

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



EXPRESIÓN DE UN ANÁLOGO DE GLP-1 RECOMBINANTE EN
Lactococcus lactis Y SU EVALUACIÓN BIOLÓGICA EN UN
MODELO MURINO

Por

EIBER ALEXIS BRIONES VELÁZQUEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia

Marzo, 2020

EXPRESIÓN DE UN ANÁLOGO DE GLP-1 RECOMBINANTE EN
Lactococcus lactis Y SU EVALUACIÓN BIOLÓGICA EN UN
MODELO MURINO

Revisión de tesis por:

Dr. Isaías Balderas Rentería

Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez

Dra. Ivonne Antonieta Camacho Mora

Dra. Sandra Leticia Gracia Vásquez

El presente trabajo de investigación se desarrolló en:

Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Autónoma de Nuevo León

México

Laboratorio de manipulación genética de bacterias ácido lácticas

Micalis Institute

National Institute for Agricultural Research (INRA)

Francia

AGRADECIMIENTOS

A lo largo del periodo de tiempo que me ha llevado la realización de este trabajo muchas han sido las personas que con su ayuda, atención o simplemente su compañía, se han hecho merecedoras de aparecer en este apartado.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi familia, la cual durante todo este tiempo no se ha cansado de animarme y apoyarme, gracias porque me han enseñado que no importan las dificultades que se tengan en el camino, siempre se tiene que seguir adelante.

A Liliana, ya que siempre me brindó su apoyo incondicional y paciencia a lo largo de esta etapa de mi vida, pero sobre todo gracias por creer en mí aun cuando ni yo mismo creía que lo iba a lograr.

A la Dra. Myrna Yeverino Gutiérrez, Dra. Ivonne Camacho Mora, la Dra. Sandra Gracia Vásquez y a la Dra. María del Rosario González González por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

A mi director de tesis el Dr. Isaías Balderas Rentería por su paciencia, su dedicación, su aporte de conocimientos para la realización del trabajo y por haber confiado en mí y haberme brindado la oportunidad de adentrarme al mundo de la biología molecular e ingeniería genética y la investigación.

Al Dr. Luis Gilberto Bermúdez Humaran por su orientación en el desarrollo de esta tesis y permitirme trabajar en el Micalis Institute, facilitarme las instalaciones de su laboratorio y el material adecuado para la realización de este proyecto, además de su valiosas sugerencias y aporte de conocimientos.

A mis compañeros del laboratorio de Ingeniería genética y genómica de la Facultad de Ciencias Químicas con los cuales he tenido la suerte de trabajar, no me queda más que desearles todo el éxito en sus futuros proyectos.

A la Facultad de Ciencias Químicas y a la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como a sus autoridades por el apoyo para la realización de este proyecto.

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

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Diabetes mellitus.....	1
1.1.1 Generalidades e incidencia.....	1
1.1.2 Etiología y clasificación	3
1.1.3 Tratamiento.....	5
1.2 Bacterias ácido lácticas.....	12
1.2.1 Generalidades.....	12
1.2.2 Expresión de proteínas recombinantes en BAL.....	13
1.3 Antecedentes.....	15
1.4 Hipótesis y Objetivos.....	18
2. METODOLOGIA.....	19
2.1 Bioinformática.....	19
2.1.1 Diseño bioinformático de la unidad de transcripción sintética pGroESL/Usp45-GLP-1R/ter.....	19
2.1.2 Diseño de primers.....	21
2.2 Manipulación de <i>Lactococcus lactis</i>	21
2.2.1 Cepa, plásmido, medios de cultivo y antibiótico.....	21

2.2.2	Reactivación de <i>L. lactis</i> cepa silvestre.....	23
2.2.3	Preparación de criotubos para almacenamiento de <i>L. lactis</i> cepa silvestre libre de plásmidos.....	23
2.2.4	Preparación de <i>L. lactis</i> electrocompetente.....	23
2.2.5	Transformación de <i>L. lactis</i> electrocompetente con el plásmido pNZ124.....	24
2.2.6	Preparación de criotubos para almacenamiento de <i>L.lactis</i> cepa portadora del plásmido pNZ124.....	24
2.3	Clonación Molecular.....	24
2.3.1	Extracción del plásmido pNZ124.....	24
2.3.2	Caracterización del plásmido pNZ124.....	25
2.3.3	Digestión del plásmido pNZ124	26
2.3.4	Digestión de la UTS.....	26
2.3.5	Ligación del plásmido pNZ124 con la UTS.....	27
2.3.6	Transformación de <i>L.lactis</i> electrocompetente con el plásmido pEB001.....	28
2.3.7	Preparación de criotubos para almacenamiento de <i>L. lactis</i> cepa portadora del plásmido pEB001.....	28
2.3.8	Extracción del plásmido pEB001.....	29
2.3.9	Caracterización del plásmido pEB001.....	29
2.3.10	Digestión del plásmido pEB001.....	30
2.3.11	PCR del plásmido pEB001	31

2.4	Expresión de GLP-1R.....	32
2.4.1	Inducción del cultivo celular.....	32
2.4.2	Precipitación de proteínas.....	32
2.4.3	Electroforesis de proteínas.....	32
2.5	Evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R en ratones.....	33
2.5.1	Cuidado, manipulación y selección de ratones.....	33
2.5.2	Protocolo de diabetización.....	34
2.5.3	Evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R.....	35
2.5.4	Análisis estadístico.....	35
2.6	Disposición de los residuos generados.....	36
2.6.1	Disposición de residuos.....	36
3.	RESULTADOS.....	36
3.1	Bioinformática.....	36
3.1.1	Diseño bioinformático de la unidad de transcripción sintética pGroESL/Usp45-GLP-1R/ter.....	36
3.1.2	Diseño de primers.....	40
3.2	Manipulación de <i>Lactococcus lactis</i>	41
3.2.1	Transformación de <i>L.lactis</i> electrocompetente con el plásmido pNZ124.....	41

3.3	Clonación Molecular.....	42
3.3.1	Caracterización del plásmido pNZ124.....	42
3.3.2	Ligación del plásmido pNZ124 con la UTS.....	42
3.3.3	Transformación de <i>L.lactis</i> electrocompetente con el plásmido pEB001.....	43
3.3.4	Caracterización del plásmido pEB001.....	43
3.3.5	Digestión del pEB001 con enzimas de restricción.....	44
3.3.6	PCR del plásmido pEB001	45
3.4	Expresión de GLP-1R.....	46
3.4.1	Electroforesis de proteínas	46
3.5	Evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R en ratones.....	47
3.5.1	Cuidado, manipulación y selección de ratones.....	47
3.5.2	Protocolo de diabetización.....	47
3.5.3	Evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R.....	48
3.5.4	Análisis estadístico.....	51
4.	DISCUSIÓN.....	54
4.1	Bioinformática.....	54
4.2	Manipulación de <i>Lactococcus lactis</i>	56
4.3	Clonación molecular.....	56

4.4	Expresión de GLP-1 recombinante.....	57
4.5	Evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R en ratones.....	58
5.	CONCLUSIONES.....	62
6.	PERSPECTIVAS.....	63
	BIBLIOGRAFÍA.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Número estimado de personas con diabetes mellitus en el mundo en el año 2019.....	1
2. Estimaciones de prevalencia de la diabetes mellitus en el año 2019 en la región de América del Norte y el Caribe.....	2
3. Modificaciones postraduccionales del preproglucagón	7
4. GLP-1.....	8
5. Inactivación del GLP-1 por la DPP-4.....	8
6. Exendin-4.....	9
7. Exenatida	9
8. Lixisenatida	10
9. Liraglutida.....	10
10. Albiglutida	11
11. Dulaglutida.....	11
12. <i>Lactococcus lactis</i>	13
13. Anatomía molecular del plásmido pLB333.....	20
14. Anatomía molecular del plásmido pNZ124.....	22
15. Unidad de transcripción sintética pGroESL/Usp45/GLP-1/ter.....	36
16. Traducción <i>in silico</i> de la secuencia de nucleótidos correspondiente al péptido señal Usp45 obtenida de la base de datos del NBCI	37

17. Alineamiento local de la secuencia de aminoácidos del péptido señal Usp45 obtenida por la traducción de los codones reportados en la base de datos del NBCI contra la secuencia de aminoácidos reportada en UniProt.....	37
18. Traducción <i>in silico</i> de la secuencia de nucleótidos correspondiente al GLP-1R obtenida de la base de datos del NBCI	38
19. Alineamiento local de la secuencia de aminoácidos del GLP-1R obtenida por la traducción de los codones reportados en la base de datos del NBCI contra la secuencia de aminoácidos reportada en UniProt	38
20. Traducción <i>in silico</i> del marco abierto de lectura	39
21. Alineamiento local que muestra la concordancia del 100% entre la secuencia de aminoácidos del programa ExPASy contra la reportada por la base de datos UniProt	39
22. Grafica de procesamiento transmembranal de la proteína Usp45-GLP-1R.....	40
23. Valores obtenidos del diseño de los primers a través en la herramienta informática OligoAnalyzer.....	40
24. PCR <i>in silico</i> de la UTS utilizando la herramienta informática Snap Gene	41
25. A) Control negativo B) Muestra experimental.....	41
26. Gel de agarosa al 1%.....	42
27. Anatomía molecular del plásmido pEB001.....	42
28. A) Control negativo B) Muestra experimental.....	43
29. Gel de agarosa al 1%.....	44
30. Gel de agarosa al 2%.....	45
31. Gel de agarosa al 2%	46
32. Gel de poliacrilamida.....	46

33. Glucemia en mg/dl de los ratones del grupo experimental A durante el ensayo de evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R.....	48
34. Glucemia en mg/dl de los ratones del grupo experimental B durante el ensayo de evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R.....	49
35. Glucemia en mg/dl de los ratones del grupo experimental C durante el ensayo de evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R.....	49
36. Grafica de barras en la cual se muestra el promedio y las desviaciones estándar de los tres grupos experimentales durante el ensayo.....	50

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Clasificación de la Diabetes mellitus	3
2. Ensayo de restricción del plásmido pNZ124 con la enzima EcoRI.....	26
3. Ensayo de doble restricción del plásmido pNZ124 con las enzimas BamHI y XbaI	26
4. Ensayo de doble restricción de la UTS con las enzimas BamHI y XbaI	27
5. Ensayo de ligación del plásmido pNZ124 con la UTS.....	28
6. Ensayo de restricción del pEB001 con la enzima EcoRI	30
7. Ensayo de doble restricción del plásmido pEB001 con las enzimas BamHI y XbaI	30
8. Ensayo de PCR para la amplificación de la UTS	31
9. Condiciones del ensayo de la PCR para la amplificación de la UTS.....	31
10. Protocolo para la preparación de los geles de poliacrilamida.....	33
11. Peso en gramos de los ratones durante un mes.....	47
12. Grupos y pesos en gramos de los ratones seleccionados para desarrollar el protocolo.....	47
13. Glucemia en mg/dl de los ratones durante el protocolo de diabetización.....	48

14. Glucemia en mg/dl de los ratones durante el ensayo de evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R en ratones.....	51
15. Análisis de varianza.....	52
16. Prueba de Tukey.....	53
17. Diferencias entre las medias de los tratamientos.....	53

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentaje
α	Alfa
β	Beta
\pm	Mas/menos
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
ΔG	Energía libre de Gibbs
-	Menos
+	Mas
®	Marca registrada
Ω	Ohm
~	Aproximadamente
&	Et

NOMENCLATURA

DM	Diabetes Mellitus
IDF	International Diabetes Federation
DPP-4	Dipeptidyl Peptidase-4
GLP-1	Glucagon Like Peptide-1
GRPP	Glicentin Related Pancreatic Polypeptide
GLP-2	Glucagon Like Peptide-2
GLP-1Re	Glucagon Like Peptide-1 Receptor
FDA	Food and Drug Administration
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
GRAS	Generally Recognized As Safe
SGI	Sistema Gastrointestinal
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
pGroESL	Promotor GroESL
NCBI	National Center for Biotechnology Information
GLP-1R	Glucagon Like Peptide-1 Recombinant
UniProt	Universal Protein
ter	Terminador de la transcripción
UTS	Unidad de Transcripción Sintética

PCR	Polymerase Chain Reaction
pb	Pares de Bases
Tm	Melting Temperature
kcal/mol	kilocalorías/mol
Cm	Gen de resistencia al cloranfenicol
MC	Medio de cultivo
G-M17	Medio de cultivo M17 suplementado con glucosa
G-M17A	Medio de cultivo M17 suplementado con glucosa y agar
M	Molar
G-SGliM17	Medio de cultivo M17 suplementado con glucosa, sacarosa y glicina
mM	Milimolar
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
Cl	Antibiótico cloranfenicol
µg/ml	Microgramos/mililitro
G-CIM17	Medio de cultivo M17 suplementado con glucosa, cloranfenicol
G-CIM17A	Medio de cultivo M17 suplementado con glucosa, cloranfenicol y agar
µl	Microlitros
D.O.	Densidad Óptica
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por minuto

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
cm	Centímetros
V	Voltios
μ F	Microfaradios
TES/Lis	Buffer compuesto de Tris-HCl/EDTA/Sacarosa/Lisozima
pH	Potencial hidrógeno
mg	Miligramos
RNasa A	Ribonucleasa A
PCI	Fenol: Cloroformo: Alcohol-Isoamílico
v/v	Volumen/volumen
Cl	Cloroformo: Alcohol-Isoamílico
TE	Buffer compuesto de Tris-HCl/EDTA
uv	Ultravioleta
ADN	Ácido desoxirribonucleico
pEB001	Eiber Briones 001
ng	Nanogramos
μ M	Micromolar
NaCl	Cloruro de sodio
μ m	Micrómetros
NaOH	Hidróxido de sodio
g	Gramos
mg/kg	Miligramos/kilogramo
mg/dl	mg/decilitro

UFC	Unidades Formadoras de Colonias
SPase I	Signal Peptidase type I
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
G-M17/MgCl ₂ + CaCl ₂	Medio de cultivo M17 suplementado con glucosa, cloruro de magnesio y cloruro de calcio

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Generalidades e incidencia

La diabetes mellitus (DM) se define como una enfermedad endocrino-metabólica caracterizada por hiperglucemia crónica y alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas. Puede deberse a una deficiencia en la secreción de insulina, resistencia a la acción de ésta o una combinación de ambas (Balderas, 2015).

Esta enfermedad es una de las mayores emergencias mundiales de salud pública del siglo XXI. Cada año más y más personas viven con esta condición que puede desencadenar complicaciones a lo largo de la vida. En el año 2019 la Federación Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation, IDF) reportó 463 millones de adultos (entre 20 y 79 años) en el mundo con el diagnóstico de diabetes, además de 1,1 millones de niños y adolescentes menores de 20 años viven con diabetes tipo 1 (Figura 1) (IDF, 2019).



Figura 1. Número estimado de personas con diabetes mellitus en el mundo en el año 2019.

En América del Norte y el Caribe se estima que, en el año 2019, 48 millones de personas entre 20-79 años fueron diagnosticadas con DM, siendo el grupo de edad más afectado el comprendido entre los 60 y 79 años, lo anterior la convierte en la región que presenta la mayor prevalencia (13.3 %) de diabetes comparada con otras regiones de la IDF (Figura 2) (IDF, 2019).

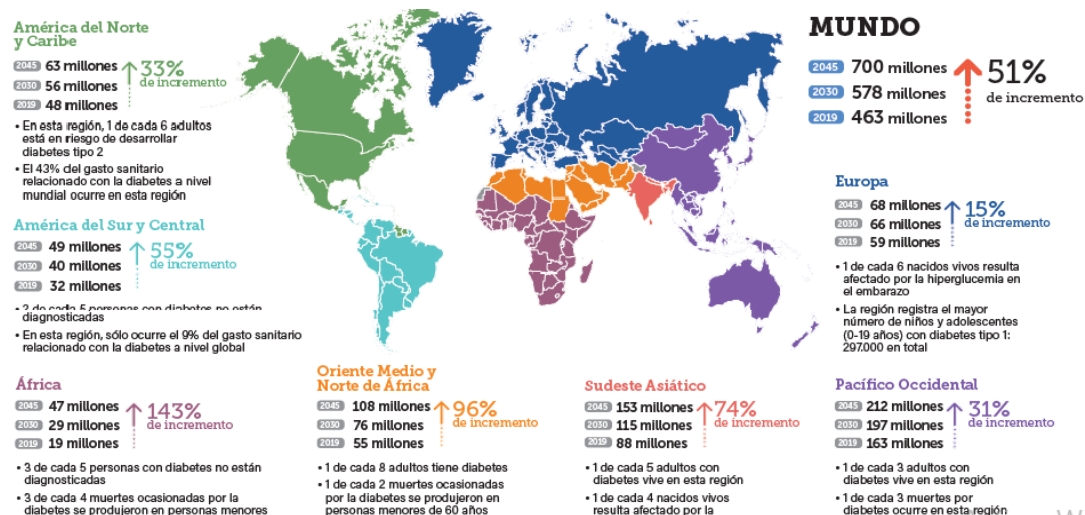


Figura 2. Estimaciones de prevalencia de la diabetes mellitus en el año 2019 en la región de América del Norte y el Caribe.

En México la prevalencia de diabetes ha ido en aumento durante las últimas décadas. De acuerdo con las estadísticas de la IDF del año 2019 en México se reportaron 12,805 millones de adultos con diabetes, lo anterior coloca a nuestro país en el sexto lugar a nivel mundial en número de personas con diabetes y en segundo lugar por detrás de Brasil en América Latina (IDF, 2019). Esta situación ha ocasionado que la DM represente un verdadero reto y una amenaza para la salud pública ya que actualmente es la principal causa de muerte en el país, se estima que podrían ser 80,000 muertes por año. Cabe destacar que muchas de estas muertes además de ser prematuras son precedidas por un largo periodo de discapacidad, las estadísticas reportan que la DM es la primera causa de ceguera prevenible, de insuficiencia renal terminal, de amputaciones no traumáticas y de infartos al miocardio. Los altos índices de detecciones por este padecimiento evidencian que México carece de acciones suficientes para contrarrestar la epidemia de diabetes en la

juventud, principalmente debido a la mala alimentación de nuestra población. No obstante, notables acciones se han comenzado a implementar para contrarrestar los hábitos de vida poco saludables en nuestro país (Irigoyen *et al.*, 2017).

1.1.2 Etiología y clasificación

Aunque se desconoce la etiología exacta de la diabetes mellitus, se sabe que juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad algunos de los siguientes factores de riesgo tales como: herencia, sobrepeso, obesidad, infecciones virales, falta de ejercicio, una dieta baja en fibra, alta en grasas saturadas, el consumo de carbohidratos con alto índice glucémico, autoinmunidad y desórdenes genéticos (ADA, 2020).

Se han desarrollado diferentes clasificaciones para esta enfermedad, pero la que actualmente se encuentra vigente se muestra a continuación (Tabla I) (ADA, 2020):

Tabla I. Clasificación de la Diabetes mellitus.

