

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**EXPRESIÓN DE UN NUEVO ANÁLOGO DE GLP-1 EN *LACTOCOCCUS LACTIS* Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO HIPOGLUCEMIANTE EN UN MODELO MURINO DIABETIZADO.**

**Por**

**Diego Armando Jaramillo Rubio**

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

**Junio, 2020**

**EXPRESIÓN DE UN NUEVO ANÁLOGO DE GLP-1 EN *LACTOCOCCUS*  
*LACTIS* Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO HIPOGLUCEMIANTE EN UN  
MODELO MURINO DIABETIZADO.**

Revisión de tesis por:

---

**Dr. Isaías Balderas Rentería**  
**Director de Tesis**

---

**Dr. Xristo Zárate Kalfópulos**  
**Comité Tutorial**

---

**Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza**  
**Comité Tutorial**

---

**Dra. Patricia González Barranco**  
**Comité Tutorial**

---

**Dra. María Elena Cantú Cárdenas**  
**Sub-Directora de Estudios de Posgrado**

El presente trabajo de investigación se desarrolló en:

Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Autónoma de Nuevo León

México

Centro de Investigación Biomédica del Noreste

Instituto Mexicano del Seguro Social

México

## AGRADECIMIENTOS

*A mis **padres** por ser el Núcleo que resguarda mi perseverancia, a mis **hermanos**, por ser la fuente de energía y Apoyo Total Para mi esfuerzo.*

*A el **Dr. Isaías Balderas Rentería**, por proporcionarme las Bases que contienen las Instrucciones que Codificaron el desarrollo y funcionamiento de este estudio, y ser el Cebador en mi pasión por la ciencia.*

*A los **Doctores Eder Ubaldo Arredondo Espinoza, Xristo Zárate Kalfópulos y Patricia González Barranco**, por ser el Factor fundamental y el Código de Terminación en los resultados de este estudio.*

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

*Al **Laboratorio de Farmacología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León**, por permitirme el uso de sus equipos, así como a sus autoridades por el apoyo para la realización de este proyecto.*

*A la **Dra. María del Pilar Carranza Rosales**, por permitirme realizar la estancia en su laboratorio, por su paciencia y entusiasmo en los ensayos.*

*A **Eiber, Eli, Jessy, Brian, José Luis, Fabian, Paco, Angel, Fanny, Brayán, David, Edith, Aisa, Dany**, así como todos mis compañeros del laboratorio, por alimentar mis conocimientos y auxiliarme de manera tan empática.*

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>iii</b>
<b>TABLA DE CONTENIDO.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>NOMENCLATURA.....</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xix</b>
<b><u>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO.....</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1 DIABETES MELLITUS.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1 Enfermedades crónicas no transmisibles: definición y estadísticas.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2 Diabetes mellitus: definición e incidencia.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.3 Diabetes mellitus: etiología y clasificación.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.4 Diabetes mellitus tipo 2: mecanismos moleculares de los factores de riesgo.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1.5 Complicaciones de la diabetes mellitus tipo 2.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1.6 Diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 2.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1.7 Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1.8 Análogos del GLP-1.....</b>	<b>25</b>
<b>1.2 BIOTECNOLOGÍA DE LACTOCOCCUS LACTIS.....</b>	<b>31</b>

1.2.1	<i>Generalidades de Lactococcus lactis</i> .....	31
1.2.2	<i>Mecanismo de secreción de las proteínas en Lactococcus lactis</i> ...	32
1.2.3	<i>Producción de proteínas heterólogas en Lactococcus lactis</i> .....	34
1.3	ANTECEDENTES.....	37
1.4	HIPÓTESIS.....	45
1.5	OBJETIVOS.....	45
1.5.1	<i>Objetivo general</i> .....	45
1.5.2	<i>Objetivos específicos</i> .....	45
1.6	APORTACIÓN CIENTÍFICA.....	46
<b><u>CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS</u></b> .....		<b>47</b>
2.1	BIOINFORMÁTICA.....	47
2.1.1	<i>Diseño bioinformático de las unidades de transcripción sintéticas pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 y PSExp4/NAGLP-1</i> .....	47
2.2	MANIPULACIÓN DE <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> .....	52
2.2.1	<i>Cepas</i> .....	52
2.2.2	<i>Plásmido</i> .....	53
2.2.3	<i>Medios de cultivo y antibiótico</i> .....	54
2.2.4	<i>Reactivación de Lactococcus lactis</i> .....	54
2.2.5	<i>Preparación de bacterias electrocompetentes</i> .....	55
2.2.6	<i>Transformación de Lactococcus lactis electrocompetente con el pLB333</i> .....	56
2.2.7	<i>Preparación de stocks</i> .....	57
2.3	CLONACIÓN MOLECULAR.....	57
2.3.1	<i>Extracción del pLP333 de la cepa L.I-PLB</i> .....	57

