX1 de *P. pastoris* SMD1168, lo que nos indica que esta cepa es Mut<sup>+</sup>, que se amplifica con los primers 5'AOX1 Forward la cual se aparea en una región del promotor de este gen y 3'AOX1 Reverse que se aparea a una región del terminador de la transcripción de dicho gen, y esta banda es observada en el carril que corresponde a la transformación de la levadura con el vector pPIC3.5K junto con otra banda de 221 pb que corresponde al amplicón el SMC de este vector.



**Figura 15.** Análisis de la integración de pPIC3.5K-goxM al genoma de *P. pastoris* SMD1168. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Carril 1: Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/*Bst*EII. Carril 2: Control positivo del amplicón del SMC del plásmido pPIC3.5K-goxM. Carril 3: *P. pastoris* transformada con pPIC3.5K. Carril 4-6: *P. pastoris* transformada con pPIC3.5K-goxM.

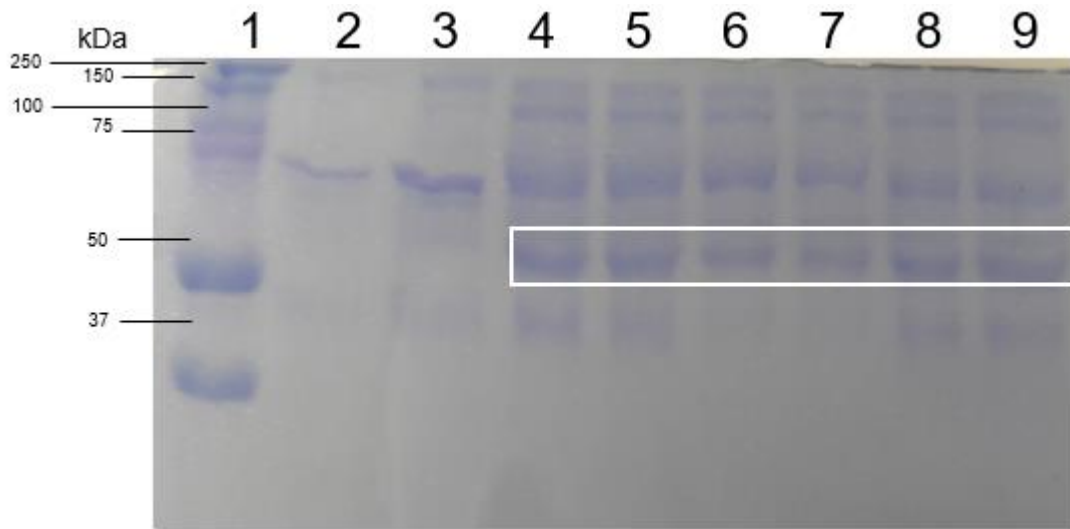
#### 6.4 Expresión y purificación de la enzima glucosa oxidasa recombinante proveniente de *Pichia pastoris* SMD1168

##### 6.4.1 Expresión piloto de la enzima glucosa oxidasa recombinante y caracterización por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se realizó una electroforesis de proteínas SDS-PAGE para analizar el medio de cultivo inductor concentrado libre de levaduras de las dos clonas de *P.*

*pastoris* SMD1168 portadoras del gen *goxM* y de la clona solo transformada con el vector pPIC3.5K. Se analizaron las muestras a las 48 h, 72 h y 96 h.

En el gel de poliacrilamida al 11 % de la figura 15 se observa en los carriles correspondientes al medio de cultivo de *P. pastoris* portadora del gen *goxM* una banda gruesa que se encuentra entre las bandas de 75 kDa y 50 kDa del marcador de peso molecular para proteínas, esta banda no se encuentra entre las bandas de los carriles que corresponden al medio de cultivo utilizado como control negativo de *P. pastoris* transformada con el vector pPIC3.5K.



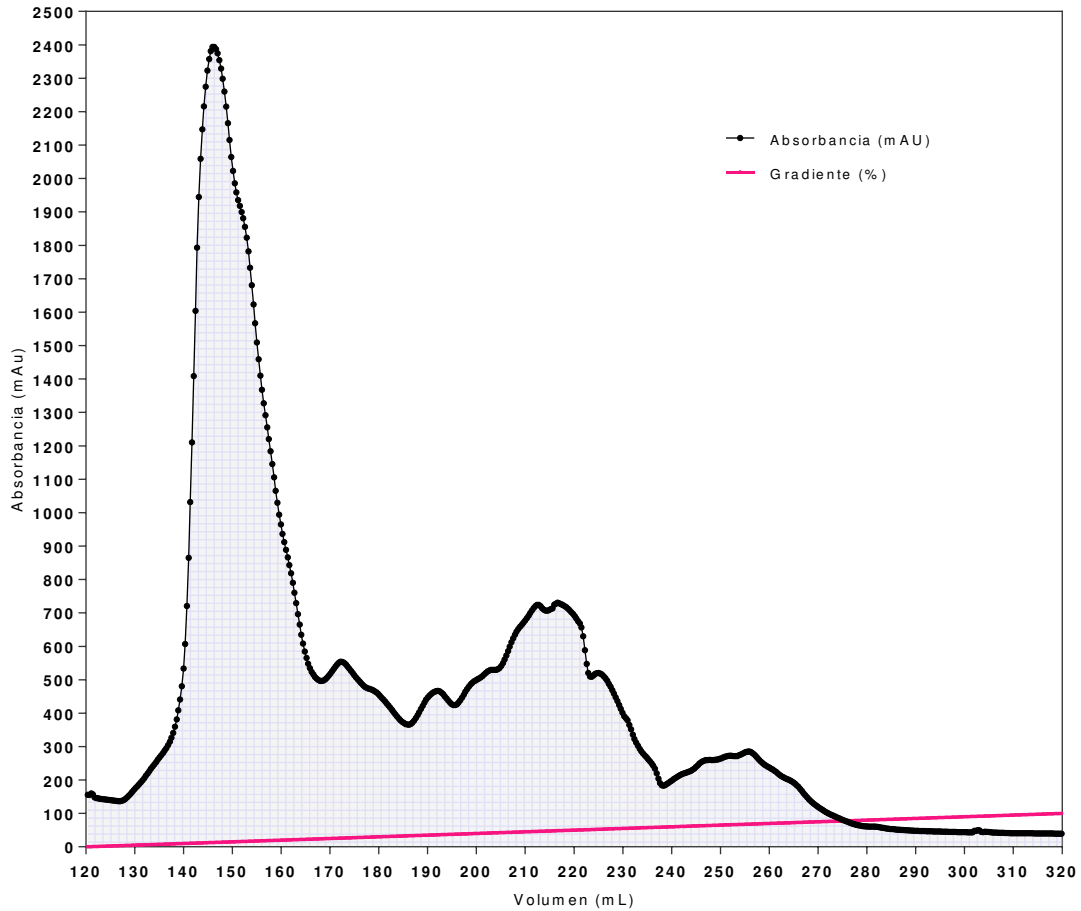
**Figura 16.** Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 11 % de la expresión de GOxr. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2 y 3: Cultivo de 72 h y 96 h de expresión de *P. pastoris* transformada con pPIC3.5K. Carril 4 – 6: Cultivo de 48 h, 72 h y 96 h de la clona 1 de *P. pastoris* portadora del gen *goxM*. Carril 7 – 9: Cultivo de 48 h, 72 h y 96 h de la clona 2 de *P. pastoris* portadora del gen *goxM*.