1. Diabetes mellitus tipo 1: con destrucción de las células β , usualmente lleva a una deficiencia absoluta de insulina a.- Autoinmune b.- Idiopática
2. Diabetes mellitus tipo 2: varía desde la resistencia a la insulina a insuficiencia relativa de la secreción de insulina
3.- Otras formas específicas de diabetes
a.- Defectos genéticos de la función de la célula β b.- Defectos genéticos de la acción de la insulina c.- Enfermedades del páncreas exocrino d.- Endocrinopatías e.- Inducida por drogas o químicos f.- Infecciones g.- Formas raras de diabetes inmuno mediada h.- Síndromes genéticos asociados a diabetes
4.- Diabetes mellitus gestacional

➤ Diabetes tipo 1

Esta forma de diabetes representa solo el 5 - 10 % de los casos, previamente abarcaba los términos diabetes insulino dependiente o diabetes juvenil ya que suele ocurrir en la niñez y la adolescencia además de que es necesario el uso obligado de insulina para su tratamiento. La causa de esta enfermedad es debido a la destrucción autoinmune de las células beta del páncreas, se cree que su origen tiene múltiples predisposiciones genéticas además de estar relacionada con factores ambientales poco definidos. Aunque rara vez los pacientes son obesos, cuando la obesidad está presente esta última no contradice el diagnóstico de diabetes tipo 1. Estos pacientes también son propensos a otros trastornos autoinmunes, como la enfermedad de Graves, la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad de Addison, el vitiligo, la enfermedad celíaca, la hepatitis autoinmune, la miastenia grave y la anemia perniciosa (Kasper y Fauci, 2019).

➤ Diabetes tipo 2

Este tipo de diabetes representa el 90 - 95 % de los casos, antes conocida como diabetes no insulino dependiente o diabetes de comienzo en el adulto, incluye a las personas con resistencia a la insulina las cuales generalmente tienen deficiencia relativa (no absoluta) de insulina, al menos durante las etapas tempranas de la enfermedad estas personas no necesitan tratamiento con esta hormona para sobrevivir. Probablemente existen muchos factores que contribuyen para desencadenar este tipo de diabetes ya que su etiología específica no se conoce totalmente, sin embargo, se sabe que presenta mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad las personas que padecen obesidad, falta de actividad física, que tengan un familiar directo con esta enfermedad, en mujeres con diabetes mellitus gestacional previa y en los individuos con hipertensión o dislipidemia. Su frecuencia varía en diferentes subgrupos raciales, étnicos y a menudo se asocia con una fuerte predisposición genética, sin embargo, esta última es compleja y no está claramente definida (Goldman *et al.*, 2019).

➤ Otros tipos específicos de diabetes

Esta clasificación está constituida por ocho subgrupos los cuales ocurren con muy baja frecuencia, dentro de este listado el subgrupo de diabetes juvenil de inicio en la madurez y las inducidas por fármacos son los que se presentan más comúnmente en la práctica clínica. La diabetes lipoatrófica, las asociadas a hemocromatosis y a síndrome de Down se observan en raras ocasiones (Sanzana y Durruty, 2016).

➤ Diabetes mellitus gestacional

Se trata de una patología heterogénea y compleja que involucra al sistema biológico materno, al tejido placentario y al feto, que se caracteriza por intolerancia a la glucosa, la cual es reconocida por primera vez durante la gestación. Su frecuencia (14 %) va en aumento y varía de acuerdo con el criterio diagnóstico, grupo étnico y la edad. Aunque no hay una causa única que ocasione diabetes mellitus gestacional, se tiene evidencia que durante la gestación la adaptación funcional de la célula beta al embarazo parece estar comprometida al presentar una disfunción subyacente ocurrida tiempo atrás. La hipótesis más probable es que el aumento del factor de necrosis tumoral α , el lactógeno placentario, la leptina y la resistina contribuyen a aumentar la resistencia a la insulina tanto en embarazos normales como en los que coexiste diabetes mellitus gestacional, junto con la disminución progresiva de adiponectina materna implicada en la sensibilidad a la insulina (Medina *et al.*, 2017).

1.1.3 Tratamiento

Actualmente existen en el mercado múltiples tratamientos para la diabetes dentro de los cuales se pueden encontrar las sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, tiazolidinedionas, inhibidores de la enzima alfa-glucosidasa, inhibidores de la enzima dipeptidilpeptidasa-4 (*Dipeptidyl Peptidase-4*, DPP-4), insulina, análogos del péptido similar al glucagón-1 (Glucagon Like

Peptide-1, GLP-1), entre otros. No obstante, la elección de cada fármaco depende del tipo de diabetes desarrollada así como de los antecedentes de cada paciente (Alcántara y Pérez, 2016).

Hoy en día se continúa en la búsqueda de desarrollar nuevos fármacos, una alternativa a este problema es mejorar la actividad de los que ya se encuentran disponibles incrementando su potencia, su vida media o desarrollando nuevas formas farmacéuticas para su administración con lo cual se pueda lograr una mejor adherencia al tratamiento para lograr el control de la enfermedad, tomando en cuenta que la elección del tratamiento idealmente debe de poseer las siguientes características: debe ser tolerado por el paciente, tener pocas contraindicaciones de uso, que sea efectivo a corto y largo plazo, además debe poseer un bajo riesgo de hipoglucemia así como una baja ganancia de peso. A pesar de las medidas farmacológicas los cambios en el estilo de vida como la dieta y el ejercicio continúan siendo los pilares fundamentales para el control y el tratamiento de la enfermedad (Marín *et al.*, 2016).

➤ Incretinas

En los últimos años se ha incrementado el interés por el uso de las incretinas como dianas terapéuticas, dentro de los principales representantes de este grupo se encuentra el polipéptido inhibidor gástrico y al GLP-1, esta última proteína proviene del gen del glucagón el cual se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 2 humano y está conformado por 6 exones y 5 intrones. Este gen es común para varias proteínas ya que inicialmente codifica un *ácido ribonucleico* mensajero de 180 aminoácidos el cual posteriormente sufre modificaciones postraduccionales las cuales originan diferentes proteínas, este proceso ocurre de manera distinta dependiendo del tejido en el cual se exprese el gen, por ejemplo en las células α pancreáticas posterior a la escisión del péptido señal, la proconvertasa 2 escinde el proglucagón liberándose glucagón, polipéptido pancreático relacionado con la glicentina (*Glicentin Related Pancreatic Polypeptide, GRPP*) y un fragmento que contiene al GLP-1 y al péptido similar al glucagón-2 (Glucagon Like Peptide-

2, GLP-2), en cambio en las células L intestinales y en las neuronas posterior a la escisión del péptido señal la proconvertasa 1/3 escinde el proglucagón liberándose glicentina, oxintomodulina, GLP-1 y GLP-2 (Figura 3) (Hurtado *et al.*, 2013).

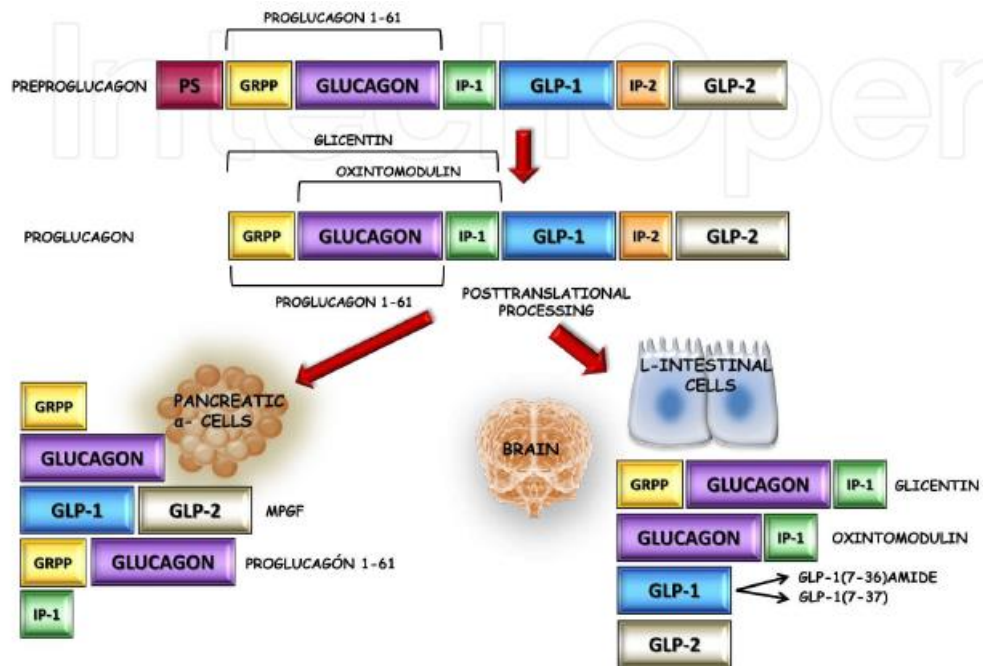


Figura 3. Modificaciones postraduccionales del preproglucagón.

➤ GLP - 1 y fármacos relacionados

El GLP-1 es una hormona que está constituida por 31 aminoácidos la cual es producida y almacenada por las células L intestinales y es liberada a la circulación como respuesta a la ingesta de nutrientes que estimulan su secreción tales como glucosa, aminoácidos y ácidos grasos (Figura 4). Al ocurrir la liberación del GLP-1 hacia la circulación sistémica este péptido viaja por ella hasta alcanzar sus órganos blanco y unirse al receptor del péptido similar al glucagón-1 (Glucagon Like Peptide-1 Receptor, GLP-1Re) lo cual desencadena una serie de señales intracelulares que ejercen los efectos propios de esta proteína por ejemplo a nivel pancreático se observa un aumento en la secreción de insulina e inducción de la proliferación de células β, además de disminuir la liberación de glucagón en las células α, a nivel del

sistema nervioso central aumenta la sensación de saciedad, en estómago retrasa el vaciamiento gástrico, en hígado inhibe la gluconeogénesis hepática, en músculo y tejido adiposo aumenta la captación periférica de glucosa hacia el interior de estos tejidos (Brown *et al.*, 2018; Bruton *et al.*, 2019; Gupta, 2013).



Figura 4. GLP - 1.

Lamentablemente los efectos antes mencionados solo tienen una duración aproximada 2-3 minutos debido a que la enzima DPP-4 hidroliza la región N-terminal del residuo alanina ubicado en la segunda posición del GLP-1 provocando su inactivación (Figura 5). Para solucionar este problema se han desarrollado diversos fármacos los cuales se pueden dividir en 2 grupos según su estructura química: A) Derivados del Exendin-4, B) Derivados del GLP-1 humano.

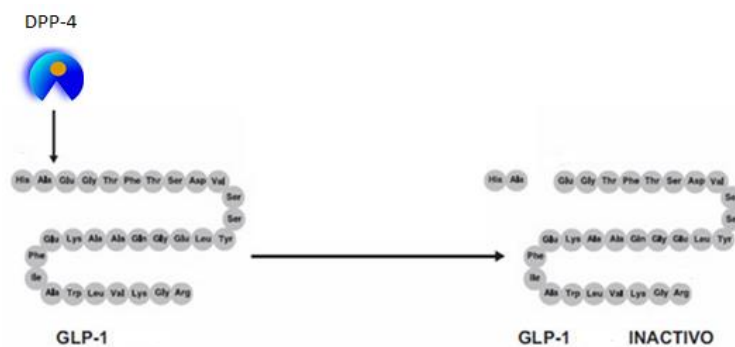


Figura 5. Inactivación del GLP-1 por la DPP-4.

A) Derivados del Exendin-4

Estos fármacos tienen como base la secuencia de aminoácidos del péptido natural exendin-4, del cual se descubrió que debido a su homología estructural con el GLP-1 podía unirse al GLP1-Re y estimular la secreción de insulina

provocando efectos hipoglucemiantes (Figura 6) (Brown *et al.*, 2018; Bruton *et al.*, 2019; Gupta, 2013).

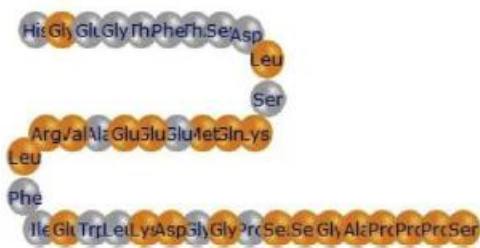


Figura 6. Exendin-4.

Exenatida: Fue el primer agonista del receptor de GLP-1 aceptado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA) para el tratamiento de la diabetes, este fármaco está constituido por 39 aminoácidos y presenta una homología estructural del 53 % con respecto al GLP-1, cabe mencionar que se le considera la versión sintética del péptido natural exendin-4 el cual fue aislado por primera vez de la saliva del monstruo de Gila. Estructuralmente esta molécula presenta una modificación en el segundo aminoácido con respecto al GLP-1 al contener glicina en vez de alanina, este sutil cambio hace posible que la exenatida resista más tiempo la actividad proteolítica de la DPP-4 y le confiere un mayor tiempo de vida media de aproximadamente dos horas en comparación con los tres minutos del GLP-1 (Figura 7) (Brown *et al.*, 2018; Bruton *et al.*, 2019; Gupta, 2013).

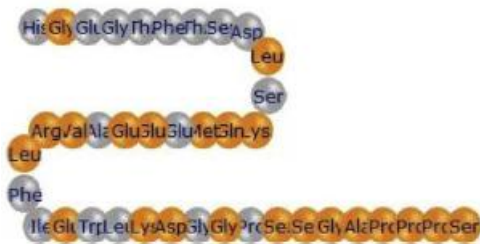


Figura 7. Exenatida.

Lixisenatida: este fármaco está constituido de 44 aminoácidos y presenta una homología estructural muy similar a exenatida (53 %) con la diferencia de presentar una delección del residuo de prolina en la posición 38 y una adición de 6 residuos de lisina en la región C-terminal de la proteína, las anteriores

modificaciones originaron un aumento de la vida media a cuatro horas con respecto a las dos horas de la exenatida (Figura 8) (Brown *et al.*, 2018; Bruton *et al.*, 2019; Gupta, 2013).

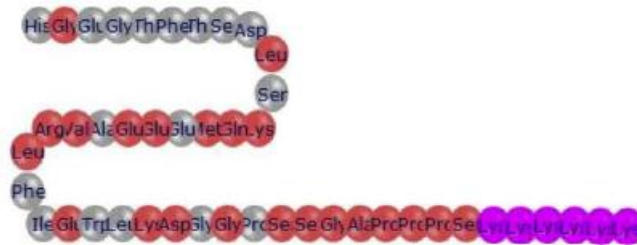


Figura 8. Lixisenatida.

B) Derivados del GLP-1 humano

A partir de la secuencia de aminoácidos del GLP-1 se han desarrollado diversos fármacos logrando una homología estructural del 90 - 97 %.

Liraglutida: este fármaco está constituido por 32 aminoácidos y presenta una homología estructural del 97 % con el GLP-1. Para su desarrollo se incorporó a su estructura un ácido palmítico en el aminoácido lisina (K) de la posición 20, lo anterior se logró mediante un espaciador de ácido glutámico (E), además se sustituyó el aminoácido lisina (K) de la posición 28 por arginina (R). Con las modificaciones estructurales antes mencionadas se logró un aumento de la vida media plasmática a 12 horas (Figura 9) (Brown *et al.*, 2018; Bruton *et al.*, 2019; Gupta, 2013).

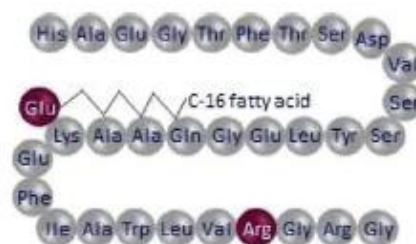


Figura 9. Liraglutida.

Albiglutida: este agonista dimérico presenta una homología estructural con el GLP-1 del 95 % y consiste en dos copias de GLP-1 humano recombinante unidas mediante

la secuencia Arg-30-His-1, además de presentar una sustitución del aminoácido alanina (A) ubicado en la posición 2 por glicina (G). Además, este dímero se encuentra fusionado con la región N-terminal de la albúmina sérica humana recombinante mediante un enlace covalente, lo anterior mejoró sus propiedades farmacocinéticas y prolongó su tiempo de vida media de seis a ocho días (Figura 10) (Brown *et al.*, 2018; Bruton *et al.*, 2019; Gupta, 2013).

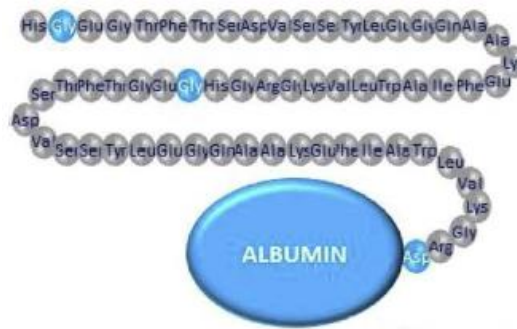


Figura 10. Albiglutida.

Dulaglutida: es una proteína de fusión recombinante la cual presenta una homología estructural del 90 % con respecto al GLP-1 y que está formada por dos moléculas de GLP-1, las cuales presentan tres sustituciones de aminoácidos, el primero la alanina (A) de la posición 8 por glicina (G), el segundo la glicina (G) en la posición 22 por ácido glutámico (E) y el tercero es la arginina (R) en la posición 36 por glicina (G) unidos covalentemente cada uno mediante un pequeño péptido de unión (también conocido como linker) a dos variantes de las cadenas pesadas de la inmunoglobulina IgG4, esta unión aumenta el tamaño de la molécula reduciendo su tasa de eliminación prolongando así su vida media a 90 horas (Figura 11) (Brown *et al.*, 2018; Bruton *et al.*, 2019; Gupta, 2013).

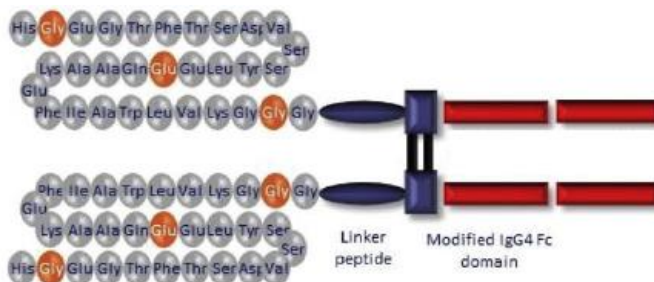


Figura 11. Dulaglutida.

1.2 Bacterias ácido lácticas

1.2.1 Generalidades

El término bacterias ácido lácticas (BAL) engloba a un grupo heterogéneo de microorganismos cuya característica definitoria es la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares, son Gram-positivas, ácido tolerantes además de tener similitudes morfológicas, metabólicas y fisiológicas debido a su estrecha relación filogenética. Son microorganismos que no forman esporas, inmóviles, los cuales pueden ser cocos o bacilos, su clasificación se basa principalmente en la morfología, el modo de fermentación de la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, su capacidad de crecer a altas concentraciones de sal y la tolerancia ácida o alcalina (Drider *et al.*, 2017; Madigan *et al.*, 2017; Quinto *et al.*, 2014).