2.3.2	<i>Caracterización del pLB333.....</i>	<b>59</b>
2.3.3	<i>Preparación del pLB33.....</i>	<b>60</b>
2.3.4	<i>Digestión de las UTS GroESL/PSUsp45/NAGLP-1 y PSExp4/NAGLP-1 con enzimas de restricción.....</i>	<b>62</b>
2.3.5	<i>Ligación de las UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 y PSExp4/NAGLP-1 con el pLB333 digerido.....</i>	<b>64</b>
2.3.6	<i>Transformación de Lactococcus lactis electrocompetente con los plásmidos pDJ331 y pDJ332.....</i>	<b>66</b>
2.4	<b>CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES.....</b>	<b>67</b>
2.4.1	<i>Extracción de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.....</i>	<b>67</b>
2.4.2	<i>Caracterización de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.....</i>	<b>67</b>
2.4.3	<i>Caracterización de las UTS provenientes de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.....</i>	<b>68</b>
2.4.4	<i>Diseño de primers para la comprobación de la caracterización de las UTS provenientes de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.....</i>	<b>70</b>
2.4.5	<i>Comprobación de la caracterización de las UTS provenientes de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.....</i>	<b>70</b>
2.5	<b>EXPRESIÓN Y ANÁLISIS DE GLP-1.....</b>	<b>72</b>
2.5.1	<i>Inducción de las cepas recombinantes L.I-DJ331 y L.I-DJ332.....</i>	<b>72</b>
2.5.2	<i>Concentración de las proteínas expresadas por las cepas recombinantes L.I-DJ331 y L.I-DJ332.....</i>	<b>73</b>
2.5.3	<i>Electroforesis de las proteínas expresadas por las cepas recombinantes L.I-DJ331 y L.I-DJ332.....</i>	<b>74</b>
2.5.4	<i>Ensayo Dot Blot de las proteínas expresadas por las cepas recombinantes L.I-DJ331 y L.I-DJ332.....</i>	<b>75</b>
2.6	<b>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL NAGLP-1 IN VIVO.....</b>	<b>77</b>

2.6.1	<i>Manejo de ratones.....</i>	<b>77</b>
2.6.2	<i>Ensayo de producción del NAGLP-1 in situ.....</i>	<b>78</b>
2.6.3	<i>Ensayo cualitativo de absorción de péptidos en el intestino de ratón.....</i>	<b>80</b>
<b><u>CAPÍTULO 3. RESULTADOS.....</u></b>		<b>82</b>
3.1	<b>BIOINFORMÁTICA.....</b>	<b>82</b>
3.1.1	<i>Secuencias finales del diseño bioinformático de las UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 y PSExp4/NAGLP-1.....</i>	<b>82</b>
3.2	<b>MANIPULACIÓN DE LACTOCOCCUS LACTIS.....</b>	<b>87</b>
3.2.1	<i>Selección de las colonias de L.I-PLB.....</i>	<b>87</b>
3.3	<b>CLONACIÓN MOLECULAR.....</b>	<b>88</b>
3.3.1	<i>Caracterización del pLB333.....</i>	<b>88</b>
3.3.2	<i>Preparación del pLB333.....</i>	<b>89</b>
3.3.3	<i>Ligación de los plásmidos pDJ331y pDJ332.....</i>	<b>91</b>
3.3.4	<i>Selección de las colonias L.I-DJ331 y L.I-DJ332.....</i>	<b>93</b>
3.4	<b>CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES.....</b>	<b>95</b>
3.4.1	<i>Caracterización de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.....</i>	<b>95</b>
3.4.2	<i>Diseño de primers.....</i>	<b>97</b>
3.4.3	<i>Amplificación de las UTR de los plásmidos pDJ331 y pDJ332...101</i>	
3.5	<b>EXPRESIÓN Y ANÁLISIS DE NAGLP-1 RECOMBINANTE.....</b>	<b>102</b>
3.5.1	<i>Electroforesis de NAGLP-1 secretado por las cepas L.I-DJ331 y L.I-DJ332.....</i>	<b>102</b>