#### 6.4.2 Escalamiento de la expresión de la enzima glucosa oxidasa recombinante

El sobrenadante libre de levadura se concentró de 500 mL a 100 mL, se dializó y centrifugó esta muestra para posteriormente purificar la GOxr.

#### 6.4.3 Purificación de la enzima glucosa oxidasa recombinante

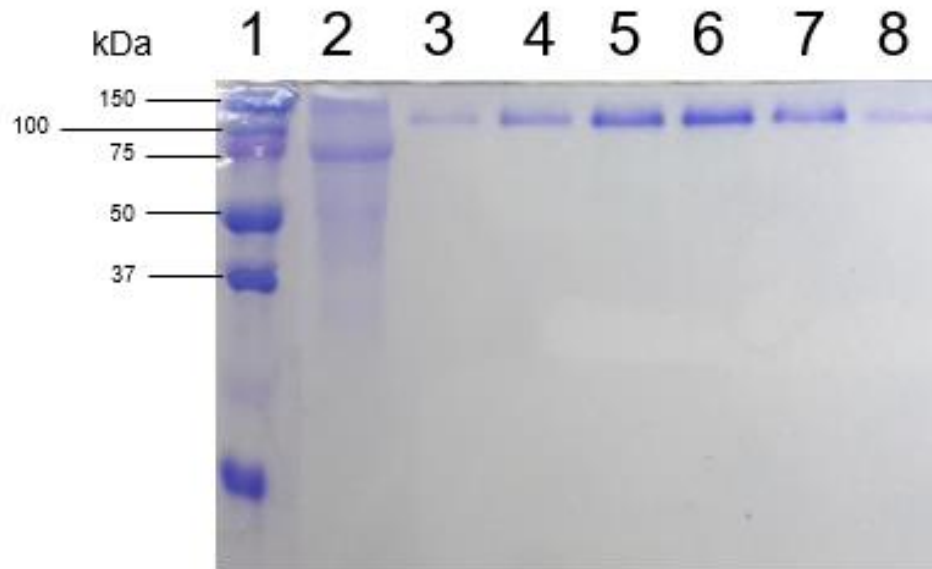
A partir de la purificación de la muestra concentrada de 100 mL por FPLC se obtuvieron fracciones de 1 mL, se recolectaron y se analizaron por SDS-PAGE aquellas que presentaron un incremento en la absorbancia mayor a 500 mAU, para observar la presencia de GOxr y su pureza. Se obtuvo la mayor absorbancia al 13 % en el gradiente.



**Figura 17.** Cromatograma de purificación de GOxr.

En los geles de poliacrilamida al 11 % solo se observó una banda en las fracciones de la 20 a la 25 de la purificación, como se percibe en la figura 17, las cuales se encontraron dentro del rango de mayor absorbancia. Se procedió a analizar la actividad enzimática de la GOx de esas fracciones, para saber si presentan dicha actividad y confirmar que se trate de la enzima de interés, ya que las bandas no concuerdan con el tamaño que se había obtenido anteriormente de la proteína que se encontraba entre las bandas de 75 kDa y 50 kDa del marcador de peso molecular.

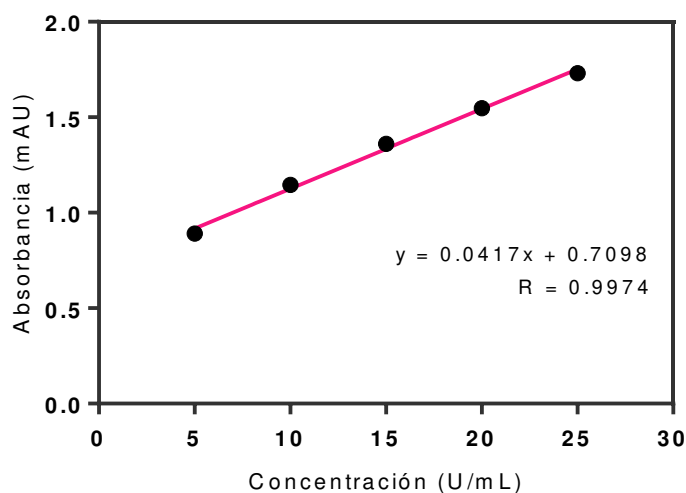




**Figura 18.** Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 11 % de las fracciones obtenidas de la purificación en el FPLC. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Fracción no unida. Carril 3 – 8: Fracciones 20 – 25.

### 6.5 Evaluación de la actividad enzimática de la glucosa oxidasa recombinante

Se realizó la curva de calibración de GOx para obtener la ecuación de la recta y poder cuantificar la actividad enzimática de GOx de las muestras, se muestra en la figura 18. Se tomaron solo las absorbancias que se analizaron al minuto 1.



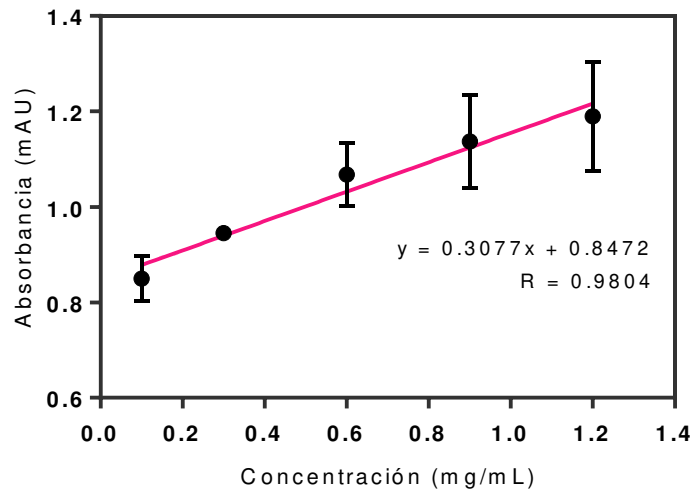
**Figura 19.** Curva de calibración de la actividad enzimática de GOx.

Se tomaron 50  $\mu$ L de medio de cultivo BMMY de la expresión de *P. pastoris* portadora del gen *goxM* y se diluyeron con 50  $\mu$ L de agua ultra pura, se obtuvo una actividad enzimática de 59.28 U/mL. También se analizó el medio de cultivo de *P. pastoris* sin transformar, el cual no presentó actividad.

Se juntaron las fracciones de la 20 a la 22 y de la 23 a la 25 de la purificación, llamadas muestra 1 y 2, ya que en el gel de poliacrilamida de la figura 17 se observa una sola banda en los carriles, lo que nos indica que las fracciones están puras; se concentraron con el centrífugo de corte de 50 kDa y se centrifugaron a 5000 rpm por 7 min, se descartó el eluato y las muestras concentradas se transfirieron a un tubo de 1.5 mL. Para evaluar la actividad enzimática se diluyeron las muestras en una relación 1:1. La muestra 1 y 2 presentaron una actividad enzimática de 26.20 U/mL y 27.25 U/mL, respectivamente.

## 6.6 Cuantificación de proteínas

En la figura 19 se encuentra la curva de calibración de la albúmina sérica bovina para obtener la ecuación de la recta y poder cuantificar la cantidad de GOxr que se purificó.