Los géneros básicos que comprenden las BAL son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, además de que recientes revisiones taxonómicas han propuesto la inclusión de algunos más, dentro de los cuales por su importancia biotecnológica encontramos al género *Lactococcus* (Drider *et al.*, 2017; Madigan *et al.*, 2017; Quinto *et al.*, 2014).

El género *Lactococcus* se incluye dentro del filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* familia *Streptococcaceae* y se compone de bacterias de morfología cocoide (Figura 12), Gram positivas, catalasas negativas, no esporuladas, microaerófilas y mesófilas. El género está representado por las especies *Lactococcus lactis* (*L. lactis*), *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum* y *L. raffinolactis*, de entre los cuales la especie más representativa es *L. lactis* ya que es la especie que más información se ha recopilado tanto a nivel fenotípico como en su caracterización molecular y genética. Esta especie a su vez se compone de tres subespecies: *lactis*, *hordniae* y *cremoris*, siendo esta última utilizada con fines biotecnológicos como la producción de proteínas heterólogas con fines terapéuticos (Drider *et al.*, 2017; Madigan *et al.*, 2017; Quinto *et al.*, 2014).

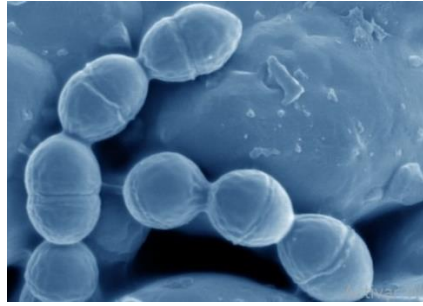


Figura 12. *Lactococcus lactis*.

Como beneficio adicional muchas BAL son consideradas por la Organización para la Alimentación y la Agricultura y la FDA como seguras para su uso en los alimentos (Generally Recognized As Safe GRAS) ya que carecen de factores de virulencia, además de que los péptidos antimicrobianos producidos por ellos se descomponen fácilmente por las proteasas digestivas sin afectar la microbiota intestinal (Drider *et al.*, 2017; Madigan *et al.*, 2017; Quinto *et al.*, 2014).

1.2.2 Expresión de proteínas recombinantes en BAL

Actualmente existen diversos reportes sobre el uso de Lactobacterias como biorreactores para la expresión de moléculas terapéuticas, algunos de estos ejemplos son su aplicación como biovacunas al expresar antígenos de diversos microorganismos patógenos, producción de interleucinas para el tratamiento del cáncer cervicouterino y de la enfermedad de Crohn. Lo anterior con la ventaja de poder ser administrada por vía oral y por consecuencia el contacto directo de la molécula de interés con la superficie gastrointestinal, esto último es gracias a que las BAL son microorganismos no patógenos que cuentan con un perfil de seguridad extraordinario, ya que han sido ampliamente consumidas por humanos durante siglos en alimentos fermentados sin causar efectos secundarios indeseados. En conjunto con lo anteriormente mencionado se agrega su capacidad para resistir la acción de los ácidos gástricos y sales biliares para llegar viables en cantidades suficientes al intestino, además de su carencia de exotoxinas y de su capacidad de ser toleradas por el sistema inmunitario del organismo huésped, estas características colocan a las BAL como una alternativa atractiva a

patógenos atenuados utilizados como vehículos vivos para la entrega de moléculas terapéuticas tales como algunas cepas derivadas de *Mycobacterium*, *Salmonella*, y *Bordetella*, ya que estos pueden recuperar su potencial patógeno y por lo tanto no son seguras para su uso en humanos (Cano *et al.*, 2015; Charalampopoulos *et al.*, 2009; D'Souza *et al.*, 2012).

L. lactis es una BAL de grado alimenticio ampliamente utilizada en la producción de alimentos fermentados que desde los años noventa, se comenzó a estudiar la posibilidad de emplear este microorganismo como una maquinaria celular para la producción y secreción de proteínas recombinantes. Hasta el día de hoy se han desarrollado un gran número de sistemas de expresión génica que permiten el uso de *L. lactis* como una herramienta celular eficiente, el diseño de estos sistemas ha sido posible gracias a los estudios enfocados en los elementos de regulación de la expresión de genes, como promotores, inductores y represores (Cano *et al.*, 2015; Charalampopoulos *et al.*, 2009; D'Souza *et al.*, 2012).

Además, existen numerosos reportes los cuales indican que *L. lactis* secreta pocas proteínas al medio externo, y ellas solo la proteína USP45, es secretada en cantidades detectables. Otra ventaja es que la cepa más comúnmente utilizada en el laboratorio (*Lactococcus lactis subsp cremoris* MG1363) no contiene ningún plásmido endógeno y no produce proteasas extracelulares, además de que su genoma ha sido completamente secuenciado y publicado. Finalmente, la capacidad de *L. lactis* para producir proteínas con diferentes intereses para su posible aplicación en la medicina experimental ha sido demostrada ampliamente. En conclusión, por las características antes mencionadas se justifica por qué la mayoría de los estudios que han utilizado las BAL como vehículos terapéuticos han elegido *L. lactis*, ubicando a este microorganismo como el candidato ideal para su empleo en investigación como vehículo de transporte de moléculas de interés en el sistema gastrointestinal (SGI) (Cano *et al.*, 2015; Charalampopoulos *et al.*, 2009; D'Souza *et al.*, 2012).

1.3 Antecedentes

Los efectos de las incretinas no son una novedad, su estudio comenzó a principios del siglo XX cuando Bayliss y Starling publicaron en 1902 el artículo titulado “El mecanismo de la secreción pancreática”, en el cual reportaron que la infusión ácida dentro del tubo digestivo era capaz de inducir la secreción del páncreas a través de una “sustancia” secretada por el intestino. Posteriormente La Barre en 1932 fue el primero que utilizó el término “incretina” (acrónimo de INtestinal seCRETion of INSulin) posterior a inyectar en animales de experimentación un extracto obtenido a partir de mucosa del SGI, el cual ocasionó hipoglicemia en los grupos experimentales. Posteriormente en 1964 gracias al avance de las investigaciones en diabetes se terminó por comprender la fisiología y las moléculas relacionadas en los eventos anteriormente descritos por lo que se logró acuñar el término “efecto incretina” a los eventos desencadenados a consecuencia de la liberación de GLP-1 por el intestino y su acción en los tejidos diana desencadenados por esta proteína, finalmente en 1986 se demostró la alteración de este fenómeno en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) (Aylwin, 2012; Reyes *et al.*, 2015).

A la par de las investigaciones a lo largo del tiempo para comprender la fisiopatología de la diabetes, su tratamiento también ha ido cambiando constantemente, en la actualidad se cuenta con distintos fármacos para su uso en pacientes con esta enfermedad dentro de los cuales se encuentran los análogos del GLP-1 tales como: Exenatida, Liraglutida, Dulaglutida, etc., estos fármacos entraron en el mercado con la aprobación del primero por parte de la FDA en 2005, además de que actualmente se encuentran más moléculas en estudios de fase 3. La modificación estructural de estos fármacos a partir del polipéptido natural exedin-4 aislado de la saliva del monstruo de Gila (*Heleoderma suspectum*) ha permitido aumentar su potencia, su vida media, así como su efecto hipoglucemiante, pero también ha conducido a la aparición de efectos adversos como náuseas, vómito, diarrea y reacciones de hipersensibilidad por lo que se han buscado nuevas alternativas tomando en cuenta la estructura del GLP-1 logrando desarrollar la Liraglutida, Albiglutida

y Dulaglutida, cada una con distinta potencia y vida media, y al menos en teoría una menor probabilidad de desencadenar reacciones de hipersensibilidad debido a una homología superior al 90 % con el GLP - 1 (Nielsen *et al.*, 2004; Tasyurek *et al.*, 2014).

Actualmente existen diversos biofármacos entre los que se encuentran la insulina, la hormona del crecimiento y la eritropoyetina los cuales son producidos comúnmente en microorganismos como *Escherichia coli* (*E. coli*) o en algunas levaduras como *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*. Una alternativa a estos organismos es la bacteria *L. lactis* en la cual se han desarrollado eficientes herramientas genéticas para la producción de proteínas recombinantes como la desarrollada por Benbouziane *et al.* en la cual amplificaron el promotor GroESL (pGroESL) del cromosoma de *L. lactis* para posteriormente ligarlo con un plásmido previamente construido, el vector obtenido tras la ligación denominado pLB333 se utilizó para transformar una cepa de *L. lactis*, con lo anterior al exponer a la bacteria bajo condiciones de estrés ocurre una inducción del pGroESL conduciendo a la expresión de la proteína de interés que contenga el plásmido. El empleo de *L. lactis* para la expresión de GLP-1 quedó demostrado en el trabajo desarrollado por Agarwal *et al.* en este proyecto se diseñó un método para la administración oral de GLP-1 utilizando *L. lactis*, para esto tomaron en cuenta que existían antecedentes de que los probióticos administrados vía oral podían sobrevivir en el SGI y además supusieron que si se encontraba una gran cantidad de proteína presente en el epitelio intestinal, éstas podían ser absorbidas a través de él, por lo que transformaron la bacteria con un plásmido que transportaba el gen GLP-1 para posteriormente seleccionar a las bacterias recombinantes. Después llevaron a cabo ensayos celulares primero para demostrar el efecto insulínico del GLP-1 y posteriormente para simular el paso de la molécula a través del intestino, una vez llevado a cabo lo anterior se administró la bacteria a ratas vía oral a las cuales previamente se les indujo DM 2, observando que los niveles plasmáticos de glucosa descendieron en las ratas tratadas con respecto al grupo control (Agarwal *et al.*, 2014; Benbouziane *et al.*, 2013).

Lo anterior abre las puertas para desarrollar una modificación estructural del GLP-1 que además tenga la posibilidad de ser administrado por vía oral, esto puede ser desarrollado con ayuda de la bioinformática y la química computacional para buscar una aproximación estructural que mejore la actividad farmacológica sin perder su efecto biológico.

1.4 Hipótesis y Objetivos

- Hipótesis

Lactococcus lactis expresará un análogo de GLP-1 recombinante, el cual tendrá una actividad hipoglucemiante *in vivo* más efectiva que su contraparte comercial Liraglutida.

- Objetivos

- Objetivo general

Desarrollar mediante bioinformática y técnicas de biología molecular un análogo de GLP-1 recombinante, expresarlo en *Lactococcus lactis* y posteriormente realizar su evaluación biológica en un modelo murino.

- Objetivos específicos

1. Diseñar mediante bioinformática la unidad de transcripción sintética pGroESL/Usp45-GLP-1/ter.
2. Construir un plásmido recombinante para expresión de GLP-1 en *Lactococcus lactis*.
3. Transformar a *Lactococcus lactis* con el plásmido recombinante.
4. Evaluar la expresión de GLP-1 mediante electroforesis de proteínas.
5. Evaluar la actividad biológica hipoglucemiante en un modelo murino del GLP-1 recombinante.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1 Bioinformática

2.1.1 Diseño bioinformático de la unidad de transcripción sintética pGroESL/Usp45-GLP-1R/ter

Se realizó una búsqueda en la base de datos del centro nacional para la información biotecnológica (National Center for Biotechnology Information, *NCBI*) de la cual se obtuvo la secuencia de nucleótidos del gen Usp45 (Reference Sequence: M60178.1) de ella se seleccionó la secuencia que codifica el péptido señal Usp45 para utilizarlo como acarreador hacia el medio extracelular de nuestra proteína recombinante. Esta secuencia ya cuenta con el codón ATG en su extremo 5´ para poder iniciar la traducción.

Se obtuvo la secuencia de nucleótidos del gen glucagón (Reference Sequence: NM_002054.4) de ella se seleccionó la secuencia que codifica el péptido GLP-1, en la cual se sustituyó el segundo codón GCT (alanina) por GGG (glicina) para obtener el péptido similar al glucagón-1 recombinante (Glucagon Like Peptide-1 recombinant, GLP-1R), además se agregó en el extremo 3´ de la secuencia de nucleótidos el codón TGA indispensable para finalizar la traducción.

Ambas secuencias de nucleótidos (Usp45 y GLP-1R) fueron traducidas con la herramienta informática SerialCloner a su secuencia de aminoácidos, lo anterior permitió realizar un alineamiento local comparativo con la base de datos Universal Protein (UniProt) tanto del péptido señal Usp45 (Reference Sequence: P22865) como del péptido GLP-1R (Reference Sequence: P01275), asegurando la fidelidad de traducción de nuestras proteínas de interés. Posteriormente se realizó la fusión de ambas secuencias de nucleótidos para formar el gen Usp45-GLP-1R del cual se comprobó el marco abierto de lectura utilizando la herramienta informática ExPASy translate tool para valorar la traducción *in silico* por parte de la bacteria.

Se realizó la predicción del procesamiento de la proteína Usp45-GLP-1R a nivel de la membrana celular utilizando la herramienta informática SignalP, esto con la finalidad de valorar la secreción extracelular de nuestra proteína, en la cual se observó la necesidad de agregar un codón extra GAC (aspartato) al inicio de la secuencia de nucleótidos del GLP-1R.

Se tomó la secuencia de nucleótidos del pGroESL y del terminador de la transcripción (ter) del plásmido pLB333 (Figura 13), lo anterior con la finalidad de fusionarlas con el gen Usp45-GLP-1R y así obtener la Unidad de Transcripción Sintética pGroESL/Usp45-GLP-1R/ter (UTS), a la UTS se le agregaron los sitios de restricción BamHI en el extremo 5' y XbaI en extremo 3' los cuales se utilizaron durante la etapa de clonación molecular.

Se envió a sintetizar la UTS a la compañía General Biosystems, a la cual se le solicito una optimización de codones para *L. lactis* solamente de la región del gen Usp45-GLP-1R de la UTS. Por último, una vez recibida la versión *in silico* la cual fue proporcionada por la compañía General Biosystems se volvió a verificar todos los pasos anteriormente mencionados para asegurar la correcta expresión de las proteínas de interés.

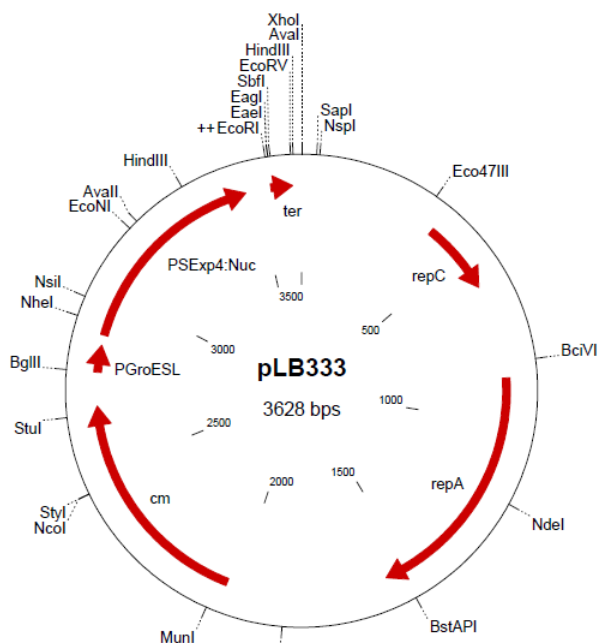


Figura 13. Anatomía molecular del plásmido pLB333.

2.1.2 Diseño de primers

Una vez construida la UTS fue posible diseñar los primers para su posterior amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction PCR) durante la etapa de clonación molecular, para esto se utilizaron las herramientas informáticas OligoAnalyzer y SnapGene.

Debido a que el diseño de los primers es la parte más importante para el ensayo de la PCR, se debieron tomar en cuenta distintas características para lograr una adecuada amplificación de la región de interés ya que el conocimiento óptimo de ellas ofrece la oportunidad de evitar en mayor medida la aparición de bandas extras debido a la formación de dímeros o a la unión de los primers a otras regiones que no son de interés. Por lo anterior, se eligió una longitud de los primers entre 18 - 30 pares de bases (pb), un contenido de GC entre 40 - 60 %, se mantuvieron los valores de la temperatura de alineamiento (*Melting Temperature* T_m) ± 5 °C muy próximos entre ambos primers y dentro del rango de temperatura 50 - 80 °C, además se evitó la repetición de timina en el extremo -3', así como en este mismo extremo se finalizó la secuencia del primer con G o C, o CG o GC pero no más de 3 de estos nucleótidos de manera consecutiva y finalmente se mantuvo un valor de ΔG por debajo de las -9 kilocalorías/mol (kcal/mol) en Hairpin, Self-Dimer y Hetero-Dimer. Finalmente, una vez obtenidos los primers se realizó una PCR *in silico* para corroborar su correcto diseño.

2.2 Manipulación de *Lactococcus lactis*

2.2.1 Cepa, plásmido, medios de cultivo y antibiótico

La bacteria utilizada en este trabajo fue *Lactococcus lactis subespecie cremoris* MG1363, la cual es una cepa silvestre libre de plásmidos. Así mismo se utilizó el plásmido pNZ124 (Figura 14), el cual tiene un peso molecular de 2828 pb, dentro de su anatomía molecular este plásmido cuenta con un sitio de clonación múltiple el cual es manipulado en los pasos de la clonación molecular del presente trabajo, los genes repA y repC los cuales le permiten

su replicación tanto en *E.coli* como en las distintas especies de bacterias ácido lácticas, además de portar un gen de resistencia al cloranfenicol (Cm), este último es utilizado como marcador de selección. La bacteria se inoculó en medio de cultivo (MC) M17 suplementado con Glucosa al 1 % (G-M17) a 30 °C sin agitación, se sembró la bacteria en placas de Petri, el MC fue suplementado con Agar (G-M17A). Así mismo para preparar las bacterias electrocompetentes se utilizó el MC G-M17, el cual fue suplementado con Sacarosa 0.5 Molar (M) y Glicina 2.5 % obteniendo el MC (G-SGliM17). Para preparar el MC de recuperación utilizado posterior a la electroporación se utilizó el MC G-M17, el cual fue suplementado con 20 milimolar (mM) cloruro de magnesio (MgCl₂) + 2 mM Cloruro de Calcio (CaCl₂) obteniendo el MC (G-M17/MgCl₂ + CaCl₂). Por último, las cepas portadoras de plásmidos con el gen Cm fueron inoculadas y/o sembradas en MC G-M17 con el antibiótico Cloranfenicol en una concentración de 10 microgramos/mililitro (µg/ml), obteniendo los medios (G-CIM17 o G-CIM17A) respectivamente.