3.5.2	<i>Ensayo Dot Blot de las proteínas expresadas por las cepas recombinantes L.I-DJ331 y L.I-DJ332.....</i>	<b>103</b>
3.6	<b>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL NAGLP-1 EN RATONES <i>IN SITU</i>.....</b>	<b>104</b>
3.6.1	<i>Ensayo de producción del NAGLP-1 in situ.....</i>	<b>104</b>
3.6.2	<i>Ensayo cualitativo de absorción de péptidos en el intestino de ratón.....</i>	<b>106</b>
	<b><u>CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</u></b>	<b>108</b>
4.1	<b>BIOINFORMÁTICA.....</b>	<b>108</b>
4.2	<b>MANIPULACIÓN DE <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i>.....</b>	<b>110</b>
4.2.1	<i>Selección de las colonias L.I-PLB.....</i>	<b>110</b>
4.2.2	<i>Preparación del pLB333.....</i>	<b>110</b>
4.2.3	<i>Selección de las colonias L.I-DJ331 y L.I-DJ332.....</i>	<b>111</b>
4.3	<b>CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS PDJ331 Y PDJ332.....</b>	<b>111</b>
4.4	<b>EXPRESIÓN Y ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES..</b>	<b>112</b>
4.4.1	<i>Expresión de NAGLP-1 recombinante.....</i>	<b>112</b>
4.4.2	<i>Ensayo Dot Blot del NAGLP-1.....</i>	<b>112</b>
4.5	<b>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL NAGLP-1 EN RATONES <i>IN SITU</i>.....</b>	<b>113</b>
	<b><u>CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....</u></b>	<b>117</b>
	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>119</b>

REFERENCIAS.....120

LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Ensayo de restricción del pLB333 con la enzima <i>EcoRI</i> .....	<b>59</b>
2. Ensayo de doble restricción del pLB333 con las enzimas <i>BglII</i> y <i>EcoRI</i> .....	<b>61</b>
3. Ensayo de doble restricción del pLB333 con las enzimas <i>NheI</i> y <i>EcoRI</i> .....	<b>61</b>
4. Doble digestión de la UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 con las enzimas <i>BglII</i> y <i>EcoRI</i> .....	<b>63</b>
5. Doble digestión de la UTS PSExp4/NAGLP-1 con las enzimas <i>NheI</i> y <i>EcoRI</i> .....	<b>63</b>
6. Ensayo de ligación de la UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 con el pLB333 digerido con las enzimas <i>BglIII/EcoRI</i> .....	<b>65</b>
7. Ensayo de ligación de la UTS PSExp4/NAGLP-1 con el pLB333 digerido con las enzimas <i>NheII/EcoRI</i> .....	<b>65</b>
8. Mezcla de reacción de los plásmidos pDJ331 y pDJ332 con la enzima <i>EcoRI</i> .....	<b>68</b>
9. Mezcla de reacción del plásmido pDJ331 con las enzimas <i>BglII</i> y <i>EcoRI</i> .....	<b>69</b>
10. Mezcla de reacción del plásmido pDJ332 con las enzimas <i>NheI</i> y <i>EcoRI</i> .....	<b>69</b>
11. Mezcla de reacción de las UTS de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.....	<b>71</b>
12. Condiciones de la PCR para la amplificación de la UTS de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.....	<b>72</b>
13. Protocolo para la preparación del gel de poliacrilamida.....	<b>75</b>
14. Valores de glucemia a diferentes tiempos de los grupos de estudio A, B y C.....	<b>104</b>

**15. Valores de insulina de los grupos A, B y C.....105**

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Mecanismo teórico del direccionamiento y secreción de la proteína Usp45 por el PSUsp45 en <i>L. lactis</i> .....	34
2. Anatomía molecular del pLB333.....	52
3. Unidad de transcripción sintética pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1.....	83
4. Unidad de transcripción sintética PSExp4/NAGLP-1.....	83
5. Traducción <i>in silico</i> del ORF de la UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1.....	84
6. Traducción <i>in silico</i> del ORF de la UTS PSExp4(completa)/NAGLP-1.....	84
7. Gráfica de procesamiento transmembranal de la proteína PSUsp45/NAGLP-1.....	86
8. Gráfica de procesamiento transmembranal de la proteína PSExp4/NAGLP-1.....	86
9. Control negativo de la cepa de <i>L. lactis</i> libre de plásmidos.....	87
10. Colonias de la cepa recombinante <i>L.l-PLB</i> .....	88
11. Digestión del pLB333 con la enzima <i>EcoRI</i> en un gel de agarosa al 1.3%.....	89
12. Digestión del pLB333 con las enzimas <i>BglII</i> y <i>EcoRI</i> en un gel de agarosa al 1.3%.....	90
13. Digestión del pLB333 con las enzimas <i>NheI</i> y <i>EcoRI</i> en un gel de agarosa al 1.3 %.....	91
14. Estructura del plásmido pDJ331.....	92
15. Estructura del plásmido pDJ332.....	93
16. Colonias de la cepa recombinante <i>L.l-DJ331</i> .....	94
17. Colonias de la cepa recombinante <i>L.l-DJ332</i> .....	94
18. Digestiones con las enzimas de restricción del plásmido pDJ331.....	96
19. Digestiones con las enzimas de restricción del plásmido pDJ332.....	96