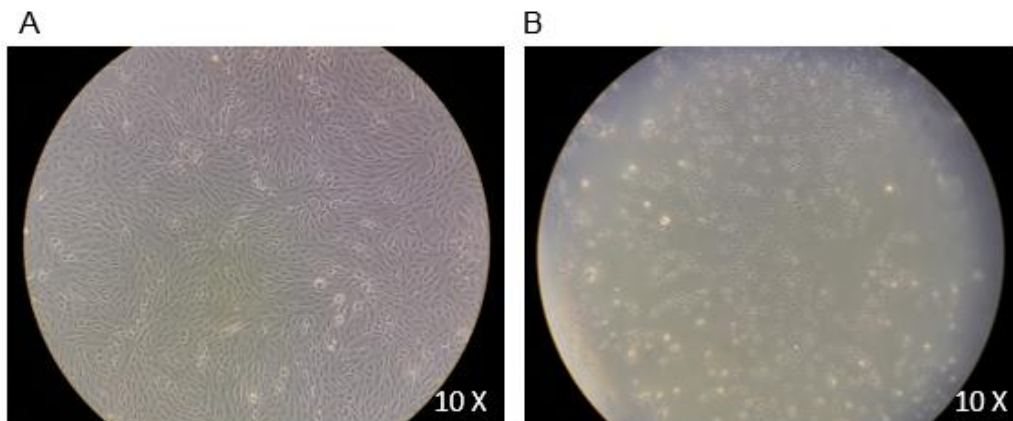
**Figura 20.** Curva de calibración de la concentración de albúmina sérica bovina.

La muestra 1 y 2 obtuvieron una concentración de proteína de 0.54 mg/mL y 0.52 mg/mL. Relacionando estos resultados con los de la actividad enzimática, se obtuvo una actividad específica de 50.92 U/mg de GOxr, juntando las dos muestras.

## 6.7 Evaluación de la actividad citotóxica y anticancerígena *in vitro* del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado a partir de la glucosa oxidasa recombinante

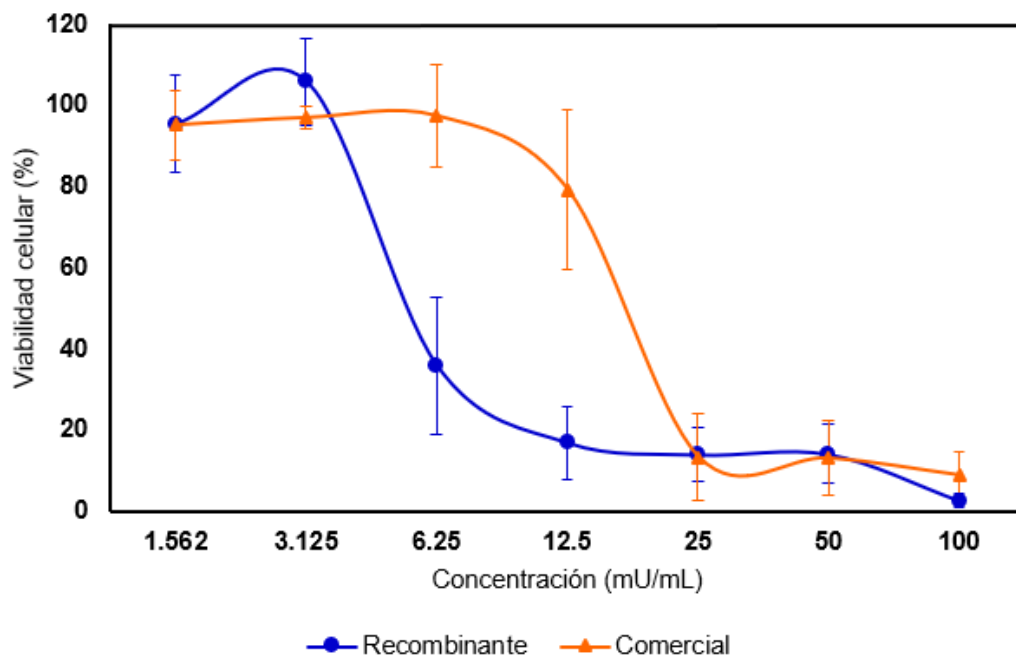
Se evaluó, por separado, la actividad citotóxica de GOxr y GOx comercial proveniente de *A. niger* en la línea celular Vero utilizando WST-1, se realizó a distintas concentraciones de ambas enzimas medidas en mU/mL, para comparar el efecto que provocan en la línea celular mencionada.

Después de la exposición de las células a las enzimas primero se observaron por el microscopio, las cuales presentaron un cambio morfológico en comparación con el control negativo, este cambio se observó a partir de la concentración de 6.25 mU/mL de GOxr y 12.5 mU/mL de GOx comercial, las células se muestran en la figura 21, se observan en menor cantidad y con un tamaño reducido.



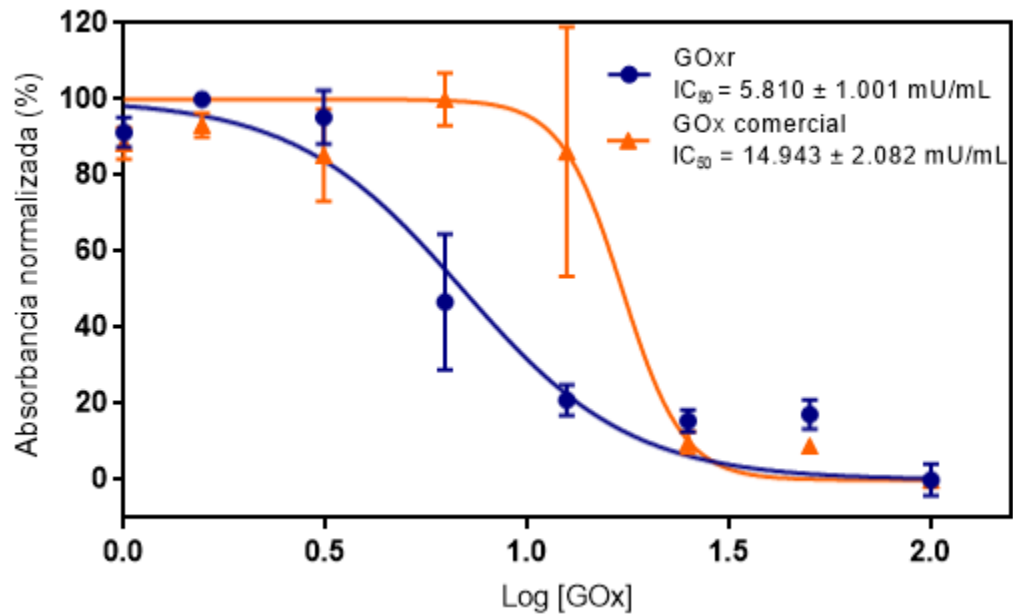
**Figura 21.** Cambio morfológico observado a través del microscopio de la línea celular Vero al ser expuesta a la GOxr, imágenes tomadas a las 24 h. (A) Control negativo. (B) Células de Vero expuestas a la concentración de 6.25 mU/mL de GOxr.

Luego se procedió a realizar el ensayo con el reactivo WST-1. Con los resultados obtenidos de las absorbancias se calculó el porcentaje de viabilidad celular. A partir de la concentración de 6.25 mU/mL de GOxr se observó una disminución de la viabilidad celular de  $35.92 \pm 16.89$  %, y a partir de la concentración de 12.5 mU/mL de GOx comercial se observó una disminución de  $79.21 \pm 19.50$  %, los valores se muestran en la figura 22, estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes.