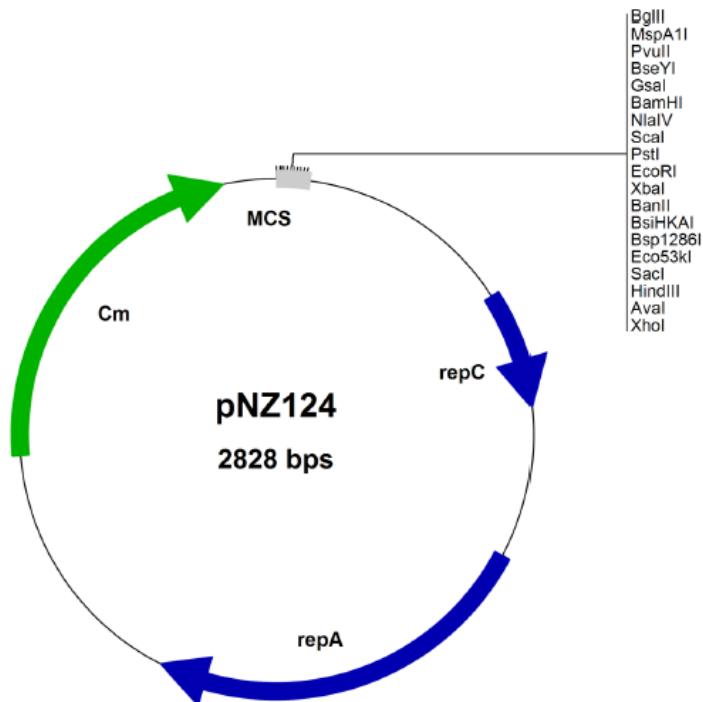


Figura 14. Anatomía molecular del plásmido pNZ124.

2.2.2 Reactivación de *L. lactis* cepa silvestre

Para la reactivación inicial de la bacteria se tomaron células por medio de raspado con asa estéril de un vial almacenado a - 80 °C y se inoculó en 5 ml de MC G-M17, el cual se incubó durante 12 horas a 30 °C sin agitación.

2.2.3 Preparación de criotubos para almacenamiento de *L. lactis* cepa silvestre libre de plásmidos.

Se tomaron 3 ml del MC mencionado en el apartado anterior al cual se le adicionó 1 ml de glicerol al 60 % estéril, se mezcló por pipeteo suave y posteriormente se tomaron alícuotas de 1 ml en criotubos de 1.5 ml los cuales se almacenaron a - 80 °C.

2.2.4 Preparación de *L. lactis* electrocompetente

Se inoculó 5 ml de MC G-SGLiM17 con células (*L. lactis* cepa silvestre) tomadas por medio de raspado con asa estéril de un vial almacenado a -80 °C, el cual se incubó durante 12 horas a 30 °C sin agitación. Se tomaron 500 microlitros (µl) del MC y se inoculó en 50 ml de MC G-SGLiM17 fresco (dilución 1:100) y se incubó bajo las mismas condiciones. Se vertieron los 50 ml del MC en 400 ml de MC G-SGM17 fresco y se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0.2 - 0.3 a 600 nanómetros (nm), una vez alcanzada la D.O. se repartió el MC en 9 tubos falcón de 50 ml y se centrifugaron las células durante 20 minutos a 5500 revoluciones por minuto (rpm) a 4 °C, se decantó el medio y el pellet celular se resuspendió y lavó con una solución de 0.5 M sacarosa + glicerol 10 % a 4 °C, se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones, se decantó la solución y el pellet celular se resuspendió y lavó con una solución de 0.5 M sacarosa + glicerol 10 % + 50 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a 4 °C, se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones, se decantó la solución y el pellet celular se resuspendió y lavó con una solución de 0.5 M sacarosa + 10 % glicerol a 4 °C, se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones, para finalizar se eliminó la solución

de lavado y se resuspendieron las células en 1 ml de polietilenglicol 3000 y posteriormente se tomaron alícuotas de 100 µl en tubos eppendorf de 1.5 ml los cuales se almacenaron a - 80 °C.

2.2.5 Transformación de *L. lactis* electrocompetente con el plásmido pNZ124

Se mezcló 100 µl de bacterias electrocompetentes y 1 µl del plásmido pNZ124 y se colocó en una cubeta de electroporación de 0.2 centímetros (cm) Bio-Rad® la cual se expuso a un pulso eléctrico bajo las siguientes condiciones: 2000 voltios (V), 25 microfaradios (µF), 200 ohms (Ω) en un electroporador Eppendorf Eporator®. Inmediatamente después de la descarga eléctrica se adicionó 1 ml de MC G-M17/MgCl₂ + CaCl₂ y se incubó durante 1.5 horas a 30 °C sin agitación. Se sembró por extensión en placas con MC G-CIM17A y se incubó durante 48 horas a 30 °C. Se tomaron las colonias transformantes, se inocularon en MC G-CIM17 y se incubó durante 12 horas a 30 °C sin agitación.

2.2.6 Preparación de criotubos para almacenamiento de *L. lactis* cepa portadora del plásmido pNZ124

Se tomaron 3 ml del MC mencionado en el apartado anterior al cual se le adicionó 1 ml de glicerol al 60 % estéril, se mezcló por pipeteo suave y posteriormente se tomaron alícuotas de 1 ml en criotubos de 1.5 ml los cuales se almacenaron a - 80 °C.

2.3 Clonación molecular

2.3.1 Extracción del plásmido pNZ124

Para la reactivación inicial de las bacterias portadoras del plásmido pNZ124 se tomaron células por medio de raspado con asa estéril de un vial almacenado a - 80 °C y se inoculó en 5 ml de MC G-CIM17, el cual se incubó durante 12 horas a 30 °C sin agitación. Se tomaron 100 µl del MC y se inoculó

en 10 ml de MC G-CIM17 fresco, el cual se incubó durante 12 horas a 30 °C sin agitación. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugaron 2 ml del MC durante 15 minutos a 14000 rpm a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 200 µl de buffer TES/Lis (Tris-HCl 50 mM potencial hidrógeno (pH) 8.0, EDTA 1 mM pH 8, Sacarosa 25 %/Lisozima 10 miligramos (mg)/ml) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Se adicionó 200 µl de buffer de lisis (0.2 M NaOH, 1 % SDS) y se mezcló por inversión durante 5 minutos, se adicionó 200 µl de acetato de sodio 3 M (pH 4.8), se mezcló por inversión y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo de 2 ml al cual se le agregó ribonucleasa A (RNasa A) 10 mg/ml y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Se adicionó 1 volumen de PCI Fenol:Cloroformo:Alcohol-Isoamílico (PCI) 25:24:1 volumen/volumen (v/v), se mezcló por inversión y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 2 ml y se adicionó 1 volumen de Cloroformo:Alcohol-Isoamílico (CI) 24:1 v/v, se mezcló por inversión y se centrifugó bajo las mismas condiciones. El sobrenadante, se transfirió a un tubo nuevo de 2 ml y se agregó 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 más 1 volumen de isopropanol absoluto, se mezcló por inversión y se centrifugó durante 30 minutos a 14000 rpm a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se lavó el botón dos veces con 1 ml de etanol al 70 %, se secó a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 20 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8).

2.3.2 Caracterización del plásmido pNZ124

Se realizó un ensayo de restricción del plásmido pNZ124 con la enzima EcoRI, lo anterior con la finalidad de linealizarlo y poder comparar su peso molecular con un marcador de peso molecular de referencia. Para la realización del ensayo se adicionaron los reactivos de la tabla II en un tubo eppendorf de 1 ml el cual se incubó durante 1 hora. Transcurrido el tiempo se cargó la muestra en un gel de agarosa al 1 %, el cual se corrió a 120 V durante 45 minutos para posteriormente ser visualizada en un transiluminador ultravioleta (uv) Bio-rad®.

Tabla II. Ensayo de restricción del plásmido pNZ124 con la enzima EcoRI.

Plásmido pNZ124	2 μ l = 1 μ g
Buffer EcoRI 10x	2 μ l
Enzima EcoRI	1 μ l
Agua grado biología molecular	Aforar a 20 μ l

2.3.3 Digestión del plásmido pNZ124

Se realizó ensayo de doble restricción del plásmido pNZ124 con las enzimas BamHI y XhoI, lo anterior con la finalidad de liberar los sitios de restricción para su posterior ligación con la UTS. Para la realización del ensayo se adicionaron los reactivos de la tabla III en un tubo eppendorf de 1 ml el cual se incubó durante 1 hora. Transcurrido el tiempo se cargó la muestra en un gel de agarosa al 1 %, el cual se corrió a 120 V durante 45 minutos para posteriormente ser visualizada en un transiluminador uv Bio-rad® y cortar el fragmento que corresponde al plásmido pNZ124, para después purificarse con ayuda del kit Monarch® DNA Gel Extraction.

Tabla III. Ensayo de doble restricción del plásmido pNZ124 con las enzimas BamHI y XbaI.

Plásmido pNZ124	2 μ l = 1 μ g
Buffer E 10x	2 μ l
Enzima BamHI	1 μ l
Enzima XbaI	1 μ l
Agua grado biología molecular	Aforar a 20 μ l

2.3.4 Digestión de la UTS

Debido a dificultades para la replicación de la UTS en vectores desarrollados para *E.coli* la compañía General Biosystems envió esta última como un

producto de PCR en una cantidad ~ 5 µg, lo anterior imposibilitaba la obtención de más gen en caso de pérdida del producto antes mencionado, por lo cual se realizó un ensayo de doble restricción de la UTS con las enzimas BamHI y XhoI, lo anterior con la finalidad de liberar los sitios de restricción para su posterior ligación con el plásmido pNZ124. Para la realización del ensayo se adicionaron los reactivos de la tabla IV en un tubo eppendorf de 1 ml el cual se incubó durante 1 hora. Transcurrido el tiempo se utilizó el kit Monarch® PCR & DNA Cleanup, el cual permitió la limpieza del ácido desoxirribonucleico (ADN) de los componentes de la reacción, obteniendo un rendimiento de final de ~ 3 µg de ADN.

Tabla IV. Ensayo de doble restricción de la UTS con las enzimas BamHI y XbaI.

UTS	10 µl = ~ 5 µg
Buffer E 10x	2 µl
Enzima BamHI	1 µl
Enzima XbaI	1 µl
Agua grado biología molecular	Aforar a 20 µl

2.3.5 Ligación del pNZ124 con la UTS

Se realizó un ensayo de ligación del pNZ124 con la UTS, lo anterior con la finalidad de obtener un nuevo vector recombinante denominado plásmido Eiber Briones 001 (pEB001). Para la realización del ensayo se adicionaron los reactivos de la tabla V en un tubo eppendorf de 1 ml el cual se incubó durante 1 hora a 22 °C. Transcurrido el tiempo se utilizó el kit Monarch® PCR & DNA Cleanup, el cual permitió la limpieza del ADN de los componentes de la reacción.

Tabla V. Ensayo de ligación del plásmido pNZ124 con la UTS.

Plásmido pNZ124 linearizado	5 μ l = 100 nanogramos (ng)
UTS Relación molar 1:3	5 μ l = 30 ng
Buffer ligasa T4 DNA 10x	2 μ l
ligasa T4 DNA	1 μ l
Agua grado biología molecular	Aforar a 20 μ l

2.3.6 Transformación de *L. lactis* electrocompetente con el plásmido pEB001

Se mezcló 100 μ l de bacterias electrocompetentes y 1 μ l del plásmido pEB001 y se colocó en una cubeta de electroporación de 0.2 centímetros (cm) Bio-Rad® la cual se expuso aun pulso eléctrico bajo las siguientes condiciones: 2000 voltios (V), 25 microfaradios (μ F), 200 ohms (Ω) en un electroporador Eppendorf Eporator®. Inmediatamente después de la descarga eléctrica se adicionó 1 ml de MC G-M17/MgCl₂ + CaCl₂ y se incubó durante 1.5 horas a 30 °C sin agitación. Se sembró por extensión en placas con MC G-CIM17A y se incubó durante 48 horas a 30 °C. Se tomaron las colonias transformantes, se inocularon en MC G-CIM17 y se incubó durante 12 horas a 30 °C sin agitación.

2.3.7 Preparación de criotubos para almacenamiento de *L. lactis* cepa portadora del plásmido pEB001

Se tomaron 3 ml del MC mencionado en el apartado anterior al cual se le adicionó 1 ml de glicerol al 60 % estéril, se mezcló por pipeteo suave y posteriormente se tomaron alícuotas de 1 ml en criotubos de 1.5 ml los cuales se almacenaron a - 80 °C.

2.3.8 Extracción del plásmido pEB001

Para la reactivación inicial de las bacterias portadoras del plásmido pEB001 se tomaron células por medio de raspado con asa estéril de un vial almacenado a - 80 °C y se inoculó en 5 ml de MC G-CIM17, el cual se incubó durante 12 horas a 30 °C sin agitación. Se tomaron 100 µl del MC y se inoculó en 10 ml de MC G-CIM17 fresco, el cual se incubó durante 12 horas a 30 °C sin agitación. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugaron 2 ml del MC durante 15 minutos a 14000 rpm a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 200 µl de buffer TES/Lis (Tris-HCl 50 mM potencial hidrógeno (pH) 8.0, EDTA 1 mM pH 8, Sacarosa 25 %/Lisozima 10 miligramos (mg)/ml) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Se adicionó 200 µl de buffer de lisis (0.2 M NaOH, 1% SDS) y se mezcló por inversión durante 5 minutos, se adicionó 200 µl de acetato de sodio 3 M (pH 4.8), se mezcló por inversión y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo de 2 ml al cual se le agregó ribonucleasa A (RNasa A) 10 mg/ml y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Se adicionó 1 volumen de PCI Fenol:Cloroformo:Alcohol-Isoamílico (PCI) 25:24:1 volumen/volumen (v/v), se mezcló por inversión y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 2 ml y se adicionó 1 volumen de Cloroformo:Alcohol-Isoamílico (CI) 24:1 v/v, se mezcló por inversión y se centrifugó bajo las mismas condiciones. El sobrenadante, se transfirió a un tubo nuevo de 2 ml y se agregó 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 más 1 volumen de isopropanol absoluto, se mezcló por inversión y se centrifugó durante 30 minutos a 14000 rpm a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se lavó el botón dos veces con 1 ml de etanol al 70 %, se secó a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 20 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8).

2.3.9 Caracterización del plásmido pEB001

Se realizó un ensayo de restricción del plásmido pEB001 con la enzima EcoRI, lo anterior con la finalidad de linealizarlo y poder comparar su peso molecular con un marcador de peso molecular de referencia. Para la realización del

ensayo se adicionaron los reactivos de la tabla VI en un tubo eppendorf de 1 ml el cual se incubó durante 1 hora. Transcurrido el tiempo se cargó la muestra en un gel de agarosa al 1 %, el cual se corrió a 120 V durante 45 minutos para posteriormente ser visualizada en un transiluminador uv Bio-rad®.

Tabla VI. Ensayo de restricción del plásmido pEB001 con la enzima EcoRI.

Plásmido pEB001	2 μ l = 1 μ g
Buffer EcoRI 10x	2 μ l
Enzima EcoRI	1 μ l
Agua grado biología molecular	Aforar a 20 μ l

2.3.10 Digestión del pEB001

Se realizó ensayo de doble restricción del plásmido pEB001 con las enzimas BamHI y XhoI, lo anterior con la finalidad de liberar la UTS y comparar su peso molecular con un marcador de peso molecular de referencia. Para la realización del ensayo se adicionaron los reactivos de la tabla VII en un tubo eppendorf de 1 ml el cual se incubó durante 1 hora. Transcurrido el tiempo se cargó la muestra en un gel de agarosa al 2 %, el cual se corrió a 120 V durante 45 minutos para posteriormente ser visualizada en un transiluminador uv Bio-rad®.

Tabla VII. Ensayo de doble restricción del plásmido pEB001 con las enzimas BamHI y XbaI.

Plásmido pEB001	2 μ l = 1 μ g
Buffer E 10x	2 μ l
Enzima BamHI	1 μ l
Enzima XbaI	1 μ l
Agua grado biología molecular	Aforar a 20 μ l

2.3.11 PCR del plásmido pEB001

Se realizó una PCR del plásmido pEB001, lo anterior con la finalidad de amplificar la UTS y comparar su peso molecular con un marcador de peso molecular de referencia. Para la realización del ensayo se adicionaron los reactivos de la tabla VIII en un tubo para PCR de .2 ml, el cual se colocó en un termociclador de la compañía Applied Biosystems® bajo las condiciones de la tabla IX. Una vez finalizada la PCR, se cargó el producto de la amplificación en un gel de agarosa al 2 % y se corrió la muestra a 120 V durante 45 minutos para posteriormente ser visualizada en un transiluminador uv Bio-rad®.

Tabla VIII. Ensayo de PCR para la amplificación de la UTS.

Buffer Taq 10 X	5 µl
dNTP's Mix	10 µl = .02 micromolar (µM) de cada dNTP
Primer Forward	5 µl = 0.5 µM
Primer Reverse	5 µl = 0.5 µM
Vector	1 µl = 1 ng
Polimerasa Green Taq	1 µl
Agua grado biología molecular	Aforar a 50 µl

Tabla IX. Condiciones del ensayo de la PCR para la amplificación de la UTS.

	Ciclos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	3 minutos	94 °C
Desnaturalización	35	30 segundos	94 °C
Alineamiento		60 segundos	55 °C
Elongación		45 segundos	72 °C
Extensión	1	7 minutos	72 °C
Enfriamiento		indefinidamente	4 °C

2.4 Expresión de GLP-1R

2.4.1 Inducción del cultivo celular

Para la reactivación inicial de las bacterias portadoras del plásmido pEB001, se tomaron células por medio de raspado con asa estéril de un vial almacenado a - 80 °C y se inoculó en 10 ml de MC G-CIM17, el cual se incubó a 30 °C sin agitación hasta alcanzar una D.O. ~ 2.5 a 600 nm, se centrifugaron las células durante 20 minutos a 5500 rpm a 4 °C, se decantó el MC y el pellet celular se resuspendió y lavó con una solución de buffer de fosfatos y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones, repitiéndose el paso de centrifugado y lavado en una ocasión más, se decantó la solución y el pellet celular se resuspendió en 10 ml de MC G-CIM17 fresco, el cual se incubó a 30 °C sin agitación hasta alcanzar una D.O. ~ 0.5 - 0.6 a 600 nm, se agregó una solución de cloruro de sodio (NaCl) para obtener una concentración final de NaCl al 2.5 % en los 10 ml del medio G-CIM17 el cual se incubó durante una hora a 37 °C.

2.4.2 Precipitación de proteínas

Se centrifugaron 5 ml del MC durante 20 minutos a 5500 rpm a 4 °C, se tomó el sobrenadante y se agregó inhibidor de proteasas para posteriormente filtrar el MC a través de una membrana 0.22 micrometros (μm), se tomó 1.35 ml del MC filtrado y se agregó 150 μl de ácido tricloro acético, se mezcló por inversión y se incubó durante 10 minutos en hielo, se centrifugó durante 20 minutos a 5500 rpm a 4 °C, finalmente se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 50 μl de una solución 50 mM hidróxido de sodio (NaOH) más 50 μl de buffer de carga SDS-PAGE.