<b>20.</b>	Valores obtenidos del diseño del par de primers Forward y Reverse a través de la herramienta informática OligoAnalyzer.....	<b>98</b>
<b>21.</b>	Amplificación de la UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 utilizando la herramienta informática SnapGene.....	<b>99</b>
<b>22.</b>	Amplificación de la UTS PSExp4/NAGLP-1 utilizando la herramienta informática SnapGene.....	<b>100</b>
<b>23.</b>	Amplificación de las UTS de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.....	<b>101</b>
<b>24.</b>	Gel de poliacrilamida de la expresión de las cepas recombinantes <i>L.l-DJ331</i> y <i>L.l-DJ332</i> .....	<b>102</b>
<b>25.</b>	Placa radiográfica revelada del ensayo de Dot Blot del NAGLP-1 expresado en las cepas recombinantes <i>L.l-DJ331</i> y <i>L.l-DJ332</i> .....	<b>103</b>
<b>26.</b>	Caja de Petri a diferentes tiempos en el ensayo de la absorción de la proteína verde fluorescente.....	<b>107</b>
<b>27.</b>	Muestras del ensayo de la absorción de la proteína verde fluorescente de la luz intestinal <i>in vitro</i> .....	<b>107</b>

NOMENCLATURA

<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotrófica
<b>AMP</b>	Adenosín Monofosfato
<b>AMPc</b>	Adenosín Monofosfato Cíclico
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>CDKN1A</b>	Gen inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1A
<b>DM1</b>	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
<b>DM2</b>	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
<b>DMG</b>	Diabetes <i>mellitus</i> gestacional
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>D.O.600nm</b>	Densidad óptica 600 nm
<b>DPP4</b>	Dipeptidilpeptidasa-4
<b>DSS</b>	Sulfato de dextrano sódico
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ECNT</b>	Enfermedades Crónicas No Transmisibles
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EII</b>	Enfermedad inflamatoria intestinal
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>ENSANUT 2016</b>	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016
<b>G-CIM17C</b>	Caldo G-M17C suplementado con cloranfenicol

<b>G-CIM17CAD</b>	Caldo G-CLM17C suplementado con agar-DNA-azul de toluidina
<b>G-M17A</b>	Agar bacteriológico M17 suplementado con glucosa al 0.5%
<b>G-M17C</b>	Caldo M17 suplementado con glucosa al 0.5%
<b>G-M17C/MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub></b>	Caldo GM17C complementado con MgCl <sub>2</sub> y CaCl <sub>2</sub>
<b>G-SGLiM17C</b>	Caldo GM17C suplementado con sacarosa y glicina
<b>GLP-1</b>	Péptido similar al glucagón tipo 1
<b>GLP1R</b>	Receptor del GLP-1
<b>GLUT2</b>	Transportadores de glucosa tipo 2
<b>GLUT4</b>	Transportador de glucosa tipo 4
<b>GRAS</b>	Generalmente Reconocida Como Segura
<b>h</b>	Horas
<b>HLA</b>	Antígeno Leucocitario Humano
<b>IFN-γ</b>	Interferón-gamma
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento similar a la insulina
<b>INSP</b>	Instituto Nacional de Salud Pública
<b>IRS</b>	Sustrato del receptor de insulina
<b><i>L. lactis</i></b>	<i>Lactococcus lactis</i>
<b><i>L.I-DJ331</i></b>	<i>Lactococcus lactis</i> Diego Jaramillo 331
<b><i>L.I-DJ332</i></b>	<i>Lactococcus lactis</i> Diego Jaramillo 332
<b>LAB</b>	Bacterias ácido lácticas
<b>M17C</b>	Caldo M17

<b>MCH</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatrayente monocitos
<b>min</b>	minutos
<b>MODY</b>	Diabetes de inicio de la madurez de los jóvenes
<b>mTOR</b>	Objetivo molecular de la rifampicina
<b>μs</b>	microsegundos
<b>NAGLP-1</b>	Nuevo análogo de GLP-1
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NICE</b>	The nisin-controlled gene expression System
<b>Nuc</b>	Nucleasa B
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ORF</b>	Open Reading Phrame
<b>pb</b>	Par de bases
<b>PC</b>	Piruvato carboxilasa
<b>PC1</b>	Proconvertasa 1
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pDJ331</b>	Plásmido Diego Jaramillo 331
<b>pDJ332</b>	Plásmido Diego Jaramillo 332
<b>PEPCK</b>	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
<b>pGroESL</b>	Promotor GroESL
<b>PI3K</b>	Fosfatidil inositol 3-quinasa
<b>PI3P</b>	Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato
<b>PIb333</b>	Plásmido LB333