**Figura 22.** Porcentajes de viabilidad de la línea celular Vero expuesta a la GOx determinados por el ensayo de citotoxicidad con WST-1.

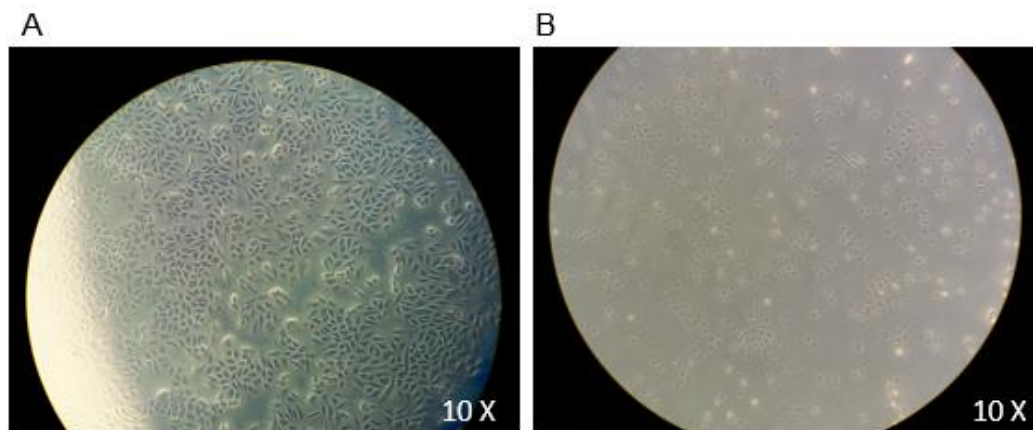
A partir de estos resultados se procedió a determinar el  $IC_{50}$  de ambas enzimas en la línea celular Vero. El  $IC_{50}$  de GOxr fue de  $5.81 \pm 1.00$  mU/mL y de GOx comercial fue de  $14.94 \pm 2.08$  mU/mL, siendo la GOxr más citotóxica a concentraciones bajas que la enzima comercial.



**Figura 23.**  $IC_{50}$  de GOxr y GOx comercial en la línea celular Vero.

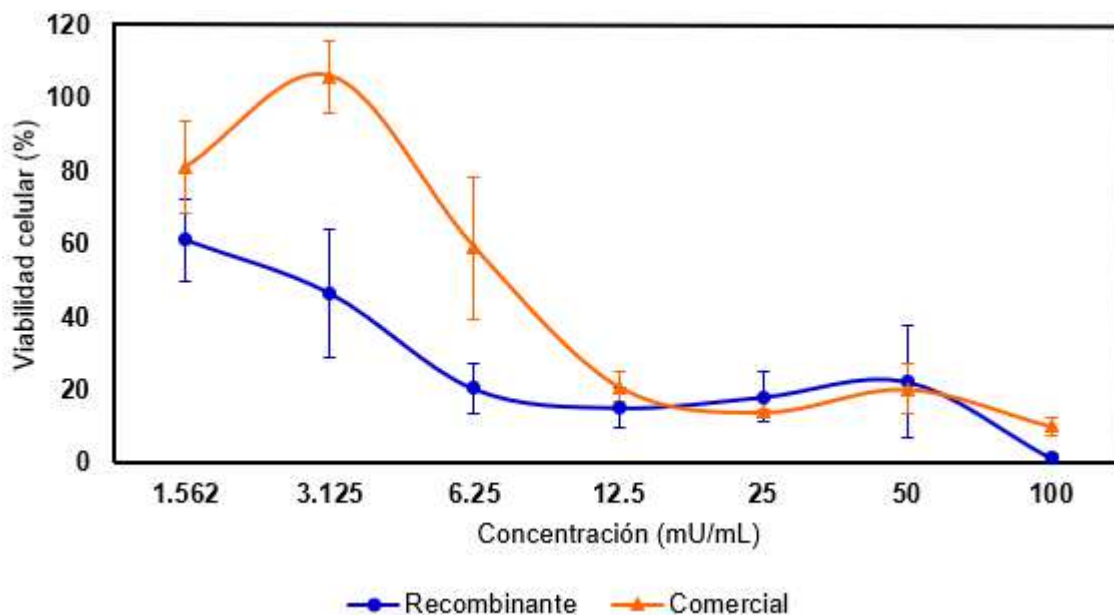
Se utilizó la línea celular SiHa para evaluar la actividad anticancerígena de GOxr y GOx comercial utilizando WST-1, se realizó a las mismas concentraciones empleadas para la actividad citotóxica.

En esta línea celular también se observó un cambio morfológico en comparación con el control negativo después de que las células fueran expuestas a las enzimas, este cambio se observó desde la concentración de 1.562 mU/mL de GOxr y 6.25 mU/mL de GOx comercial, las células se muestran en la figura 24, se observan en una menor cantidad y tamaño reducido.



**Figura 24.** Cambio morfológico observado a través del microscopio de la línea celular SiHa al ser expuesta a la GOx, imágenes tomadas a las 24 h. (A) Control negativo. (B) Células de SiHa expuestas a la concentración de 6.25 mU/mL de GOx.

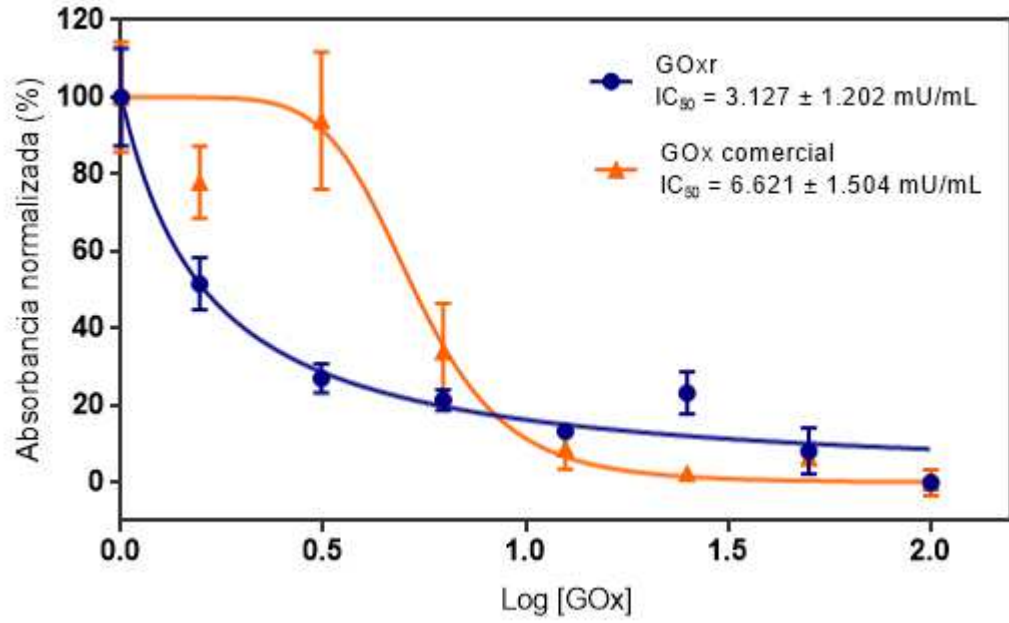
Se realizó el ensayo con el reactivo WST-1 y se determinó el porcentaje de viabilidad celular. A partir de la concentración de 1.562 mU/mL de GOx se observó una disminución de la viabilidad celular de  $61.26 \pm 11.22 \%$ , y a partir de la concentración de 6.25 mU/mL de GOx comercial se observó una disminución de  $59.15 \pm 19.49 \%$ , los valores se muestran en la figura 25, estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes.