2.4.3 Electroforesis de proteínas

Para llevar a cabo la electroforesis de proteínas en primer lugar fue necesario preparar un gel de poliacrilamida, por lo que se inició mezclando los reactivos de la solución separadora y posteriormente los reactivos de la solución

concentradora, los cuales fueron vertidos en una unidad conformada por dos espejos de la compañía Bio-Rad®. Una vez polimerizado el gel se colocó esta unidad dentro del tanque de la cámara de electroforesis para posteriormente ser llenada con buffer de corrida, se cargó en los carriles del gel el marcador de peso molecular de proteínas y posteriormente las muestras (GLP-1R), se corrió el gel a 150 V hasta que el marcador de peso molecular llegara al fondo del gel. Una vez concluida la electroforesis se sacó el gel y se lavó con agua desionizada para posteriormente incubarlo en una solución fijadora de glutaraldehído al 5 % durante 1 hora, se lavó el gel con agua desionizada para posteriormente incubarlo en una solución teñidora de ácido acético al 10 % con 0.030 gramos (g) azul de coomasie durante 1 hora, se lavó nuevamente el gel con agua desionizada y se incubó durante una hora en una solución desteñidora de ácido acético al 10 % (Tabla X).

Tabla X. Protocolo para la preparación de los geles de poliacrilamida.

Reactivos	Gel concentrador al 4 %	Gel resolvidor al 10 %
Acrilamida/bis-acrilamida 29:1 30 %	0.66 ml	3.33 ml
Buffer Tris 2.5 M pH 8.8	0.76 ml	5.6 ml
Agua desionizada	3.42 ml	0.90 ml
TEMED	5 µL	6 µL
APS 30 mg/ml	150 µL	150 µL
Volumen final	~ 5 ml	~ 10 ml

2.5 Evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R en ratones

2.5.1 Cuidado, manipulación y selección de ratones

Se emplearon ratones C57BL/6 obtenidos del bioterio ubicado en el laboratorio de ingeniería genética y genómica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Inicialmente se seleccionaron a las 8 semanas de vida 4 parejas de ratones compuestas por

un macho y una hembra, cada pareja se mantuvo en jaulas de plástico con tapa de acero inoxidable, con un lecho compuesto por viruta de madera, la cual se cambiaba cada 2 días. Se alimentaron en base a pellets comerciales y agua a libre demanda, y se mantuvieron a una temperatura entre 20 – 25 °C, aislados del ruido excesivo y expuestos a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno.

Una vez preñadas las hembras, se retiró el macho y se mantuvieron aisladas de manera individual bajo las condiciones previamente mencionadas. Después del nacimiento las crías se mantuvieron con la madre, alimentándose de leche materna durante cuatro semanas, cuantificándose su ganancia de peso cada semana. Cabe destacar que durante la cuarta semana de vida los ratones fueron capaces de ingerir alimento sólido y agua, por lo que se retiraron de la madre y se seleccionaron al azar solamente 9 ratones macho con un peso promedio $13 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$ para formar 3 grupos experimentales: el grupo A denominado grupo control negativo, el grupo B denominado grupo GLP-1R y el grupo C denominado grupo Liraglutida (control positivo), lo anterior para poder llevar a cabo el protocolo de diabetización y posteriormente la evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R.

2.5.2 Protocolo de diabetización

Una vez formados los grupos experimentales, se sometió a los ratones al protocolo de diabetización de 7 semanas de duración, el cual consistió en la suplementación de fructosa al 15 % en el agua de consumo, la suplementación de manteca de cerdo 35.5 % a la dieta estándar del ratón y a la administración de estreptozotocina en una dosis única de 100 mg/kilogramo (mg/kg) vía intraperitoneal en la 4 semana de protocolo. El último día de las semanas 5, 6 y 7 se realizaron glucometrías con la finalidad de confirmar la diabetización de los ratones tomando una muestra de sangre mediante un corte distal de la cola, cuantificándose en mg/decilitro (mg/dl) con un glucómetro comercial Accu-Chek®.

2.5.3 Evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R

El ensayo se llevó a cabo durante 9 días, en los primeros 8 días al grupo A y C se les administró ~1 ml de agua estéril mediante micropipeta, en cambio al grupo B se le administró ~1 ml 1×10^9 de unidades formadoras de colonias (UFC) de *L. Lactis* cepa portadora del plásmido pEB001.

Durante el día 9 se desarrolló el siguiente manejo:

- 1.- Se inició determinado los niveles de glucosa en sangre a los ratones de los 3 grupos (glicemia basal).
- 2.- Posteriormente se administró por vía oral mediante micropipeta a los ratones de los 3 grupos con ayuno de 8 horas una carga de ~1 ml de una solución glucosada al 20 %.
- 3.- Después al grupo A se le administró ~1 ml de agua estéril, al grupo B se le administro ~1 ml 1×10^9 de UFC de *L. Lactis* cepa portadora del plásmido pEB001 y finalmente al grupo C se administró Liraglutida en una concentración de 0.1 mg/kg de peso por vía subcutánea.
- 4.- Para finalizar se determinó la glucosa en sangre a los 30 minutos, 1 y 2 horas posterior a la ingesta de glucosa a los ratones de los 3 grupos (glicemia postcarga).

2.5.4 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores en el software Microsoft Excel versión 2019, con varias muestras por grupo tomándose el tiempo como factor 1 y los tratamientos como factor dos, respectivamente.

2.6 Disposición de los residuos generados

2.6.1 Disposición de residuos

Los residuos derivados de los métodos de experimentación se desecharon según las clasificaciones propuestas por la política de disposición de residuos de la Facultad de Ciencias Químicas y del National Institute for Agricultural Research.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Bioinformática

3.1.1 Diseño bioinformático de la unidad de transcripción sintética pGroESL/Usp45-GLP-1R/ter

Secuencia final *in silico* de la UTS pGroESL/Usp45-GLP-1R/ter una vez terminado el proceso diseño bioinformático, el cual evidenció una total de 380 pb (Figura 15).

```
5'GGATCCCTAAATGTTTTCTCTTGACTAAATCTGACCATTGAGATAAAATAA
GAATATGTTAGCACTCAACTATTAAGAGTGCTAAAAATAAAAAATGGAGGAA
AGTATATGAAAAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTAATGTCTACAGTGATACT
TTCTGCTGCAGCCCCGTTGTCAGGTGTTTACGCTGACCATGGGGAAGGGA
CCTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGGCCAAGCTGCCAAGGAAT
TCATTGCTTGGCTGGTCAAAGGCCGAGGATGAGCTGCAGGAATTCGCGG
CCGCCTGCAGGTCGACGGTATCGATAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTT
TTTGATATCAAGCTTATCGATACCTCTAGA3'
```

Sitios de restricción, Promotor GroESL, Gen Usp45-GLP-1R, Terminador.

Figura 15. Unidad de transcripción sintética pGroESL/Usp45-GLP-1R/ter.

Análisis bioinformático realizado mediante la herramienta SerialCloner, el cual evidenció una similitud del 100 % en el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Usp45 y GLP-1R (Figuras 16, 17, 18 y 19).

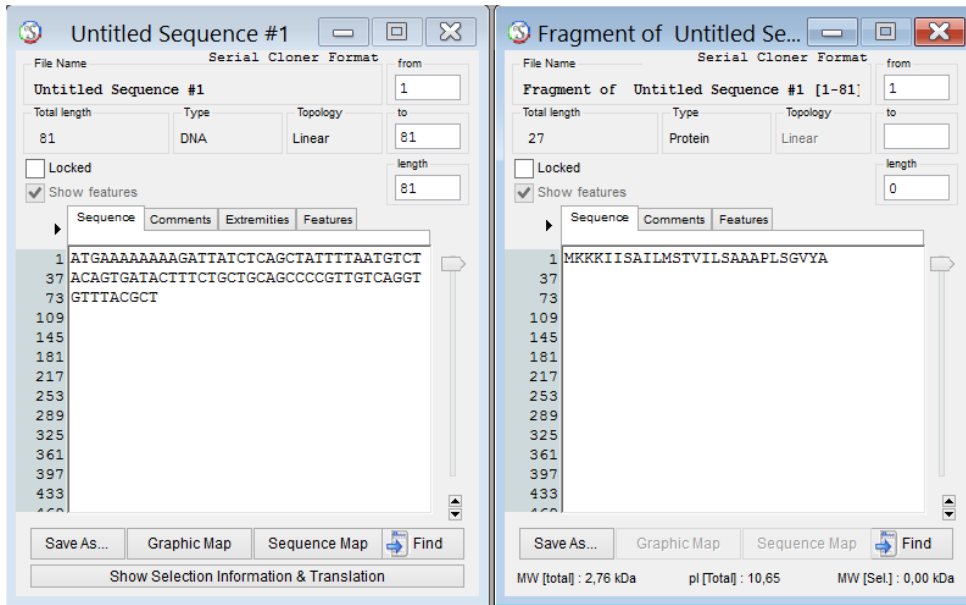


Figura 16. Traducción *in silico* de la secuencia de nucleótidos correspondiente al péptido señal Usp45 obtenida de la base de datos del NCBI.

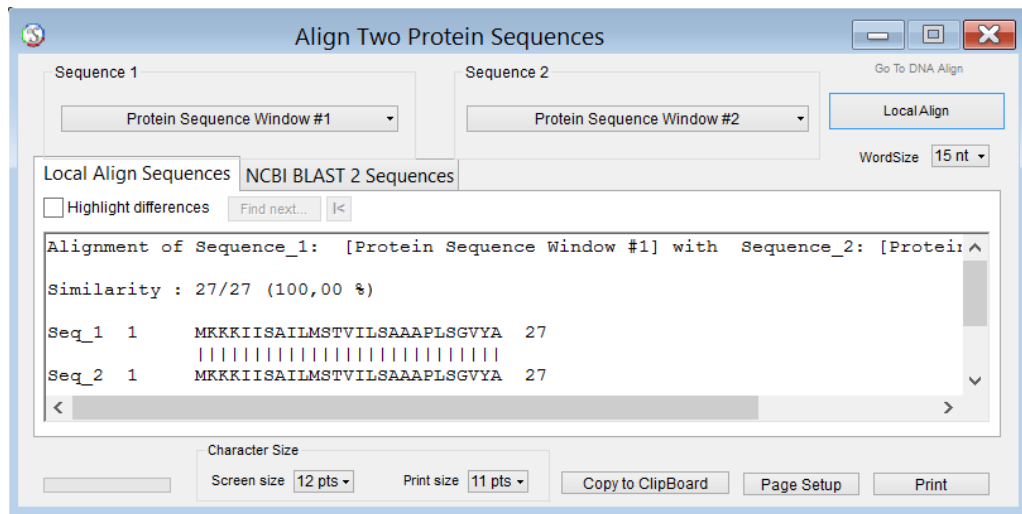


Figura 17. Alineamiento local de la secuencia de aminoácidos del péptido señal Usp45 obtenida por la traducción de los codones reportados en la base de datos del NCBI contra la secuencia de aminoácidos reportada en UniProt.

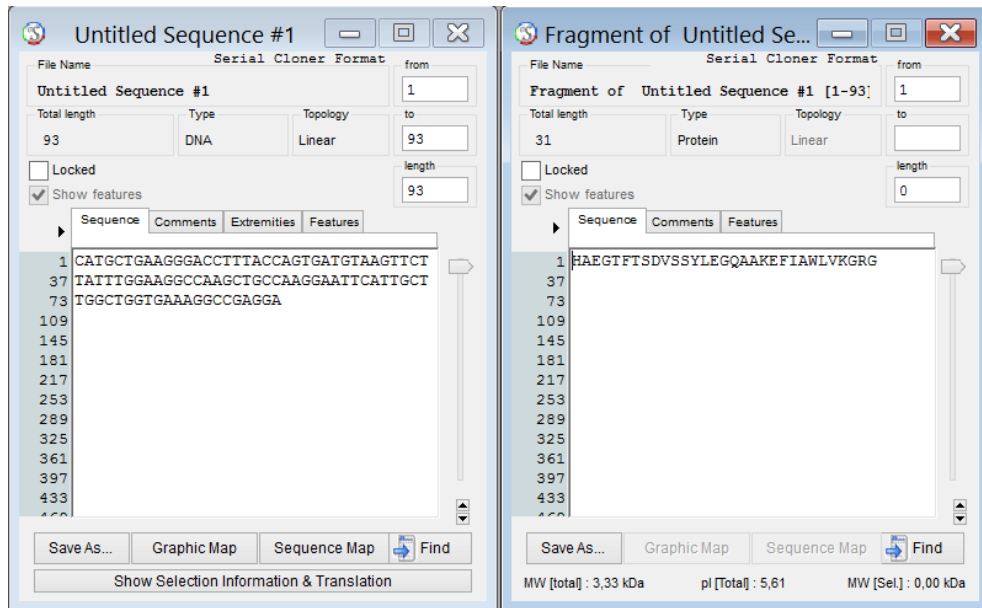


Figura 18. Traducción *in silico* de la secuencia de nucleótidos correspondiente al GLP-1R obtenida de la base de datos del NCBI.

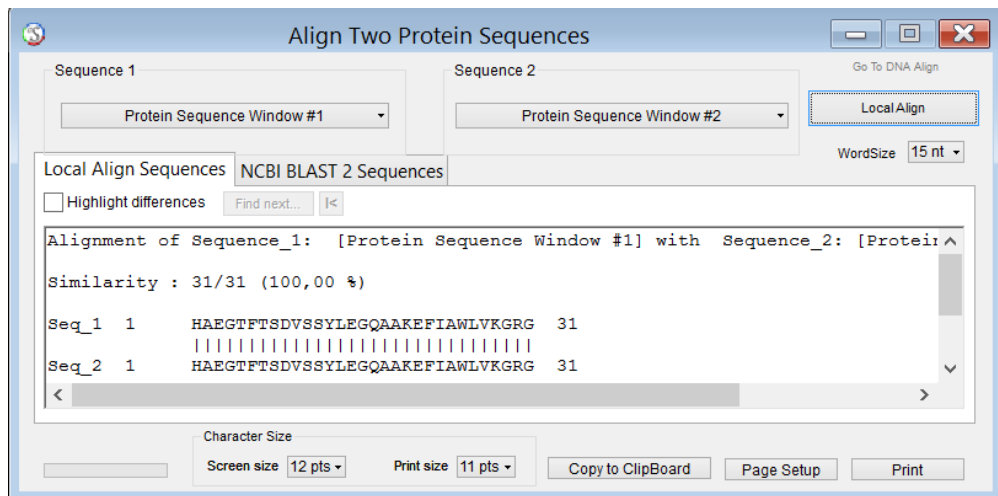


Figura 19. Alineamiento local de la secuencia de aminoácidos del GLP-1R obtenida por la traducción de los codones reportados en la base de datos del NCBI contra la secuencia de aminoácidos reportada en UniProt.

Análisis bioinformático realizado mediante la herramienta ExpASY translate tool, el cual evidenció la correcta traducción del marco abierto de lectura por parte de los ribosomas bacterianos, además se realizó un alineamiento local

con las secuencias de aminoácidos de las proteínas Usp45 y GLP-1R encontrando una similitud del 100 % (Figuras 20 y 21).

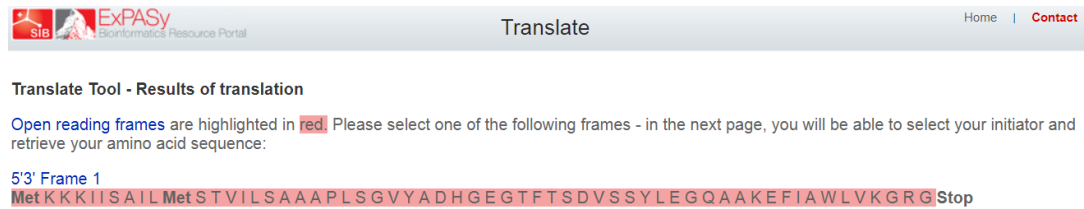


Figura 20. Traducción *in silico* del marco abierto de lectura.

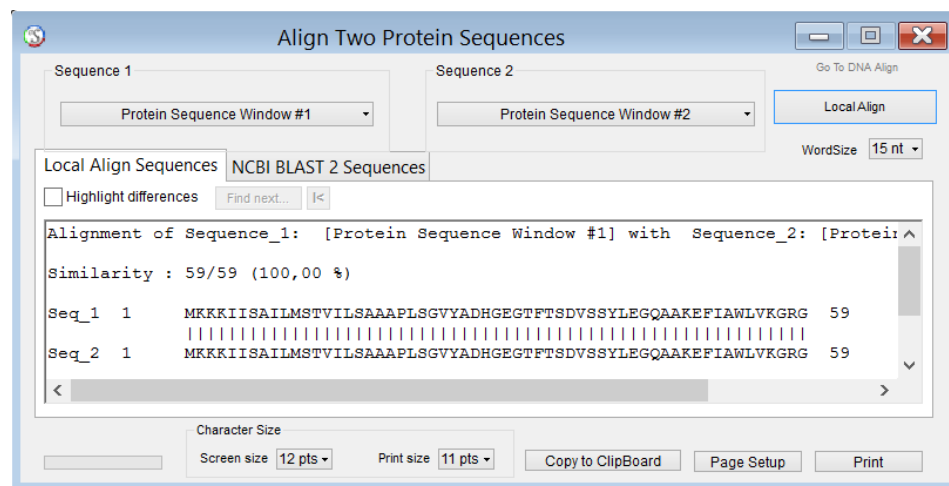


Figura 21. Alineamiento local que muestra la concordancia del 100% entre la secuencia de aminoácidos del programa ExPASy contra la reportada por la base de datos UniProt.

Análisis bioinformático realizado mediante la herramienta SignalP, el cual despliega una gráfica con el sitio más probable de corte de la enzima peptidasa del péptido señal tipo I (Signal Peptidase type I, SPase I). En el gráfico se evidencia el correcto procesamiento a nivel transmembranal de la proteína Usp45-GLP-1R permitiendo la liberación del GLP-1R hacia el medio extracelular (Figura 22).