<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>PKB/Akt</b>	Proteína quinasa B
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas
<b>PPARGC1-<math>\alpha</math></b>	Gen coactivador 1-alfa PPARG
<b>PSExp4</b>	Péptido señal de la proteína Exp4
<b>PSUsp45</b>	Péptido señal de la proteína Usp45
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>RTK</b>	Receptor tipo tirosina quinasa
<b>s</b>	segundos
<b>SNP</b>	Polimorfismos de un Solo Nucleótido
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>Tm</b>	Temperatura de fusión
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral alfa
<b>TRAIL</b>	Ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UniProt</b>	Universal Protein
<b>USP45</b>	Hidrolasa de ubiquitina carboxilo terminal 45
<b>UTS</b>	Unidad de Transcripción Sintética
<b>Vía-Sec</b>	Vía general de secreción
<b>VPH-16</b>	Virus del papiloma humano-16
<b>WT</b>	Wild Strain

ZDF

The Zucker Diabetic Fatty

## **RESUMEN**

**Q.F.B Diego Armando Jaramillo Rubio**      **Fecha de Graduación: Junio 2020**  
Universidad Autónoma de Nuevo León      Facultad de Ciencias Químicas

**Título de proyecto:** “EXPRESIÓN DE UN NUEVO ANÁLOGO DE GLP-1 EN *LACTOCOCCUS LACTIS* Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO HIPOGLUCEMIANTE EN UN MODELO MURINO DIABETIZADO”.

**Número de páginas: 131**      **Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia.**

**Propósito y método de estudio:** La diabetes *mellitus* de manera general, se puede definir como un conjunto de trastornos que se caracterizan por manifestar concentraciones elevadas de glucosa en la sangre, debido a la alteración en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas. La Organización Mundial de la Salud estima que al año 1.6 millones de decesos son provocados por esta patología.

En los últimos años, el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) se ha utilizado como una alternativa para tratar la diabetes *mellitus* tipo 2. Este péptido, es una hormona tipo incretina que se secreta en las células L del intestino con capacidad de estimular la secreción de insulina, así como la reparación y proliferación de las células  $\beta$  del páncreas. Se ha intentado sin éxito la producción intracelular de análogos del GLP-1 en bacterias Gram-negativas debido a la alta presencia de proteasas intracelulares y su costosa purificación. Es por esto que

en este trabajo se optó por la ingeniería genética en la construcción de dos plásmidos inducibles en condiciones de estrés (promotor GroESL) para la producción extracelular de un nuevo análogo de GLP-1, con ayuda de los PSUsp45 y PSExp4, en *Lactococcus lactis*, con el fin de evitar su purificación intracelular.

**Contribuciones y conclusiones:** Se logró inducir la expresión y secreción *in vitro* de un nuevo análogo de GLP-1 recombinante en las cepas transformadas de *L. lactis* L.I-DJ331 y L.I-DJ332 con los plásmidos pDJ331 y pDJ332 en condiciones de estrés, empleando el promotor GroESL y los PSUsp45 y PSExp4, confirmando la funcionalidad de ambos sistemas de secreción. Este proyecto abre las puertas para una posible nueva vía de administración (oral) y una mejora en la producción de los análogos del GLP-1 para tratar la diabetes *mellitus* tipo 2.

**FIRMA DEL ASESOR:** \_\_\_\_\_

**Dr. Isaías Balderas Rentería.**

## CAPÍTULO 1

### *INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO*

#### **1.1 Diabetes *mellitus*.**

##### *1.1.1 Enfermedades crónicas no transmisibles: definición y estadísticas.*

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), son un grupo de trastornos que afectan a la mayoría de la población mundial matando a 41 millones de personas en todo el mundo, lo que representa un 71 % de las muertes globales. Según datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2018, las ECNT tienen mayor frecuencia en países de escasos recursos y en vías de desarrollo; en ellos se engloban cerca del 75 % de todas las muertes por ECNT reportadas<sup>1</sup>.

Las ECNT son desencadenadas por una combinación de factores genéticos asociados a múltiples alteraciones genéticas, epigenéticas, ambientales y conductuales, que culminan en procesos fisiológicos alterados creando una susceptibilidad para desarrollarlos<sup>2,3,4,5,6</sup>. Dentro de estos trastornos,

se encuentran principalmente las enfermedades cardiovasculares (en su mayoría ocasionadas por la diabetes) alcanzando el 44 % de las muertes por ECNT, el cáncer causando el 22 % de las muertes por ECNT, las enfermedades respiratorias crónicas reportando el 9 % de todas las muertes por ECNT y la diabetes figurando con un 4 % del total de las muertes por ECNT<sup>1</sup>.