**Figura 25.** Porcentajes de viabilidad de la línea celular SiHa expuesta a la GOx determinados por el ensayo de citotoxicidad con WST-1.

Se determinó el IC<sub>50</sub> de ambas enzimas en la línea celular SiHa. El IC<sub>50</sub> de GOxr fue de  $3.13 \pm 1.20$  mU/mL y de GOx comercial fue de  $6.62 \pm 1.50$  mU/mL; la GOxr tuvo una mayor actividad anticancerígena a concentraciones más bajas que la enzima comercial.





**Figura 26.** IC<sub>50</sub> de GOxr y GOx comercial en la línea celular SiHa.

## CAPÍTULO VII

### 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo se llevó a cabo la expresión extracelular de la enzima GOxr en el sistema de expresión eucariótico *P. pastoris* SMD1168, a través de la modificación del gen *gox* de *A. niger*, al cual se le cambió los codones que codifican una Thr por una Ser de la posición 132 y una Thr por una Val de la posición 56 de la secuencia de aminoácidos, la Ser y la Val son aminoácidos que se encuentran en la secuencia de GOx proveniente de *P. amagasakiense*, ya que se ha demostrado que GOx de esta especie tiene una mayor afinidad por la  $\beta$ -D-glucosa y por lo tanto mejores propiedades catalíticas en comparación con GOx de *A. niger*<sup>12,16</sup>. Se tomó solo la secuencia que codifica a la proteína madura de GOx como se ha realizado en investigaciones sobre la HGhr expresada en *P. pastoris*<sup>24,34–38</sup>. Además, al inicio de la cadena DNA se le añadió el  $\alpha$ -Factor para que la proteína sintetizada pueda ser expulsada por la levadura al medio de cultivo, ya que el vector empleado pPIC3.5K es para expresión intracelular en *P. pastoris*.

Se le realizó la optimización de codones, por parte del laboratorio de servicios moleculares, adecuado para *P. pastoris* a la secuencia del gen, ya que los codones que traducen proteínas recombinantes que no son provenientes de

levaduras pueden no ser óptimos para una eficiencia en la expresión de dichas proteínas, debido a que el organismo huésped tiene codones preferenciales y de los demás codones posee una cantidad limitada disponible de aminoacil-tRNA. Otra razón por la cual se debe realizar la optimización es porque la transcripción puede detenerse si en la secuencia de DNA se encuentran regiones con una alta proporción de las bases adenina y timina<sup>39</sup>.

Al final se obtuvo el gen *goxM* de 2007 pb que codifica para una proteína de 668 aminoácidos que sufre un procesamiento de su péptido señal de acuerdo con un análisis virtual, dando como origen a la proteína madura de 583 aminoácidos.

Se realizó la construcción del plásmido pPIC3.5K-*goxM* con un peso molecular de 10993 pb, a pesar de que se han reportado dificultades durante los pasos de la clonación para aquellos vectores e insertos de gran tamaño, originando clonas que pueden ser genéticamente inestables<sup>39</sup>. La construcción de este plásmido se confirmó por PCR al obtener el amplicón esperado de 2210 pb obtenido con los primers 5'AOX1 Forward: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' y 3'AOX1 Reverse: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' que amplifican la región del SMC en donde se encuentra insertado el gen *goxM*. También, se le realizó una caracterización enzimática al plásmido con la enzima de restricción *Clal*, obteniendo en el gel de agarosa al 1 % los fragmentos esperados que resultaron del corte virtual del plásmido.

Se obtuvieron clones de *P. pastoris* SMD1168 transformadas con el plásmido pPIC3.5K-goxM, puesto que el DNA genómico de algunas clonas seleccionadas al azar fue analizado y caracterizado por PCR. El DNA de estas clonas presentó el amplicón esperado de 2210 pb obtenido con los primers 5'AOX1 Forward y 3'AOX1 Reverse que amplifican la región del SMC del plásmido, dicha banda presentada anteriormente para la confirmación del plásmido construido, lo que nos indica la integración del casete de expresión al genoma de la levadura en el locus AOX1 llevada a cabo por recombinación homóloga, lo que nos puede garantizar clonas genéticamente estables<sup>22,39,40</sup>.

Además de la banda de 2210 pb, en el gel de agarosa al 1 %, se aparece otra banda muy cercana a la primera, la cual corresponde al amplicón de 2200 pb del gen *AOX1* de *P. pastoris* SMD1168, que se amplifica con los primers antes mencionados; 5'AOX1 Forward se aparea en una región del promotor de este gen y 3'AOX1 Reverse que se aparea a una región del terminador de la transcripción de dicho gen, lo que nos indica que esta cepa es Mut<sup>+</sup>, es decir, tienen el fenotipo de poder utilizar el metanol como única fuente de carbono, a diferencia de las cepas que son Mut<sup>s</sup>, las cuales son poco consumidoras de metanol al no tener funcional el gen *aox1*, pero tienen el gen alternativo *AOX2*, pero se expresa en una menor cantidad en la levadura al tener un promotor débil<sup>39,40</sup>. El fenotipo Mut<sup>+</sup> y la banda de 2200 pb también se ha presentado en la cepa de *P. pastoris* GS115, reportada en los trabajos de tesis de Escamilla (1996), Sánchez (1998), Cab (2000) y Márquez (2011)<sup>24,34,35,37</sup>.

Todas las clonas obtenidas de *P. pastoris* SMD1168 fueron capaces de sintetizar GOxr. Conforme pasan las horas de expresión se observa en el gel de poliacrilamida al 11 % que va aumentando progresivamente la síntesis de la enzima, con un tamaño que se encuentra entre los 63 kDa y 100 kDa de su subunidad, este es un rango de tamaño cercano a lo que han reportado los grupos de investigación de Yamaguchi (2007), Meng (2013), Gu (2015) y Qiu (2016), que se encuentra entre los 70 kDa y 100 kDa<sup>17,18,26,27</sup>.

Se logró la purificación de GOxr por cromatografía de intercambio aniónico, lo cual fue confirmado hasta que se analizó la actividad enzimática de las fracciones que presentaron una banda que se encontraba entre las bandas de 150 kDa y 100 kDa del marcador de peso molecular, ya que las bandas no coincidieron con el tamaño que se había obtenido anteriormente de la proteína. SDS-page nos da una estimación del peso molecular, este puede diferir del calculado teóricamente, aún más en aquellas proteínas que sufren modificaciones post-traduccionales, además esta diferencia de tamaño puede ser debido a que la proteína no se encuentra totalmente desnaturalizada.

Los resultados de la actividad enzimática de GOxr sin purificar fueron de 59.28 U/mL y purificada de 26.93 U/mL, se obtuvieron mejores resultados que los reportados por Yamaguchi (2007), él y su equipo de trabajo también hicieron la expresión a nivel de matraz, emplearon la cepa de *P. pastoris* X-33, el vector de expresión constitutiva pGAPZαA, el medio de expresión fue YPD con zeocina y el tiempo de expresión fue de 48 h, la actividad enzimática de la proteína sin purificar que obtuvieron fue de 0.83 U/mL<sup>26</sup>.