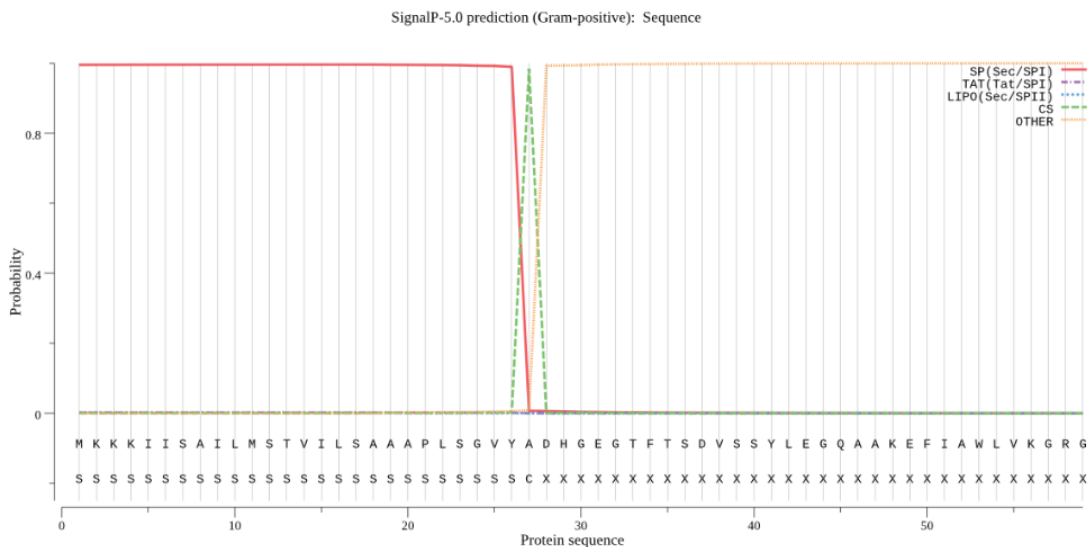


Figura 22. Gráfica de procesamiento transmembranal de la proteína Usp45-GLP-1R: se muestra el sitio más probable de corte por la SPase I (representado por la línea vertical roja), el cual se encuentra situado entre la posición 27 y 28 de la proteína (entre los aminoácidos VYA-DH).

3.1.2 Diseño de primers

Secuencias de primers obtenidas mediante la herramienta OligoAnalyzer, en la cual los valores de sus características de trabajo fueron ideales para su empleo en PCR, además se muestra el resultado de la PCR *in silico* de la UTS mediante herramienta SnapGene corroborando el correcto diseño, ya que se observó la amplificación de la región de interés (Figuras 23 y 24).

Forward	Reverse
5'-GGATCCCTAAATGTTTTCTCTTGAC-3'	5'-GCTCTCTAGAGGTATCGATAAGC-3'
Length: 25pb GC: 40 % Melt Temp: 61.4 °C	Length: 23pb GC: 47.8 % Melt Temp: 60.8 °C
Hairpin: ΔG 0.31 kcal/mole	Hairpin: ΔG -1.82 kcal/mole
Self-Dimer: ΔG -8.76 kcal/mole	Self-Dimer: ΔG -8.42 kcal/mole
Hetero-Dimer: ΔG -4.77 kcal/mole	Hetero-Dimer: ΔG -4.77 kcal/mole

Figura 23. Valores obtenidos del diseño de los primers a través en la herramienta informática OligoAnalyzer.

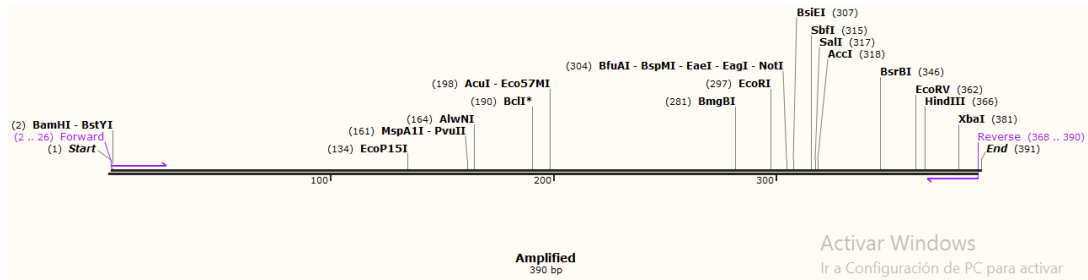


Figura 24. PCR *in silico* de la UTS utilizando la herramienta informática SnapGene.

3.2 Manipulación de *Lactococcus lactis*

3.2.1 Transformación de *L. lactis* electrocompetente con el plásmido pNZ124

Colonias obtenidas después de la reactivación, electrocompetencia y electroporación de *L. lactis* (Figura 25). Placas con MC G-CIM17A. A) Control negativo: no se observa crecimiento de colonias debido a la ausencia el plásmido pNZ124. B) Muestra experimental: se observa crecimiento de colonias debido a la presencia el plásmido pNZ124 el cual porta el gen Cm que le confiere a la bacteria la resistencia al antibiótico cloranfenicol.

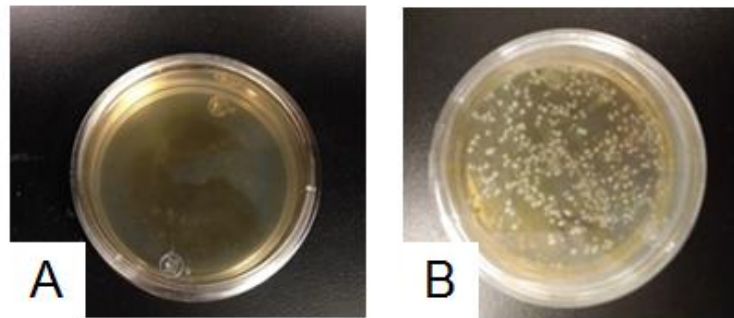


Figura 25. A) Control negativo B) Muestra experimental.

3.3 Clonación molecular

3.3.1 Caracterización del plásmido pNZ124

Gel de agarosa al 1 % (Figura 26) en el cual se observa: primer carril A) marcador de peso molecular y la flecha señalando la banda correspondiente a nivel de las 3000 pb. Segundo carril B) se observa una sola banda por debajo de las 3000 pb la cual corresponde al plásmido pNZ124 (2828 pb) digerido con la enzima EcoRI.

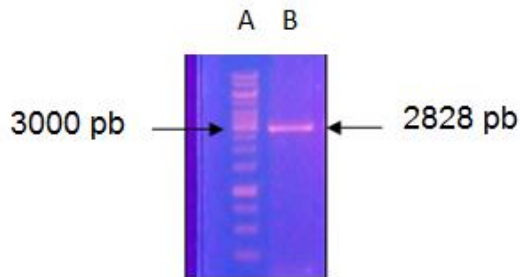


Figura 26. Gel de agarosa al 1 %: se observa la digestión del plásmido pNZ124 posterior a su digestión con EcoRI.

3.3.2 Ligación del plásmido pNZ124 con la UTS

Diseño informático del plásmido pEB001 (3184 pb) obtenido por la ligación del plásmido pNZ124 y de la UTS. En la imagen se observan los sitios de restricción manipulados durante la etapa de clonación molecular, la UTS, así como los elementos que componen el plásmido (Figura 27).

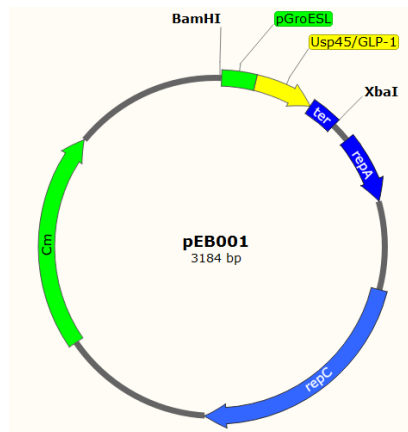


Figura 27. Anatomía molecular del plásmido pEB001.

3.3.3 Transformación de *L. lactis* con el plásmido pEB001

Colonias obtenidas después de la reactivación, electrocompetencia y electroporación de *L. lactis* (Figura 28). Placas con MC G-CIM17A. A) Control negativo: no se observa crecimiento de colonias debido a la ausencia el plásmido pEB001. B) Muestra experimental: se observa crecimiento de colonias debido a la presencia el plásmido pEB001 el cual porta el gen Cm que le confiere a la bacteria la resistencia al antibiótico cloranfenicol.

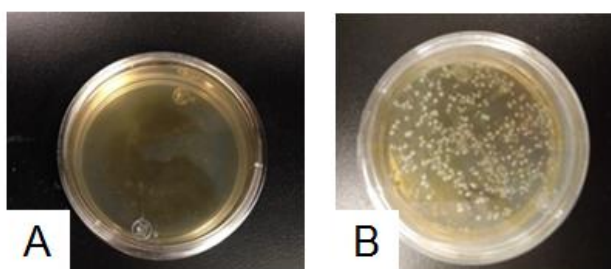


Figura 28. A) Control negativo B) Muestra experimental.

3.3.4 Caracterización del plásmido pEB001

Gel de agarosa al 1 % (Figura 29) en el cual se observa: primer carril A) marcador de peso molecular y la flecha señalando la banda correspondiente a las 3000 pb. Segundo carril B) se observa tres bandas de distintos pesos moleculares las cuales corresponden al plásmido pEB001 sin digerir el cual adopta diferentes formas topológicas y justifican los distintos pesos moleculares observados. Tercer carril C) se observa una sola banda por arriba de las 3000 pb la cual corresponde al plásmido pEB001 (3184 pb) digerido con la enzima EcoRI.

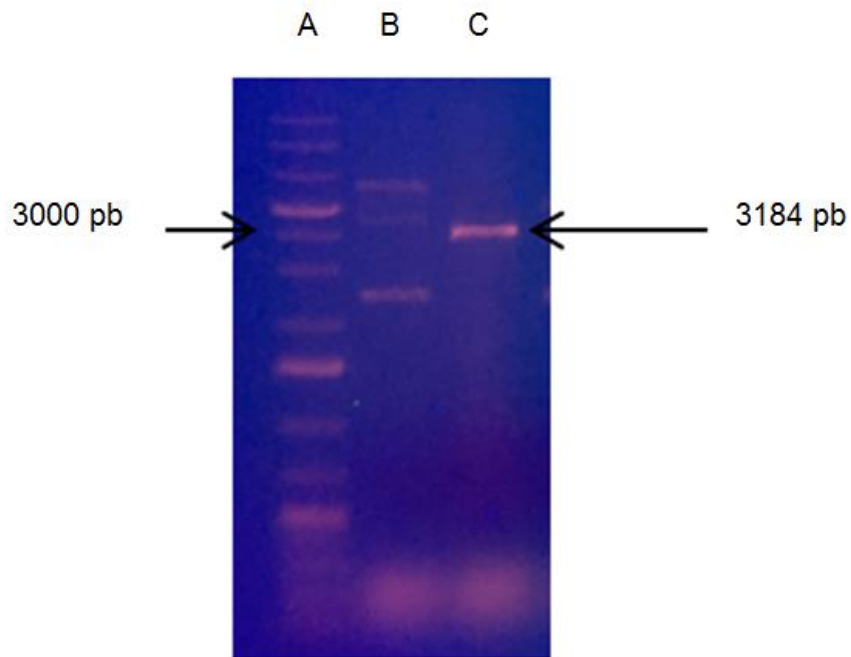


Figura 29. Gel de agarosa al 1 %: se observa la digestión del plásmido pEB001 posterior a su digestión con EcoRI.

3.3.5 Digestión del pEB001 con enzimas de restricción

Gel de agarosa al 2 % (Figura 30) en el cual se observa: primer carril A) el marcador de peso molecular y el recuadro señalando la banda correspondiente a las 400 pb. Segundo carril B) se observan dos bandas de distintos pesos moleculares la primera ubicada en la parte superior del gel que corresponde al plásmido pEB001 digerido con las enzimas BamHI y XbaI, y la segunda banda señalada en el recuadro muy próxima a las 400 pb que corresponde a la UTS (380 pb) resultado de la digestión, lo anterior nos confirma la ligación de la UTS con en el plásmido pEB001.

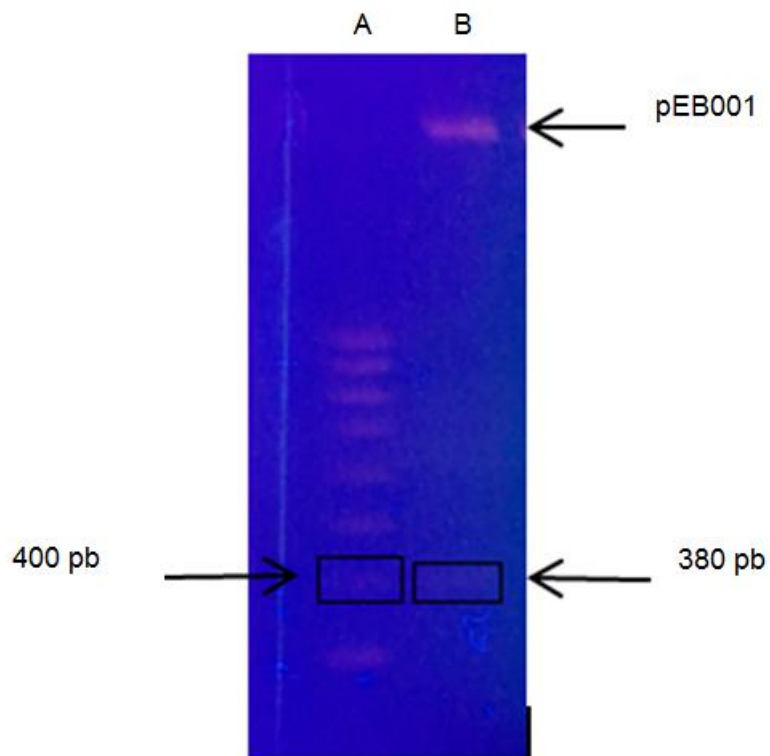


Figura 30. Gel de agarosa al 2 %: se observa la digestión del plásmido pEB001 posterior a su digestión con BamHI y XbaI.

3.3.6 PCR del plásmido pEB001

Gel de agarosa al 2 % (Figura 31) en el cual se observa: primer carril A) el marcador de peso molecular y la flecha señalando la banda correspondiente a las 400 pb. Segundo carril B) se observa una banda muy próxima a los 400 pb la cual corresponde al amplicón (UTS 380 pb) de la PCR. Tercer carril C) se utilizó como control negativo en el cual no se visualizó amplificación, lo cual era el resultado esperado. De esta manera se evidenció la presencia de la UTS en el plásmido pEB001 mediante otra herramienta de biología molecular.

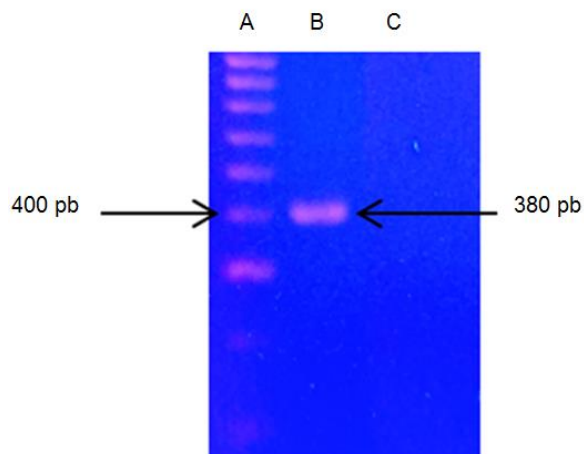


Figura 31. Gel de agarosa al 2 %: se observa el amplicón obtenido en la PCR del plásmido pEB001.

3.4 Expresión de GLP-1 recombinante

3.4.1 Electroforesis de proteínas

Gel de poliacrilamida (figura 32) en el cual se observa: primer carril A) el marcador de peso molecular en el cual se señala con dos flechas las bandas correspondientes a los 50 KDa y los 5 KDa. Segundo carril B) se observan dos bandas la primera muy próxima a los 50 KDa la cual corresponde a la proteína (Usp45) mayormente excretada por *L. lactis* y otra banda muy próxima a los 5 KDa la cual corresponde al GLP-1 recombinante (GLP-1R).

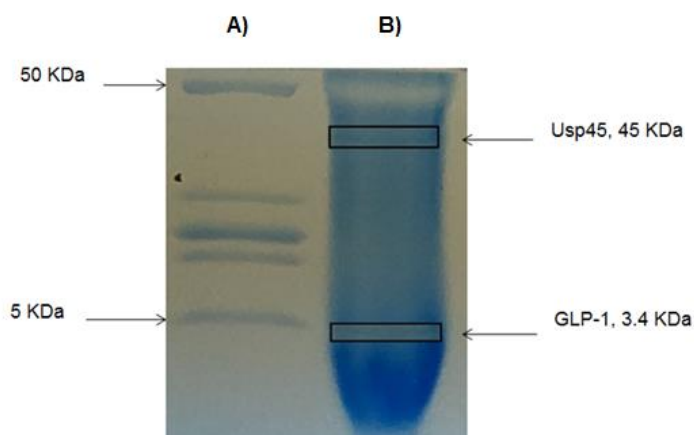


Figura 32. Gel de poliacrilamida: se observa la expresión del GLP-1R posterior a la inducción de estrés en el medio de cultivo.

3.5 Evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R en ratones

3.5.1 Cuidado, manipulación y selección de ratones

En la tabla XI se observa el aumento gradual de peso de los 14 ratones macho seleccionados durante su primer mes de vida. Once ratones llegaron al peso deseado sin embargo se seleccionaron nueve para el protocolo de diabetización, de los cuales se formaron 3 grupos experimentales conformados por 3 ratones cada uno (Tabla XII).

Tabla XI. Peso en gramos de los ratones durante un mes.

Semanas	Ratones													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	3,1	2,9	3,3	2,1	3	3,3	2,2	3,4	3,2	2,8	2,9	3,1	2,6	3,2
2	6,4	5,1	6,6	6,5	6,3	6,1	5,5	6,8	6,7	6,3	6,2	5,5	5,3	6,5
3	10,2	8,4	9,8	9,8	9,2	9,7	8,6	10,2	10,6	9,6	8,7	9,9	7,8	9,7
4	13,5	11,5	12,7	12,9	12,3	13,5	11,6	13,7	13,4	12,5	12,2	12,9	10,5	13,1

Tabla XII. Grupos y pesos en gramos de los ratones seleccionados para desarrollar el protocolo.

	Ratones								
	Grupo A			Grupo B			Grupo C		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Peso	12,3	13,5	12,9	13,1	12,7	13,7	13,5	12,2	12,5

3.5.2 Protocolo de diabetización

En la tabla XIII se observa el aumento gradual de la glucosa sanguínea de los 9 ratones durante las 7 semanas que fue realizado el protocolo de diabetización, en el cual todos los ratones alcanzaron una glicemia ≥ 200 mg/dl para ser considerados como diabéticos.

Tabla XIII. Glucemia en mg/dl de los ratones durante el protocolo de diabetización.

Semanas	Ratones								
	Grupo A			Grupo B			Grupo C		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	105	98	94	91	118	99	110	102	94
5	128	122	140	113	152	148	134	118	127
6	166	153	179	161	190	171	167	149	163
7	209	225	222	215	210	202	224	206	218

3.5.3 Evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R

Figura 33 la cual corresponde al grupo A (control negativo) se observa que los niveles de glucosa de los 3 ratones se mantienen > 250 mg/dl a las 2 horas del ensayo.