### 1.1.2 *Diabetes mellitus: definición e incidencia.*

La diabetes *mellitus* se puede definir como un conjunto de trastornos que se caracterizan por manifestar concentraciones elevadas de glucosa en la sangre, aumentando el riesgo de desarrollar complicaciones graves, reduciendo la calidad de vida y, si no se controla, puede conducir a una muerte prematura.

Desde hace varias décadas, esta patología ya se posicionaba como un grave problema de salud mundial. En el año 2000, se estimaba que 151 millones de personas en un rango de edad de 20 a 79 años eran afectadas por esta patología a nivel global. Una década más tarde, se estimaba que alrededor de 6 personas morían por minuto alrededor del mundo, hoy en día, se reportan 463 millones de personas diagnosticadas con diabetes *mellitus*, lo que equivale al 9.3 % de la población mundial, cifra que duplica a la reportada hace dos décadas (4.6 %). Siguiendo esta tendencia, se predice que en el año 2030 aumente a 578 millones de casos con diabetes *mellitus*, por lo tanto, de no mejorar las estrategias y el enfoque para abordar la enfermedad, se estima que la cifra llegue

a los 700 millones de personas diagnosticadas con este trastorno para el año 2045<sup>7</sup>.

Asimismo, y a pesar de que la incidencia de la diabetes *mellitus* tiende a ser más frecuente en los países en vías de desarrollo, esta patología no conoce fronteras, ni respeta estatus socioeconómicos, ya que, en la actualidad los 463 millones de personas que viven con este trastorno metabólico se encuentran distribuidas entre todas las regiones del mundo: el continente americano con 80 millones, el africano con 74 millones, Europa con 59 millones, y finalmente, Asia y Oceanía con 251 millones de casos reportados<sup>7</sup>.

En lo que respecta a México, la diabetes *mellitus* es la primera causa de muerte en mujeres y segunda en hombres. Datos reportados por el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), indicaron que mueren aproximadamente 80,000 personas al año a causa de esta patología, concluyendo que el 14 % de los adultos están diagnosticados con diabetes<sup>8</sup>.

También es importante mencionar que la diabetes en nuestro país es la causante principal de ceguera, insuficiencia renal terminal, amputaciones no traumáticas e infartos<sup>8</sup>. Aunado a ello, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (ENSANUT 2016), investigó el estado de diversas enfermedades crónicas, entre las que se encontraba la diabetes *mellitus* tipo 2 en la población mexicana mayor de 20 años, observando un incremento en el uso de insulina (11.1 %) y medicamentos orales antidiabéticos (8.8 %) en

comparación con lo observado en la ENSANUT 2012<sup>9</sup>. Mientras que los resultados de la ENSANUT 2018 arrojaron un incremento de 34.4 % en personas diagnosticadas con esta patología llegando a 8.6 millones, en contraste con las 6.4 millones de personas reportadas por la ENSANUT 2012<sup>10</sup>.

### 1.1.3 *Diabetes mellitus: etiología y clasificación.*

Como se ha mencionado previamente, la diabetes *mellitus* es un trastorno metabólico multifacético complejo, que se puede clasificar de la siguiente manera en función de su etiología:

➤ **Diabetes *mellitus* gestacional (DMG).**

Se refiere a la intolerancia a los carbohidratos debido a la resistencia moderada a la insulina, la presencia en exceso de insulina periférica y la incapacidad por parte de las células  $\beta$  del páncreas para controlar el ambiente diabetogénico.

La gravedad de la DMG puede variar y se diagnostica mediante un aumento de glucosa fuera de los valores normales. Estos valores son identificados por primera vez durante el segundo o tercer trimestre del embarazo, y no deben de encontrarse presentes antes de la gestación, además de que, por lo general, regresan después del parto como manifestación de una diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2)<sup>11,12,13</sup>.

Este tipo de diabetes se manifiesta con mayor frecuencia en mujeres afroamericanas, hispanas, indias americanas y asiáticas. Comúnmente afecta entre el 2 % y el 5 % de las mujeres embarazadas<sup>11</sup>.

El desarrollo de este trastorno no está bien elucidado, pero está relacionado con el embarazo, puesto que, se sabe que en el proceso normal del embarazo la placenta produce y libera al torrente circulatorio grandes cantidades de hormonas anti-insulina. Asimismo, a finales del segundo trimestre, la resistencia a la insulina aumenta a niveles similares a la DM2, con la finalidad de facilitar el transporte de glucosa a través de la placenta. De esta manera, el feto recibe la cantidad de nutrientes necesarios para su desarrollo y crecimiento normal<sup>14,15</sup>.