Sin embargo, otros autores documentan mejores resultados, como Meng (2013) y sus colaboradores reportaron una actividad enzimática de la proteína sin purificar de 99 U/mL y purificada de 144 U/mL, emplearon la cepa de *P. pastoris* GS115, el vector de expresión inducida pPIC9, el medio de expresión fue BMMY, el tiempo de expresión fue de 48 h y expresaron en un biorreactor de 40 L; Gu (2015) y su grupo de investigación obtuvieron una actividad enzimática de la proteína sin purificar de 1208.20 U/mL, utilizaron la cepa de *P. pastoris* GS115, el vector de expresión inducida pPIC9K, el medio de expresión fue BMMY manitol/metanol (1:20), el tiempo de expresión fue de 156 h y expresaron en un fermentador de 3 L, además co-expresaron GCN4; Qiu (2016) y sus colaboradores reportaron una actividad enzimática de la proteína purificada de 107.18 U/mL, emplearon la cepa de *P. pastoris* SMD1168, el vector de expresión constitutiva pGAPZαA, el medio de expresión fue YPD con zeocina, el tiempo de expresión fue de 120 h y expresaron en un fermentador. Es por lo que se tiene como perspectivas el empleo de un fermentador para mejorar la expresión de la proteína de interés, ya que se pueden emplear mayores volúmenes de medio de cultivo y más tiempo de expresión<sup>17,18,27</sup>.

La actividad específica de la GOxr fue de 50.92 U/mg, siendo menor en comparación con la reportada por la GOx comercial de 100 U/mg, a pesar de los cambios realizados en la secuencia T132S/T56V para reducir el impedimento estérico en el sitio de unión a FAD de la enzima, pero los resultados de la actividad citotóxica en la línea celular Vero y la actividad anticancerígena en la línea celular SiHa determinados por el ensayo con el reactivo WST-1

demonstraron que la GOxr tiene una mayor actividad citotóxica significativa a las concentraciones de 6.25 mU/mL y 12.5 mU/mL, y también una mayor actividad anticancerígena significativa a las concentraciones de 3.125 mU/mL, 6.25 mU/mL y 100 mU/mL, determinados por el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, considerando estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ . Holland (2012) y su equipo de investigación combinaron las mejores características de las GOx provenientes de *A. niger* y *P. amagasakiense*, obtuvieron una secuencia mutante con mejores parámetros cinéticos y con una mejor estabilidad a una alta temperatura, y determinaron su  $T_{1/2}$  el cual fue de  $39.6 \pm 2.4$  h y el  $T_{1/2}$  de la GOx comercial fue de  $20.1 \pm 0.9$  h; esta secuencia mutante fue la que se empleó en este trabajo de investigación<sup>16</sup>. Por lo anterior, se puede decir que la GOxr es más estable que la GOx comercial en las condiciones empleadas para el mantenimiento y crecimiento de líneas celulares, las cuales fueron a 37 °C con una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> en el medio MEM con 10 % SFB.

Los porcentajes de viabilidad de las dos enzimas fueron diferentes en las dos líneas celulares con respecto a las concentraciones bajas, ya que para determinar la actividad citotóxica se empleó una línea celular considerada normal, Vero, en la cual a partir de la concentración de 6.25 mU/mL de GOxr se observó una disminución de la viabilidad celular de  $35.92 \pm 16.89$  % y a partir de la concentración de 12.5 mU/mL de GOx comercial se observó una disminución de  $79.21 \pm 19.50$  %; y para la actividad anticancerígena se utilizó la línea celular SiHa, células de cáncer de cérvix humano, se observó una disminución de la viabilidad celular de  $61.26 \pm 11.22$  % a partir de la concentración de 1.562 mU/mL

de GOxr, y se observó una disminución de  $59.15 \pm 19.49$  % a partir de la concentración de 6.25 mU/mL de GOx comercial. Estos resultados indican que las células cancerígenas son más susceptibles a la presencia del  $H_2O_2$ , que generó la GOx, que las células normales.

En comparación con lo reportado por Hecht (2016) y su equipo de trabajo, ellos cuantificaron las ERO intracelular y extracelularmente, entre otras cuantificaciones de las enzimas implicadas en la actividad antioxidante de las células, como la catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, además de evaluar el efecto del  $H_2O_2$  sobre la viabilidad celular de las líneas celulares con el ensayo de MTT: MDAMB231 y MCF7, ambas de cáncer de mama humano, y MCF10A, células de la glándula mamaria humano normales; obtuvieron como resultado que las células cancerígenas producen una mayor cantidad de ROS intracelular y extracelular, aún más en la línea celular MDAMB231, que las células normales, pero estas últimas tienen una mayor concentración de  $H_2O_2$  extracelular, MDAMB231 demostró tener una mayor habilidad para degradar el  $H_2O_2$ , ya que fue la que presentó una mayor cantidad de glutatión peroxidasa extracelular, pero intracelularmente, junto con MCF7, obtuvieron la menor cantidad de esta enzima, y con las demás enzimas no hubo diferencia significativa entre las tres líneas; con respecto a viabilidad celular, la línea MCF10A mostró ser menos sensible a la presencia del  $H_2O_2$  durante una exposición de 24 h, en el rango de concentraciones de 50 – 2000  $\mu$ M, se observaron una reducción del 50 % en la viabilidad celular 576  $\mu$ M para MCF7, 599  $\mu$ M para MDAMB231 y 800  $\mu$ M para MCF10A; ellos concluyen que el efecto



perjudicial del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depende de la concentración intracelular, en donde ocasiona daño oxidativo a los componentes de la célula<sup>41</sup>.

El IC<sub>50</sub> de la GOxr y de la GOx comercial en la línea celular Vero fueron de 5.81 ± 1.00 mu/mL y 14.94 ± 2.08 mU/mL, y en la línea celular SiHa fueron de 3.13 ± 1.20 mU/mL y 6.62 ± 1.50 mU/mL. Iloki-Assanga (2015) y su grupo de investigación reportaron el IC<sub>50</sub> de GOx proveniente de *A. niger* en la línea celular ARPE-19, células del epitelio pigmentado de la retina considerada normal, fue de 31.1 mU/mL; mostrando nuevamente que las células cancerosas son más susceptibles al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>42</sup>. Estas diferencias dependen del tipo celular, la especie y los mecanismos antioxidantes para eliminación de las ERO, por lo cual es necesario seguir analizando en más líneas celulares para comparar efectos, además que la GOxr mostró tener el mayor efecto citotóxico, pero será necesario también analizar sus efectos en otras líneas celulares.

## CAPÍTULO VIII

### 8. CONCLUSIONES

- Se diseñó el gen mutado de la glucosa oxidasa madura (*goxM*) para mejorar la actividad catalítica de la enzima que codifica y favorecer su expresión extracelular, cambiando su secuencia de aminoácidos, T132S/T56V, añadiendo el  $\alpha$ -Factor y la optimización de codones.
- Se construyó el plásmido pPIC3.5K-*goxM*, portador del gen *goxM* para la expresión de la glucosa oxidasa recombinante.
- Se obtuvieron cepas de *Pichia pastoris* SMD1168 portadoras del gen *goxM*.
- Se logró la expresión de la glucosa oxidasa recombinante, con un peso molecular que se encuentra entre 63 – 100 kDa de su subunidad.
- Con 0.5 L de medio de cultivo de expresión se obtuvo una concentración de la proteína purificada de 0.53 mg/mL y una actividad específica de 50.92 U/mg.
- A partir de la concentración de 6.25 mU/mL de GOxr se observó una disminución de la viabilidad celular de  $35.92 \pm 16.89$  % y un  $IC_{50}$  de  $5.81 \pm 1.00$  mU/mL en la línea celular Vero.