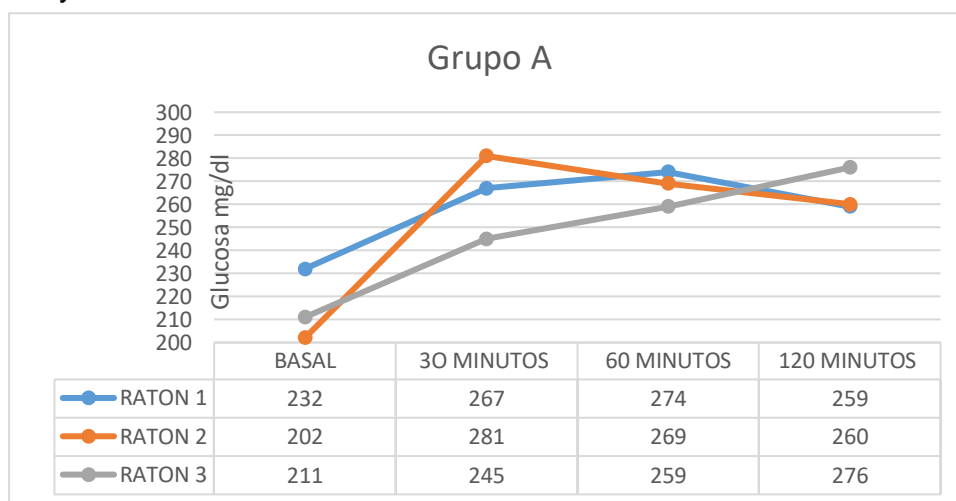


Figura 33. Glucemia en mg/dl de los ratones del grupo experimental A durante el ensayo de evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R.

Figura 34 la cual corresponde al grupo B (GLP-1R) se observa que los niveles de glucosa de los ratones 1 y 2 se mantienen > 280 mg/dl a las 2 horas, sin embargo, en el caso del ratón 3 los niveles se observan muy próximos a los 250 mg/dl en el mismo período de tiempo

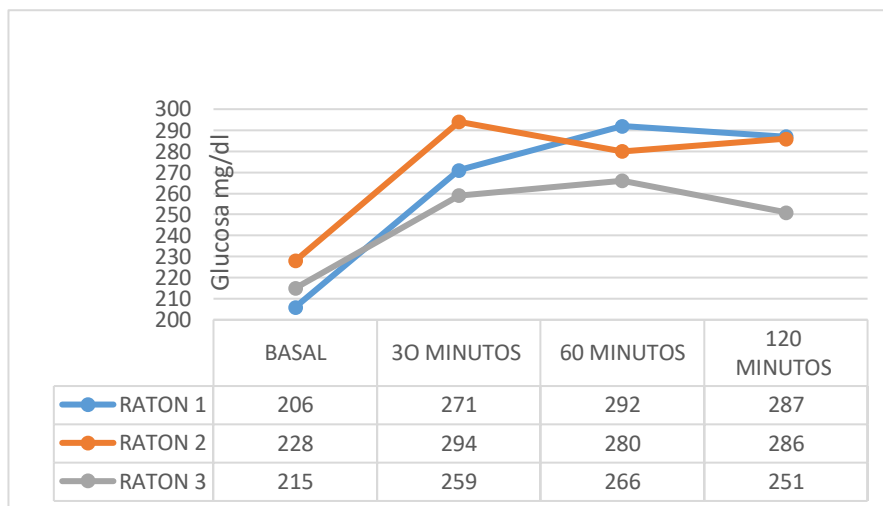


Figura 34. Glucemia en mg/dl de los ratones del grupo experimental B durante el ensayo de evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R.

Figura 35 la cual corresponde al grupo C (control positivo) se observa que los niveles de glucosa de los 3 ratones se mantienen ≤ 250 mg/dl, a las 2 horas del ensayo.

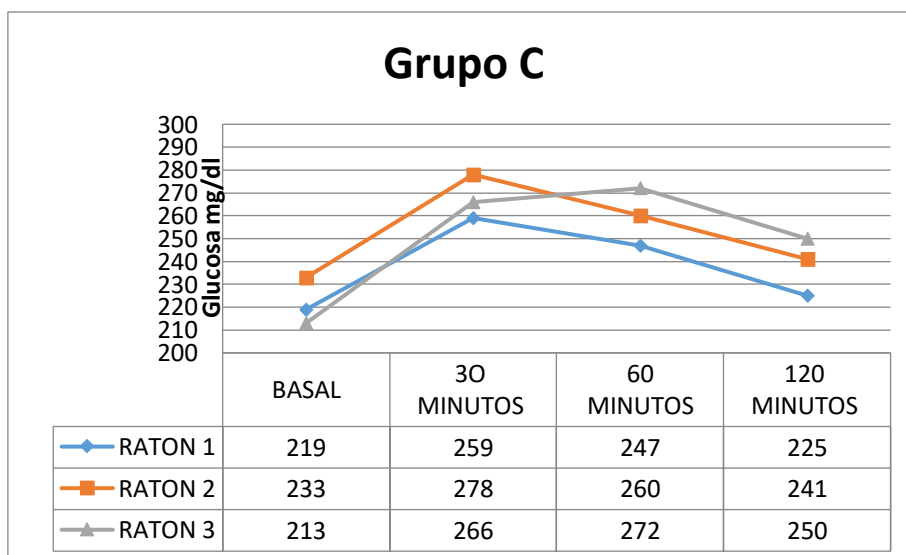


Figura 35. Glucemia en mg/dl de los ratones del grupo experimental C durante el ensayo de evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R.

Figura 36 Gráfica de barras en la cual se muestra el promedio y las desviaciones estándar de los tres grupos experimentales durante el ensayo.

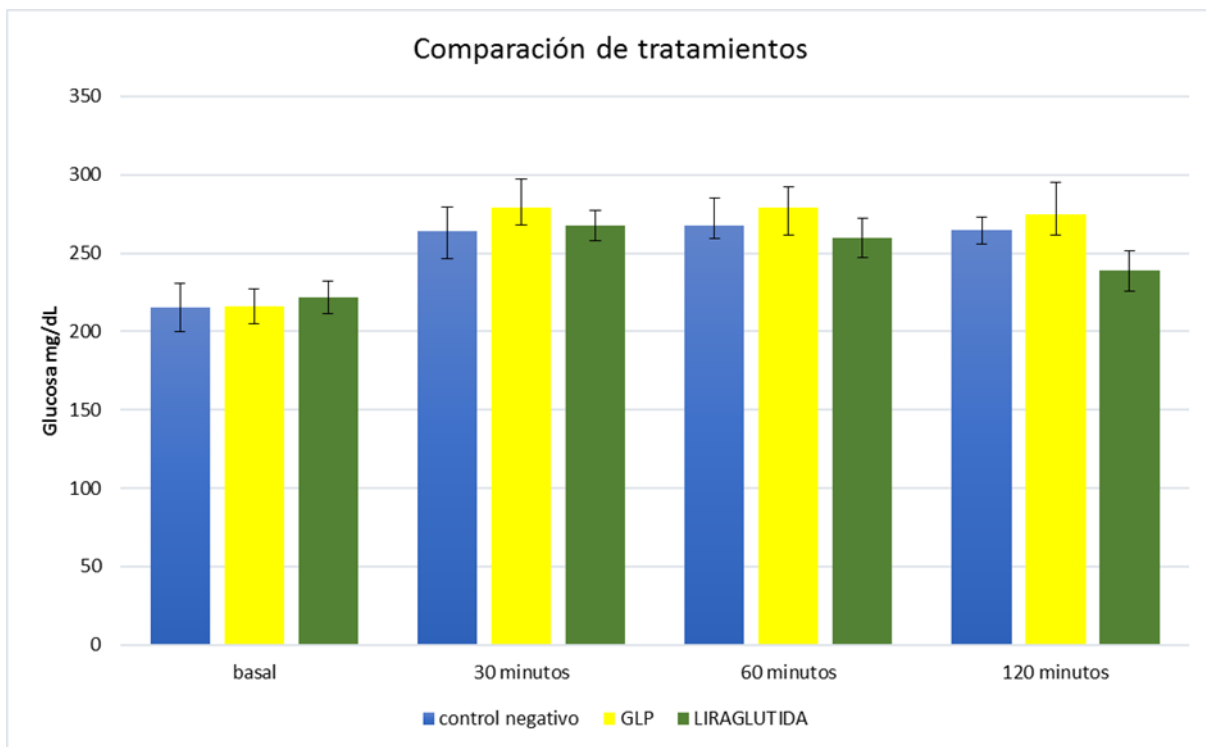


Figura 36. Glucemia en mg/dl durante el ensayo de evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R.

3.5.4 Análisis estadístico

Los resultados de las glucosas obtenidas de la evaluación de la actividad hipoglucemiante en un modelo murino se concentraron en la Tabla XIV. El resultado del Anova de dos factores se observa en la Tabla XV.

Tabla XIV. Glucemia en mg/dl de los ratones durante el ensayo de evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R en ratones

	TRATAMIENTOS		
	control negativo	GLP	LIRAGLUTIDA
Basal	232	206	219
	202	228	233
	211	215	213
30 minutos	267	271	259
	281	294	278
	245	259	266
60 minutos	274	292	247
	269	280	260
	259	266	272
120 minutos	259	287	225
	260	286	241
	276	251	250

Tabla XV. Análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Tratamientos	16104.97	3	5368.32	28.52541205	0.00000004387	3.00878657
Tiempo	1243.56	2	621.78	3.303911439	0.054018886	3.402826105
Interacción	1670.44	6	278.40	1.479360394	0.227360809	2.508188823
Dentro del grupo	4516.67	24	188.19			
Total	23535.64	35				

El valor de probabilidad para el tiempo y para la interacción es mayor a 0.05, por lo que no hay diferencia significativa. En cambio, para los tratamientos la probabilidad es menor a 0.05, por lo que hay diferencia significativa.

Debido a que el ANOVA arrojó que el origen de las variaciones son los tratamientos, se procedió a realizar una prueba de Tukey con la finalidad de identificar el tratamiento que está causando la variación. Los cálculos que fueron realizados de la prueba Tukey se muestran en la tabla XVI destacando que se obtuvo una diferencia honestamente significativa (honestly significant difference HSD) = 13.98, el cual fue comparado con las diferencias de las medias de los tratamientos (Tabla XIV). Mostrando que la diferencia se encuentra entre el tratamiento de liraglutida contra GLP-1R, destacando que las glucosas de los ratones disminuyeron más con el tratamiento de liraglutida.

Tabla. XVI Prueba Tukey

HDS=	13.9793662
Multiplicador=	3.53
Cuadrado del error medio (Mean Square Error mse) =	188.1944444
Tamaño de la muestra cada uno de los grupos (n) =	12

Tabla. XVII Diferencias entre las medias de los tratamientos

	CONTROL NEGATIVO	GLP	LIRAGLUTIDA
CONTROL NEGATIVO		-8.3	6
GLP	8.3		14.3
LIRAGLUTIDA	6	14.3	

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Bioinformática

El diseño bioinformático fue el centro medular del trabajo, ya que de este dependía la correcta expresión, transcripción, traducción y procesamiento a nivel transmembranal de la proteína Usp45-GLP-1R.

Uno de los principales retos fue encontrar un promotor que bajo las condiciones del SGI ocasionara la expresión de una proteína de interés. En *L. lactis* uno de los promotores más empleados es PnisA, para el cual es necesario la presencia de nisina en el medio para inducirlo, motivo por el cual no pudo ser aplicado en nuestro proyecto debido a que la administración de nuestra bacteria fue vía oral (Morello *et al.*, 2008).

Otras alternativas investigadas fueron los promotores P170, P1 y P3, desarrollados y empleados para la producción de proteínas heterólogas, sin embargo estos solo son estimulados por el pH bajo, siendo que el pH del SGI del ratón es muy variable pudiendo ir desde 3 a 6.5 dependiendo del sitio y de la presencia o ausencia de alimento, estas variaciones tendrían un efecto variable en la estimulación del promotor y por consiguiente de la expresión de la proteína de interés (Drouault *et al.*, 1999; Madsen *et al.*, 2005).

Debido a lo anterior el mejor candidato fue el promotor GroESL, el cual induce la transcripción de los genes que codifican las proteínas GroEL y GroES cuando una bacteria se encuentra bajo condiciones de estrés (temperatura elevada, pH extremos, cambios en la concentraciones de sales) ambas tienen la función de evitar la desnaturalización de las proteínas nativas de la bacteria mientras esté presente el estímulo que ocasiona el estrés, una vez superada las condiciones adversas para la bacteria se inhibe la transcripción de los genes y por consiguiente de las proteínas. Lo anterior permite que nuestra bacteria recombinante al ser administrada por vía oral entre en contacto con

las condiciones adversas del SGI (variaciones del pH en las diferentes regiones del tubo digestivo, presencia de sales biliares, así como una temperatura por arriba de 37 °C, la cual se encuentra por arriba de la temperatura óptima de crecimiento de nuestra bacteria 30 °C) e induzcan al promotor GroESL y por consiguiente la expresión del gen Usp45-GLP-1R. La aplicabilidad y funcionalidad de este sistema fue demostrada por Benbouziane *et al.* construyeron dos cepas de *L. lactis* cada una portadora de un plásmido pLB333 (Figura 13) las cuales al ser administradas vía oral y al estar en contacto con el SGI expresaron las proteínas interleucina 10 y el antígeno E7 del VPH (Benbouziane *et al.*, 2013; Kim y Batt, 1993).

En cuanto al producto inicial de la transcripción, la proteína Usp45-GLP-1R las modificaciones realizadas en su secuencia permitieron obtener distintas características para mejorar su excreción extracelular, dentro de ellas al agregar el codón GAC el cual codifica para el aminoácido aspartato, permitió asemejar lo mayor posible la excreción extracelular del GLP-1R con la excreción de la proteína Usp45, ya que de lo contrario no podría ser procesada correctamente a nivel de la membrana celular y ocasionaría un corte más allá del inicio de la secuencia del GLP-1R por parte de la SPase I (Goosens *et al.*, 2014; Van Roosmalen *et al.*, 2004). Este problema pudo haber sido resuelto introduciendo un sitio de clonación múltiple entre el término de la secuencia del péptido señal y el inicio de la secuencia del GLP-1R, sin embargo, esto ocasionaría que el GLP-1R contenga aminoácidos extras, modificando su secuencia original y pudiendo ocasionar interferencia con su unión al receptor evitando su activación, así como el inicio de la transducción de señales intracelulares sin la consecuente liberación de insulina (Miller, 2013).

Por otra parte al agregar el codón GGG se eliminó el sitio de reconocimiento por la DPP-4 evitando la hidrólisis del péptido por esta enzima, prolongando así su vida media lo cual se ha puesto de manifiesto por varios autores al realizar distintas modificaciones en la cadena de aminoácidos del GLP-1 (Gupta, 2013; Manandhar *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2017).

4.2 Manipulación de *Lactococcus lactis*

Durante la realización de este trabajo se utilizaron 2 protocolos para la obtención de bacterias electrocompetentes, uno desarrollado por el Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) y el otro desarrollado por la compañía MoBiTec logrando un mayor número de colonias transformadas al emplear este último (protocolo descrito en metodología). Una de las características observadas entre ambos protocolos fue la cantidad de glicina empleada en el medio G-SGlim17 siendo de 2 % el empleado por INRA y 2.5 % por MoBiTec (Bermúdez, 2002; MoBiTec, 2016).

La diferencia en el número de colonias observadas fue debido a que la glicina inhibe la síntesis y mantenimiento de la pared celular bacteriana al interrumpir el proceso de transpeptidación que tiene como objetivo la producción del peptidoglicano, el cual es el componente principal de la pared bacteriana, esto origina un esferoplasto en el cual es más fácil la introducción de material genético externo, en este caso de los plásmidos empleados en este proyecto (Minami *et al.*, 2004).

Para el resto de los componentes empleados tanto en el medio de cultivo, así como en los distintos lavados celulares no se encontró alguna diferencia en sus concentraciones de trabajo que pudieran afectar en la cantidad de colonias obtenidas.

4.3 Clonación molecular

Durante la etapa de clonación molecular el aspecto más destacado fue encontrar un método ideal para la extracción de ADN ya que de este primer paso dependía el resto de las etapas de la clonación. Inicialmente el primer método que se utilizó fue el propuesto por la compañía MoBiTec, sin embargo las muestras obtenidas presentaron una amplia degradación de las bandas de ADN. Debido a lo anterior se decidió emplear el protocolo desarrollado por Langella *et al.*, en el cual las muestras obtenidas se observaron bandas de

ADN nítidas y robustas sin rastros de degradación (Bermúdez, 2002; MoBiTec, 2016).

El resultado de los 2 protocolos realizados evidenció que la degradación de las bandas de ADN obtenidas por el método de MoBiTec ocurrieron probablemente a la ausencia de agentes que eliminan y precipitan restos celulares, puesto que se trata de una variante de los métodos de lisis alcalina. En contraparte con el método de Langella el cual incluye entre los componentes del protocolo RNasa A, la cual elimina RNA que dificulta la visualización de las bandas en los geles, además del empleo de PCI el cual precipita proteínas, lípidos y restos celulares, además del empleo de dos lavados con etanol al 70 % para eliminar la mayor cantidad posible de sales, mostraron un mayor rendimiento en la obtención del ADN plasmídico (Sambrook y Russell *et al.*, 2014).

4.4 Expresión de GLP-1 recombinante

Debido a que el GLP-1 es una proteína de bajo peso molecular fue necesario buscar un protocolo que permitiera la separación de estas moléculas de manera eficiente. El método descrito por Laemmli es el más utilizado para la separación de las proteínas, sin embargo presenta dificultades a la hora de utilizarse para la separación de proteínas de bajo peso molecular, ya que este sistema requiere concentraciones en los geles de acrilamida - bis acrilamida muy elevadas (> 16%) dificultando el empleo de otras técnicas como el Western Blot, además de presentar otras desventajas dentro de las que se incluyen dificultades para reproducirlo, fragilidad y su corta vida útil (Laemmli, 1970).

Una alternativa a este método es la electroforesis SDS-PAGE-Tricina, el cual es una forma simple y eficiente de separar proteínas y/o péptidos de bajo peso molecular en un solo gel de poliacrilamida con alta resolución, como fue descrito por Haider SR *et al.*, los cuales observaron que los métodos utilizados comúnmente para separar proteínas de bajo peso molecular requerían el uso de tres geles y en algunos casos el empleo de urea, lo cual

es tedioso, potencialmente problemático y siempre requiere una mezcla fresca de reactivos para preparar el gel, además de que la adición de urea puede crear problemas en la secuenciación de aminoácidos, y aunque es útil para el análisis de proteínas de baja masa, cristaliza a baja temperatura y algunas veces se descompone durante la preparación de la muestra (Haider SR *et al.*, 2010). Por lo anterior se dieron a la tarea de describir una forma mejorada del método de SDS-PAGE-Tricina en el cual se emplea un procedimiento simplificado que no requiere la preparación de dos buffers de corrida, preparación de un gel espaciador o de la adición de urea, permitiendo la separación de sus proteínas de una manera más práctica y eficiente. Por su parte Liu T *et al.* emplearon este protocolo para la separación de histonas (cuyo su peso molecular varía en un rango de 10 a 35 KDa) en el cual los geles de poliacrilamida evidenciaron una correcta separación entre las distintas bandas tanto del marcador de peso molecular como de las histonas (Liu T *et al.*, 2015). Debido a la simpleza, rapidez y antecedentes de uso del protocolo desarrollado por Haider *et al.* fue el método que se eligió para la separación y visualización de nuestra proteína donde se evidencia la correcta separación de las bandas del marcador de peso molecular, así como de la banda correspondiente a la proteína Usp45 y de la banda del GLP-1R.