Por su parte, las células  $\beta$  del páncreas compensan esto con una mayor producción de insulina y proliferación de las mismas, sin embargo, en la DMG, esta acción es insuficiente para el aumento de resistencia a la insulina que se presenta. La resistencia a la insulina puede ser provocada por la producción elevada de interleucinas (IL6, IL8, IL18) y proteína C reactiva, así como, los niveles disminuidos de IL10 y los valores elevados de glucosa provocados por el hígado<sup>16,17</sup>.

➤ **Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1).**

Esta patología es provocada por la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas productoras de insulina, a través de un proceso autoinmune. Su

muerte genera la ausencia de insulina, y la deficiencia en el cuerpo ocasiona altos niveles de glucosa en sangre. Generalmente, es diagnosticada en niños y adultos jóvenes, sin embargo, puede aparecer a cualquier edad.

La DM1 representa cerca del 5 % al 10 % de todos los casos de diabetes en el mundo. Su incidencia es la misma en ambos sexos durante la infancia, pero es más marcada en hombres cuando esta enfermedad se manifiesta en edad adulta temprana. Anteriormente, era más frecuente en la población europea, no obstante, en la actualidad es común en todos los grupos étnicos<sup>18,19</sup>.

El proceso de desarrollo de la enfermedad sigue estando en controversia, pero se cree que es causada por múltiples factores genéticos y medioambientales.

Uno de los factores genéticos determinantes en la aparición de la DM1 es el locus que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6, este locus, codifica para un complejo de proteínas llamadas antígeno leucocitario humano (HLA), conocidas como complejo mayor de histocompatibilidad (MCH) que se expresan en la superficie celular. Este complejo está implicado en la especificidad del reconocimiento de las células del sistema inmune. Según la especificidad al tipo de antígeno que estas proteínas presentan se pueden clasificar en dos tipos, conocidos como clase I y

clase II. La clase que determinan la susceptibilidad a la DM1 es la clase II<sup>20</sup>.

De manera normal, el complejo de clase I se encuentra en la mayoría de las células del cuerpo, mientras que, el complejo de clase II se encuentra presente solo en células especializadas presentadoras de antígenos tales como: células dendríticas, células fagocíticas mononucleares y algunas células epiteliales, como las células del timo y  $\beta$  pancreáticas. De este modo, las células que tienen HLA de clase I pueden presentar antígenos intracelulares, como proteínas de virus y bacterias digeridas, a células T CD8. En contraste, las células que tienen presente HLA de clase II, presentan antígenos extracelulares fagocitados a los linfocitos T CD4 y de esta manera se activan y montan una respuesta en contra del agente extraño<sup>21</sup>.

Sin embargo, en el caso de la DM1 dependiendo de los haplotipos que codifiquen el complejo HLA II será su capacidad para presentar antígenos y a su vez, aumentar o disminuir el riesgo de presentar DM1, ya que esto depende de la composición de aminoácidos del complejo HLA II. La sustitución de varios sitios críticos puede ser relevante para la capacidad de unión de los antígenos. Esto repercute directamente en el proceso de presentación de antígenos por las moléculas HLA de clase II a las células T en el timo y órganos linfáticos periféricos para autoanticuerpos, lo que genera mayor probabilidad de que se produzcan células T autorreactivas

activadas dirigidas a las células  $\beta$  del páncreas desencadenando su destrucción<sup>22</sup>.

Otros genes que se han visto relacionados en la aparición de la DM1 son genes que no están implicados en las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad de las células del sistema inmune, como los de la insulina y la proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 22<sup>21</sup>.

Se sabe que el que se encuentren estos haplotipos no es suficiente para desarrollar DM1, de modo que tienen que estar implicados más factores no genéticos como la presencia de infecciones virales por enterovirus, entre las que se encuentran los del citomegalovirus, rotavirus y rubéola. No está claro como es el mecanismo por el cual se llegan a activar las células del sistema inmune, pero se acepta la hipótesis del mimetismo molecular; esta hipótesis consiste en que los antígenos de los virus implicados tienen cierto grado de similitud con moléculas presentes en las células  $\beta$ , generando así una respuesta autoinmune contra autoanticuerpos y finalmente la destrucción de las mismas<sup>21</sup>.

Algunos otros factores ambientales que pueden desencadenar una reacción autoinmune son: la exposición en la dieta a leche de vaca, nitratos en agua, algunos microorganismos, antibióticos, así como el inadecuado consumo de ácidos grasos omega-3 y de vitamina D, en los primeros años de vida<sup>22</sup>.