- A partir de la concentración de 1.562 mU/mL de GOxr se observó una disminución de la viabilidad celular de  $61.26 \pm 11.22$  % y un  $IC_{50}$  de  $3.13 \pm 1.20$  mU/mL en la línea celular SiHa.
- La GOxr mostró una mayor actividad citotóxica en la línea celular SiHa que en Vero.
- A pesar de que la GOxr presentó una menor actividad enzimática, esta enzima mostró una mayor estabilidad en las condiciones del medio de cultivo de las líneas celulares que la GOx comercial.

## REFERENCIAS

1. OMS. Cáncer. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Publicado en el 2018. Consultado el 20 de Mayo del 2018.
2. INEGI. Mortalidad. <http://www.beta.inegi.org.mx/temas/mortalidad/>. Consultado el 20 de Mayo del 2018.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
4. Hassanpour SH, Dehghani M. Review of cancer from perspective of molecular. *J Cancer Res Pract*. 2017;4:127-129.
5. Persidis A. Cancer multidrug resistance. *Nat Biotechnol*. 2000;18:18-20.
6. Kapse-mistry S, Govender T, Srivastava R, Yergeri M. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. *Front Pharmacol*. 2014;5(7):1-22.
7. Cheng J, Liu Q, Shuhendler AJ, Rauth AM, Wu XY. Optimizing the design and in vitro evaluation of bioreactive glucose oxidase-microspheres for enhanced cytotoxicity against multidrug resistant breast cancer cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2015;130:164-172.
8. Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. Hydrogen peroxide: a

- metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(9):722-728.
9. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 2000;486(1):10-13.
  10. Leskovac V, Trivić S, Wohlfahrt G, Kandrač J, Peričin D. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: The mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(4):731-750.
  11. Wong CM, Wong KH, Chen XD. Glucose oxidase: Natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;78(6):927-938.
  12. Bankar SB, Bule M V, Singhal RS, Ananthanarayan L. Glucose oxidase - An overview. *Biotechnol Adv.* 2009;27(4):489-501.
  13. Witteveen CFB, Veenhuis M, Visser J. Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58(4):1190-1194.
  14. Janati-Fard F, Housaindokht MR, Monhemi H. Investigation of structural stability and enzymatic activity of glucose oxidase and its subunits. *J Mol Catal B Enzym.* 2016;134:16-24.
  15. Remediate sequence - 1CF3: Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. <https://www.rcsb.org/pdb/explore/remediatedSequence.do?structureId=1CF3>. Consultado el 5 de Enero del 2018.

16. Holland JT, Harper JC, Dolan PL, et al. Rational redesign of glucose oxidase for improved catalytic function and stability. *PLoS One*. 2012;7(6):1-10.
17. Meng Y, Zhao M, Yang M, Zhang Q, Hao J, Meng Y. Production and characterization of recombinant glucose oxidase from *Aspergillus niger* expressed in *Pichia pastoris*. *Lett Appl Microbiol*. 2013;58(4):393-400.
18. Gu L, Zhang J, Liu B, Du G, Chen J. High-level extracellular production of glucose oxidase by recombinant *Pichia Pastoris* using a combined strategy. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015;175(3):1429-1447.
19. Whittington H, Kerry-Williams S, Bidgood K, et al. Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *A. niger*, *A. nidulans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 1990;18(6):531-536.
20. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(12):5301-5317.
21. Glaser AN, Nikaido H. Production of proteins in bacteria and yeast. En *Microbial biotechnology. Fundamentals of applied microbiology*. 2°. Cambridge; 2007.
22. Invitrogen. *pPIC3.5K/pAO815 Pichia vectors for multicopy integration and intracellular expression*. Carlsbad, California; 2010.
23. Cregg J. The *Pichia* system. <http://www.pichia.com/science-center/james-m-cregg-ph-d/>. Consultado el 26 de Septiembre del 2017.

24. Escamilla LL. Biosíntesis de la hormona del crecimiento humano recombinante (HGHR) en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, 1996.
25. Wang J, Edmondson DE. High-level expression and purification of rat monoamine oxidase A (MAOA) in *Pichia pastoris*: Comparison with human MAO A. 2010;70(2):211-217.
26. Yamaguchi M, Tahara Y, Nakano A, Taniyama T. Secretory and continuous expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 2007;55(2):273-278.
27. Qiu Z, Guo Y, Bao X, et al. Expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase in yeast *Pichia pastoris* SMD1168. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2016;30(5):998-1005.
28. Nathan CF, Cohn ZA. Antitumor effects of hydrogen peroxide *in vivo*. *J Exp Med.* 1981;154:1539-1553.
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-254.
30. ATCC. *Animal Cell Culture Guide*. Manassas, Virginia; 2014.
31. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.

32. Cell proliferation reagent WST-1 solution | Sigma-Aldrich.  
[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/cellproro?lang=es&region=MX&gclid=EAlaIQobChMI8vut7Lyc1wIVBZd-Ch3YXA1jEAAYASAAEgJNOvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/cellproro?lang=es&region=MX&gclid=EAlaIQobChMI8vut7Lyc1wIVBZd-Ch3YXA1jEAAYASAAEgJNOvD_BwE). Consultado el 4 de Abril del 2018.
33. *Aspergillus niger* strain CICC 40179 glucose oxidase (GOD) mRNA, complete - Nucleotide - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ774107.1>. Consultado el 5 de Enero del 2018.
34. Sánchez CN. Construcción de cepas de *Pichia pastoris* productoras de hormona del crecimiento humana recombinante y evaluación de esquemas de purificación. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, 1998.
35. Cab EL. Construcción de una cepa de *Pichia pastoris* sobreproductora de la isoforma de 20 kDa de la hormona del crecimiento humano. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, 2000.
36. Palma JP. Clonación molecular del DNAc de la hormona variante del crecimiento humano y su expresión en *Pichia pastoris*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, 2002.
37. Márquez AR. Establecimiento de un método de purificación de proteínas recombinantes basado en etiquetas de histidina, producidas en *Pichia pastoris*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, 2011.
38. Balderas F de J. Producción de la hormona del crecimiento humano de 22



kDa (hGH-22K) en una cepa de *Pichia pastoris* KM71 capaz de emplear la lactosa como fuente de carbono. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, 2016.

39. Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit.* 2005;18(2):119-138.
40. Schwarzthans J, Wibberg D, Winkler A, Luttermann T. Non-canonical integration events in *Pichia pastoris* encountered during standard transformation analysed with genome sequencing. *Nat Publ Gr.* 2016:1-12.
41. Hecht F, Cazarin J, Lima CE, et al. Redox homeostasis of breast cancer lineages contributes to differential cell death response to exogenous hydrogen peroxide. *Life Sci.* 2016;158:7-13.
42. Iloki-Assanga SB, Lewis-Luján LM, Fernández-Angulo D, Gil-Salido AA, Lara-Espinoza CL, Rubio-Pino JL. Retino-protective effect of *Bucida buceras* against oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in human retinal pigment epithelial cells line. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15(1):1-22.