4.5 Evaluación de la actividad hipoglucemiante del GLP-1R en ratones

Actualmente existen diversos reportes empleando lactobacterias para la producción de incretinas como una alternativa para el tratamiento de la DM. En el presente trabajo se obtuvo una cepa de *L. lactis* capaz de producir GLP-1R, sin embargo, al administrarse vía oral a ratones diabéticos no se logró obtener el efecto hipoglucemiante esperado en comparación con el fármaco control.

Existen distintos factores que pudieron haber interferido con la obtención de dicho resultado, los cuales podemos dividirlos en los relacionados con la bacteria y los relacionados con el GLP-1.

Factores relacionados con la bacteria:

Aunque se pudiera pensar que las condiciones poco favorables del sistema gastrointestinal principalmente a nivel gástrico y duodenal afectaría la supervivencia de *L. lactis*, Drouault *et al.* demostraron la capacidad de resistir a estas condiciones al administrar vía oral a ratones cepas portadoras de plásmidos con marcadores de selección, en la cual observaron que si las bacterias se administraban sin la presencia de alimento la capacidad de supervivencia disminuía drásticamente en comparación si las bacterias eran mezcladas con la dieta regular de los ratones. Por otra parte Wang Y *et al.* investigaron la capacidad de supervivencia y colonización del medio gastrointestinal por parte de *L. lactis* al administrar vía oral a ratones cepas portadoras de plásmidos con un marcador de selección así como un gen reportero, este último permitió el rastreo de las cepas metabólicamente activas durante su paso a través del sistema digestivo, confirmando capacidad de colonización de las bacterias en el intestino (Wang Y *et al.*, 2011).

Otro factor de importancia es que la expresión de algunos genes heterólogos puede resultar extremadamente tóxica para el hospedero, interfiriendo con su fisiología y originando una afectación significativa del crecimiento e incluso la muerte del cultivo. La toxicidad de estos genes puede variar desde moderada hasta muy elevada, dependiendo del nivel de expresión y por consiguiente de la cantidad de proteína recombinante producida, además del tipo de proteína a expresar como por ejemplo antígenos que suelen ser tóxicos para algunas bacterias o proteínas de gran peso molecular que consuman productos metabólicos esenciales a la bacteria. Sin embargo en nuestra bacteria recombinante existen tres elementos que la protegen, uno es el empleo del pGroESL el cual es un promotor regulable, solo consume productos del metabolismo bacteriano al estar bajo las condiciones de estrés, además del uso del péptido señal Usp45 el cual dirige a nuestra proteína al medio extracelular evitando su acumulación en el citosol previniendo el efecto de las proteasas y por último el bajo peso molecular el cual tiene un menor impacto en el metabolismo celular (González A y Fillat M, 2018). Estos elementos de nuestro sistema favorecen considerablemente la garantía de su expresión exitosa en el modelo utilizado.

Factores relacionados con el GLP-1:

Una que vez que la bacteria se encuentre en intestino delgado, secrete el GLP-1R y este sea capaz de resistir la degradación por parte de las enzimas intestinales, así como a su desnaturalización por las variaciones del pH, el primer obstáculo a superar es su transporte a través de los enterocitos, existen diversas vías para la absorción de moléculas a nivel intestinal, debido a su peso molecular normalmente las proteínas no atraviesan las membranas sin embargo existen reportes de algunas vías que pueden emplear las proteínas para entrar al enterocito, principalmente empleando la vía paracelular o la transcitosis (Araújo *et al.*, 2012).

Como ejemplo de lo anterior Ziv y Bendayan demostraron la absorción de la insulina en ratones a través de los enterocitos (Ziv y Bendayan *et al.*, 2000), así como Cammisotto P *et al.* evidenció el paso de la leptina en el intestino de rata mediante transcitosis (Cammisotto P *et al.*, 2007). Se piensa que la absorción de estas moléculas ocurre a través de la unión con un receptor inespecífico, que una vez activado conduciría a la formación de un endosoma el cual transportaría a las proteínas a través del enterocito y las liberaría a la circulación sanguínea. Es importante señalar que la insulina y la leptina tienen un mayor número de aminoácidos en comparación con el GLP-1 y por lo tanto un mayor peso molecular, lo cual llevaría a pensar que, si el transporte es eficiente para esas moléculas, lo mismo ocurriría para el GLP-1R (Rekha W y Sharma, 2013).

De los trabajos publicados en la administración de GLP-1 en animales de experimentación solo Agarwal *et al.* incluyó un experimento en monocapa con una línea celular canina para examinar el transporte de GLP-1 a través de ella, el cual evidenció el paso de esta proteína a través de la monocapa, descartando algún proceso de disrupción de la monocapa el cual permitirá el paso del GLP-1.

Otro factor que pudo haber influenciado es la unión del GLP-1R con su receptor, en este trabajo se utilizó la versión humana de la proteína, sin

embargo, se probó en un modelo murino, es necesario aclarar que la homología de secuencias entre ambas especies de receptores se encuentra altamente conservada, principalmente en el dominio extracelular del receptor, el cual es el encargado de interactuar con el GLP-1. Además, es interesante mencionar que el GLP-1 y el exendin comparten 8 aminoácidos, los cuales están presentes en la misma posición entre ambas moléculas y son los encargados de interactuar con el receptor del GLP-1 humano y de otras especies de vertebrados, teniendo la capacidad de estimular la secreción de insulina, esto explica el empleo de exenatida en el humano (Moon *et al.*, 2012). Por otra parte, la modificación realizada en la segunda posición de nuestra molécula para evitar la hidrólisis por la DPP-4 no tiene importancia para su unión con el receptor, ya que por medio de modelaje computacional, no participa de interacción fármaco-receptor, descartándola como un factor que pudiera haber influido en el resultado del experimento (Manandhar *et al.*, 2015; Underwood *et al.*, 2010)

Finalmente en comparación con otros trabajos de (Agarwal *et al.*, 2014; Lin Y *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2017) en los cuales se observó el efecto hipoglucemiante del GLP1, en ellos previo al ensayo *in vivo* se realizó un ensayo *in vitro* utilizando células beta para determinar el efecto insulínico del GLP-1 al cuantificar mediante Elisa la liberación de insulina, debido a que nuestro trabajo careció de este ensayo es difícil asegurar que nuestra proteína recombinante tuviera la capacidad de estimular el receptor a pesar de que existe evidencia de que *L. lactis* puede sobrevivir al paso por el intestino, secretar GLP-1R y atravesar la membrana de los enterocitos, entrar a la circulación y posteriormente unirse al receptor independientemente que se use en especies distintas a la humana.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

1. Se diseñó mediante bioinformática la unidad de transcripción sintética pGroESL/Usp45-GLP-1/ter.
2. Se construyó un plásmido recombinante para expresión de GLP-1 en *Lactococcus lactis*.
3. Se transformó *Lactococcus lactis* con el plásmido recombinante.
4. Se evaluó la expresión de GLP-1 mediante electroforesis de proteínas.
5. Se evaluó la actividad biológica hipoglucemiante en un modelo murino del GLP-1 recombinante, la cual no logró disminuir la glucosa plasmática en ratones en comparación con liraglutida, por lo tanto, se rechaza la hipótesis.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

1. Identificar mediante Western Blot el GLP-1R como parte su proceso de caracterización, ya que solo se identificó de manera indirecta mediante la electroforesis de proteínas, lo anterior nos permitirá asegurar su presencia extracelular de manera definitiva.

2. Realizar un ensayo de difusión con intestino de ratón para valorar el paso del GLP-1R a través del epitelio intestinal y de esta manera comprobar la migración transepitelial de la proteína.

3. Valorar la capacidad de unión y activación del GLP-1R a su receptor mediante un ensayo con células beta de hámster sirio (HIT-P15), esto confirmará de manera indirecta la actividad biológica de la proteína, al cuantificar la liberación de insulina por parte de las células.

BIBLIOGRAFÍA

Agarwal P, Khatri P, Billack B, Low WK, Shao J. Oral delivery of glucagon like peptide-1 by a recombinant *Lactococcus lactis*. *Pharm Res.* 2014; 31(12).

Alcántara V, Pérez A. Tratamiento de la diabetes mellitus. *Medicine.* 2016; 12(18).

American Diabetes Association. ADA Standards of Medical Care. 2020 Jan 43 (Supplement 1): S1-S2. Disponible en: <https://www.diabetesjournals.org/>

Araújo F, Fonte P, Santos H, Sarmiento B. Oral delivery of glucagon-like peptide-1 and analogs: Alternatives for diabetes control?. *Journal of Diabetes Science and Technology.* 2012; 6 (6).

Aylwin H. Nuevos fármacos en diabetes mellitus. *Revista Médica Clínica Las Condes.* 2016; 27(2).

Balderas, I. Diabetes, obesidad y síndrome metabólico. 1era ed. México: Manual Moderno; 2015. Capítulo 4, sinopsis de la diabetes; 34 - 44.

Benbouziane B, Ribelles P, Aubry C, Martin R, Kharrat P, Riazi A, et al. Development of a Stress-Inducible Controlled Expression (SICE) system in *Lactococcus lactis* for the production and delivery of therapeutic molecules at mucosal surfaces. *J Biotechnol.* 2013; 168 (2).

Bermudez, L. Desarrollo de una vacuna probiótica para combatir el cancer cérvico-uterino: construcción de cepas recombinantes de *Lactococcus lactis* que expresan la E7 del VPH-16 y la IL-12 murina. (Tesis Doctoral). Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biologicas; 2002.

Brown E, Cuthbertson D, Wilding J. Newer GLP-1 receptor agonists and obesity diabetes. *Peptides.* 2018; 30 (5).

Bruton L, Hilal R, Knollmann B. Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics 13th ed. New York: McGraw-Hill, 2019. Chapter 47, endocrine pancreas and pharmacotherapy of diabetes mellitus and hypoglycemia; 945 - 1012.

Cammisotto P, Gingras D, Bendayan M. Transcytosis of gastric leptin through the rat duodenal mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 293 (8).

Cano O, Seras J, Garcia E. Lactic acid bacteria: Reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes. *Microb Cell Fact.* 2015; 14 (1).

Charalampopoulos D, Rastall R. Prebiotics and probiotics science and technology. 1th ed. USA: Springer 2009. Chapter 29, development of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria: 418 - 449.

Drider D, River V. Bacterias ácido lácticas. Fundamentos y aplicaciones. 1 era ed. Chile. AlfaOmega; 2017. Capítulo 3B, Lactococcus; 56 - 66.

Drouault S, Corthier G, Ehrlich SD, Renault P. Survival, physiology, and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(11).

D'Souza R, Pandeya DR, Hong ST. Review: *Lactococcus lactis*: An efficient gram-positive cell factory for the production and secretion of recombinant protein. *Biomed Res.* 2012; 23 (1).

Goldman L, Schafer. Goldeman-Cecil Medicine. 26th ed. New York: Elsevier, 2019. Chapter 216, diabetes mellitus; 1943 – 1960.

González A, Fillat M. Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista de Educación Bioquímica.* 2018; 37(1).

Goosens VJ, Monteferrante CG, Van Dijn JM. The Tat system of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2014; 1843(8).

Gupta V. Glucagon-like peptide-1 analogues: An overview. *Indian J Endocrinol Metab.* 2013; 17 (3).

Haider SR, Reid HJ, Sharp BL. Modification of tricine - SDS - PAGE for online and offline analysis of phosphoproteins by ICP - MS. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 397 (2).

Hurtado V, Roncero I, Blazquez E, Alvarez E, Sanz C. Glucagon like peptide-1 and Its Implications in obesity. *Hot Top Endocrine-Related Diseases.* 2013; 18 (2).

International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 9th ed.* Brussels, Belgium; 2019. Disponible en: <http://www.idf.org/>

Irigoyen A, Ayala, Ramírez O, Calzada E. La diabetes mellitus y sus implicaciones sociales y clínicas en México y latinoamérica. *Archivos en Medicina Familiar.* 2017; 19 (4).

Kasper D, Fauci A. *Harrison`s principles of internal medicine.* 20th ed. New York: McGraw-Hill; 2019. Chapter 396, diabetes mellitus: diagnosis, classification, and pathophysiology; 2101 - 2136.

Kim SG, Batt CA. Cloning and sequencing of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* groESL operon. *Gene.* 1993; 127 (1).

Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227 (6).

Lin Y, Krogh-Andersen K, Pelletier J, Marcotte H, Östenson C, Hammarström L. Oral delivery of pentameric glucagon-like peptide-1 by recombinant *Lactobacillus* in diabetic rats. *PLOS ONE.* 2016; 1(9).

Liu T, Guo Q, Guo H, Hou S, Li J, Wang H. Quantitative analysis of histone H3 and H4 post-translational modifications in doxorubicin-resistant leukemia cells. *Biomedical Chromatography.* 2015; 30 (4).

Madigan M, Bender K, Buckley D, Sattley W, Stahl D. *Brock biology of microorganisms.* 15th ed. UK: Pearson, 2017. Chapter 16. Diversity of bacteria; 713 - 756.

Madsen M, Hindré T, Le Pennec J, Israelsen H, Dufour A. Two acid-inducible promoters from *Lactococcus lactis* require the cis-acting ACiD-box and the transcription regulator RcfB. *Molecular Microbiology*. 2005; 56 (3).

Manandhar B, Ahn J. Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) Analogs: Recent advances, new possibilities, and therapeutic implications. *J. Med. Chem.* 2015; 58 (3).

Marín J, Martín I, Sevillano C, Cañizo F. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*. 2016; 7(17).

Medina E, Sánchez A, Hernández A, Martínez M, Jiménez C, Serrano I, et al. Diabetes gestacional. Diagnóstico y tratamiento en el primer nivel de atención. *Med Int Méx.* 2017; 33(1).

Miller LJ. Molecular basis of peptide activation of the GLP-1 receptor. *Mol Metab.* 2013; 2(2).

Minami M, Ando T, Hashikawa S, Torii K, Hasegawa T, Israel D, et al. Effect of glycine on helicobacter pylori in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004; 48 (10).

Molecular Biotechnology. MoBiTec. Constitutive gene expression system for *Lactococcus lactis* and other lactic acid bacteria. Handbook. 2016. Disponible en: <https://www.mobitec.com/>

Moon M, Park S, Kim D, Cho E, Hwang J, Vaudry H, et al. Structural and molecular conservation of glucagon-like peptide-1 and its receptor confers selective ligand-receptor interaction. *Frontiers in Endocrinology*. 2012; 3 (16).

Morello E, Bermudez L, Llull D, Sole V, Miraglio N, Langella O, et al. *Lactococcus lactis* an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2008; 14 (12).

Nielsen LL, Young AA, Parkes DG. Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4): A potential therapeutic for improved glycemic control of type 2 diabetes. *Regul Pept.* 2004; 117(2).

Quinto E, Jiménez P, Caro I, Tejero J, Mateo J, Girbes T. Probiotic lactic acid bacteria: A review. *food and nutrition sciences*. 2014; 25 (5).

Rekha W, Sharma C. Oral delivery of therapeutic protein/peptide for diabetes - Future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013; 440 (9).

Reyes F, Pérez M, Figueredo E, Céspedes Y, Ardevol E. Las incretinas como nueva opción terapéutica en la diabetes mellitus tipo 2. *Revista Cubana de Medicina*. 2015; 54 (2).

Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2014. Chapter 1, Isolation and Quantification of DNA; 11 – 18.

Sanzana G, Durruty A. Otros tipos específicos de diabetes mellitus. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2016; 27 (2).

Tasyurek H, Altunbas H, Balci M, Sanlioglu S. Incretins: Their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 2014; 30 (7).

Underwood C, Garibay P, Knudsen L, Hastrup S, Peters G, Rudolph R, et al. Crystal structure of glucagon-like peptide-1 in complex with the extracellular domain of the glucagon-like peptide-1 receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285 (1).

Van Roosmalen ML, Geukens N, Jongbloed JDH, Tjalsma H, Dubois JYF, Bron S, et al. Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2004; 1694(1).

Wang Y, Wang J, Dai W. Use of GFP to trace the colonization of *Lactococcus lactis* WH-C1 in the gastrointestinal tract of mice. *J Microbiol Methods*. 2011; 86(3).

Xu F, Wang KY, Wang N, Li G, Liu D. Modified human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) produced in *E. coli* has a long-acting therapeutic effect in type 2 diabetic mice. *PLoS ONE*. 2017; 12(7).

Zeng Z, Yu R, Zuo F, Zhang B, Ma H, Chen S. Recombinant *Lactococcus lactis* expressing bioactive exendin-4 to promote insulin secretion and beta-cell proliferation in vitro. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017; 101(19).

Ziv E, Bendayan M. Intestinal absorption of peptides through the enterocytes. *Microscopy research and technique*. 2000; 49 (2).

RESUMEN

MCP Eiber Alexis Briones Velázquez Fecha de Graduación:

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de Estudio: Expresión de un análogo de GLP-1 recombinante en *Lactococcus lactis* y su evaluación biológica en un modelo murino

Número de Páginas: 69

Candidato para el grado de:

Maestría en Ciencias con orientación en Farmacia

Propósito y Método del Estudio: La diabetes mellitus (DM) se define como una enfermedad endocrino-metabólica caracterizada por hiperglucemia crónica y alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas. En México la prevalencia de diabetes ha ido en aumento durante las últimas décadas. De acuerdo con las estadísticas de la IDF del año 2019 en México se reportaron 12 805 millones de adultos con diabetes, lo anterior coloca a nuestro país en el sexto lugar a nivel mundial en número de personas con diabetes y en segundo lugar por detrás de Brasil en América Latina. Actualmente existen en el mercado múltiples tratamientos para la diabetes, sin embargo, hoy en día se continúa en la búsqueda de desarrollar nuevos fármacos, una alternativa a este problema es mejorar la actividad de los que ya se encuentran disponibles incrementando su potencia, su vida media o desarrollando nuevas formas farmacéuticas para su administración con lo cual se pueda lograr una mejor adherencia al tratamiento para lograr el control de la enfermedad. En este proyecto se empleó a la bacteria *L. lactis* como un medio de transporte a nivel gastrointestinal para entregar *in situ* un análogo del GLP-1 y valorar su potencial efecto hipoglucemiante en ratones.

Contribuciones y Conclusiones: Se logró mediante técnicas de ingeniería genética la obtención de una cepa de *L. lactis* capaz de excretar hacia el medio extracelular GLP-1R obtenido a partir de la modificación de la secuencia nativa del GLP-1. A pesar de que esta proteína no demostró obtener un efecto hipoglucemiante, es necesario realizar ensayos adicionales para valorar de manera más precisa su actividad biológica.

FIRMA DEL ASESOR:

Dr. Isaías Balderas Rentería