## ANEXOS

### 9.1 Anexo 1

#### Secuencia de aminoácidos de GOx con la clave de GenBank AID16306.1

MQTLVSSLVVSLAAALPHYIRSNGIEASLLTDPKDVSGRTVDYIIAGGGLTGLTTAAR  
LTENPNISVLVIESGSYESDRGPPIEDLNAYGDIFGSSVDHAYETVELATNNQTALIRS  
GNLGGSTLVNGGTWTRPHKAQVDSWETVFGNEGWNWDNVAAYSLQAERARAPNAKQIA  
AGHYFNASCHGTNGTVHAGPRDTGDDYSPIVKALMSAVEDRGVPTKKDFGCGDPHGVS  
MFPNTLHEDQVRSDAAREWLLPNYQRPNLQVLTGQYVGKVLLSQNGTTPRAVGVEFGTHK  
GNTHNVYAEHEVLLAAGSAVSPTILEYSGIGMKSILEPLGIDTVVDLPVGLNLQDQTTA  
TVRSRITSAGAGQGQAAWFATFNETFGDYSEKAHELLNNTKLEQWAEAEAVARGGFHNTTA  
LLIQYENYRDWIVNHNVAYSEFLDTAGVASFDVWDLPLPFRGYVHILDKDPYLHFFAY  
DPQYFLNELDLLGQAAATQLARNISNSGAMQTYFAGETIPGDNLAYDADLSAWTEYIPY  
HFRPNYHGVGTCSMMPKEMGGVVDNAARVYGVQGLRVIDGSIPTQMSSHVMTVIFYAMA  
LKISDAILEDYASMQ

## 9.2 Anexo 2

### Preparación de soluciones

#### Buffer TENS

Mezclar 1 mL de Tris-HCl 0.5 M pH 7.5, 100 µL de EDTA 0.5 M pH 8, 1 mL de NaOH 5 N, 2.5 mL de SDS al 10 % y aforar con agua desionizada a 50 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

#### TAE 50 X

Disolver 242 g de tris base y 18.61 g de EDTA en 900 mL de agua desionizada, añadir 57.1 mL de ácido acético glacial y aforar con agua a 1 L. Almacenar a temperatura ambiente.

#### Biotina 500 X

Disolver 20 mg de biotina en 100 mL de agua desionizada y esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.

#### TSNT

Mezclar 1 mL de Tritón X-100, 5 mL de SDS al 10 %, 5 mL de NaCl 1 M, 500 µL de Tris-HCl 1 M pH 8, 50 µL de EDTA 1 M pH 8 y aforar con agua desionizada a 50 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

#### SEVAG

Cloroformo/butanol (5:1 v/v)

#### TE

Mezclar 500  $\mu$ L de Tris-HCl 1 M pH 8, 50  $\mu$ L de EDTA 1 M pH 8 y aforar con agua desionizada a 50 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

#### Buffer 4 X de carga para proteínas

Mezclar 1.25 mL de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 2.5 mL de glicerol, 2 mL de SDS 10 % y 200  $\mu$ L de azul de bromofenol 0.5 % en 3.55 mL de agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente. Agregar 50  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol a 950  $\mu$ L de buffer antes de utilizar.

#### TGS 10 X

Disolver 30.3 g de tris base, 144 g de glicina y 10 g de SDS en 1 L de agua desionizada. Almacenar a 4 °C.

#### Solución colorante de Coomassie

Mezclar 0.5 g de azul brillante de Coomassie, 50 mL de metanol y 10 mL de ácido acético y aforar con agua desionizada a 100 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

#### Solución decolorante

Mezclar 5 mL de metanol y 7 mL de ácido acético y aforar con agua desionizada a 100 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

#### Reactivo Bradford 5 X

Mezclar 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250, 50 mL de etanol 95 % y 100 mL de ácido fosfórico 85 % p/v y aforar con agua desionizada a 200 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

### **9.3 Anexo 3**

#### **Preparación de medios de cultivo para bacterias**

##### Medio LB

Disolver 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, si es medio para cajas agregar 15 g de agar, en 900 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 7 con una solución de NaOH 1 N y aforar a 1 L. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 psi por 15 min. Almacenar a 4 °C.

#### **Preparación de medios de cultivo para levaduras**

##### Medio YPD

Disolver 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de dextrosa, si es medio para cajas agregar 15 g de agar, en 1 L de agua desionizada. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 psi por 15 min. Almacenar a 4 °C.

##### Medio MD

Disolver 13.4 g de YNB y 20 g de dextrosa, si es medio para cajas agregar 22 g de agar, en 998 mL de agua desionizada. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 psi por 15 min. Agregar 2 mL de biotina 500 X. Almacenar a 4 °C.

##### Medio BMGY

Mezclar 100 ml de buffer de fosfatos 1 M pH 6, 13.4 g de YNB, 10 g de glicerol, 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 998 mL de agua desionizada.

Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 psi por 15 min. Agregar 2 mL de biotina 500 X. Almacenar a 4 °C.

#### Medio BMMY

Mezclar 100 ml de buffer de fosfatos 1 M pH 6, 13.4 g de YNB, 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 993 mL de agua desionizada. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 psi por 15 min. Agregar 2 mL de biotina 500 X y 5 mL de metanol. Almacenar a 4 °C.

### **Preparación de medios de cultivo para líneas celulares**

#### Medio MEM con 10 % de SFB

Disolver 9.6 g de medio MEM, 2.2 g de bicarbonato de sodio, 100 ml de SFB, 1 ml de antibiótico penicilina-estreptomina 100X en 900 ml de agua desionizada. Ajustar el pH a 7 con una solución de NaOH 1 N y aforar a 1 L. Esterilizar por filtración y someter la solución a prueba de esterilidad por 24 h. Almacenar a 4 °C.

#### Medio DMEM con 10 % de SFB

Disolver 9.3 g de medio MEM, 2.2 g de bicarbonato de sodio, 0.292g de L-glutamina, 100 ml de SFB, 1 ml de antibiótico penicilina-estreptomina 100X en 900 ml de agua desionizada. Ajustar el pH a 7 con una solución de NaOH 1 N y aforar a 1 L Esterilizar por filtración y someter la solución a prueba de esterilidad por 24 h. Almacenar a 4 °C.

## **9.4 Anexo 4**

### **Stock de glicerol para bacterias**

Inocular 1 colonia del cultivo bacteriano en 6 mL de LB, incubar a 37 °C con agitación de 220 rpm por una noche ( $DO_{600}$  entre 0.4 – 0.6). En un criotubo agregar 500  $\mu$ L del cultivo y añadir 500  $\mu$ L de glicerol al 50 %, mezclar gentilmente y almacenar a -80 °C.

### **Stock de glicerol para levaduras**

Inocular 1 colonia del cultivo de levaduras en 4 mL de YPD, incubar a 30 °C con agitación de 220 rpm por 48 H ( $DO_{600}$  entre 5 – 10). Centrifugar a 5000 rpm por 5 min y descartar el sobrenadante. Resuspender el pellet de células con YPD con glicerol al 15 % y transferir a un criotubo. Almacenar a -80 °C.