➤ **Otros tipos de Diabetes *mellitus*.**

- a) Diabetes monogénica: este tipo de diabetes se da debido a un defecto genético en genes específicos ocasionando la muerte y deterioro o disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas. Estos genes pueden ser: el gen del factor de transcripción del homeodominio PDX1 para diabetes tipo MODY (por sus siglas en inglés Maturity Onset Diabetes of the Young), el gen de la insulina ocasionando diabetes severa y, por último, por una mutación puntual en algún gen en el DNA mitocondrial que conduce a diabetes mitocondrial.
- b) Enfermedades del páncreas exocrino: es un tipo de diabetes derivada de procesos que dañan extensamente el páncreas, los cuales pueden ser: pancreatitis, trauma, infección, pancreatectomía y carcinoma pancreático.
- c) Endocrinopatías: tipo de diabetes generada por una desregulación de la secreción de hormonas que inducen el efecto contrario a la insulina como la hormona del crecimiento, cortisol, glucagón, manifestados por patologías como la acromegalia, síndrome de Cushing y glucagonoma, respectivamente.
- d) Diabetes inducida por fármacos: algunos fármacos pueden generar muerte de células  $\beta$  pancreáticas (pentamidina intravenosa) o intervenir en la acción de la insulina como los glucocorticoides.

e) Infecciones: algunos virus como el de la rubéola congénita, el virus de la coxsackie B y el citomegalovirus pueden generar la muerte específica de células  $\beta$  inducida por mecanismos autoinmunes similares a los mencionados en la DM1<sup>23</sup>.

➤ **Diabetes *mellitus* tipo 2.**

La diabetes *mellitus* tipo 2, es el tipo de diabetes más frecuente, aproximadamente el 90 % de todos los casos; no distingue entre hombres ni mujeres y su prevalencia máxima se encuentra en una edad mayor a los 50 años.

De manera general esta enfermedad se puede definir como una alteración en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas. Se manifiesta como una hiperglucemia crónica ocasionada principalmente por dos factores: a) la resistencia a la insulina por parte de las células del cuerpo que dependen de la misma (como lo son el músculo, el tejido adiposo y el hígado), b) el constante deterioro de la función de las células  $\beta$  (70 % de las células de los islotes pancreáticos), lo que resulta en una disminución de la cantidad de insulina secretada y por ende, la ineficiente supresión de glucagón en las células  $\alpha$  (20 % de las células de los islotes pancreáticos)<sup>24</sup>.

Existen múltiples causas para la resistencia a la insulina y el grado que afectan cada una de ellas sigue en discusión, sin embargo, todas están relacionadas entre sí creando una condición multifactorial.

Para poder entender la etiología de la resistencia a la insulina es necesario comprender el metabolismo de la glucosa en ausencia de la DM2. Esta, es regulada principalmente por las dos hormonas mencionadas previamente: la insulina y el glucagón. Asimismo, para mantener los niveles normales de glucosa en sangre, entran en juego otras hormonas como la acetilcolina, el cortisol, la hormona de crecimiento y las catecolaminas<sup>25</sup>.

En condiciones de ayuno de 10 a 12 h la concentración de glucosa se encuentra en estado basal (80-100 mg/dl); en este estado, la mayoría de la absorción de glucosa (cerca del 50 % del total) es independiente de insulina y se encuentra en el cerebro. Un 25 % lo realiza el hígado que también es independiente de insulina, mientras que, el otro 25 % se reparte en partes iguales entre el intestino y los tejidos dependientes de insulina (mayormente el músculo)<sup>26</sup>.

En contraste, la producción de glucosa se da en su mayoría por el hígado, cerca de un 85 % del total, mientras que el otro 25 % es generado en los riñones.

La disminución de la glucosa dada por las condiciones de ayuno, promueve la secreción de glucagón por parte de las células  $\alpha$  pancreáticas. Este evento promueve la gluconeogénesis y glucogenólisis, que es estimulada por la unión del glucagón a su receptor acoplado a proteína G que se encuentra en la superficie de las membranas celulares de los hepatocitos, dando como resultado la síntesis y el aumento de la concentración de glucosa en la sangre.

Además, en condiciones normales cada 2 h y en estímulo de lucha o huida, las células hipotalámicas neurosecretoras (somatotrópicas) secretan la hormona liberadora de la hormona de crecimiento humano. Esto produce que las células de la adenohipófisis secreten hormona del crecimiento humano y difunda a la sangre llegando al hígado de entre muchos otros tejidos diana. Los sucesos mencionados, provocan que se sintetizen y secreten factores de crecimiento similares a la insulina (IGF). Los IGF ayudan a mantener la masa muscular, los huesos y al igual que el glucagón promueven la síntesis y liberación de glucosa.

Este ligero incremento de glucosa genera la liberación basal de insulina y de este modo en ausencia de estímulos exógenos, la disminución de la glucosa en sangre se encuentra en equilibrio con la absorción. Sin embargo, después de una ingesta de glucosa, el equilibrio queda comprometido y a su vez, esto se ve aliviado gracias a la liberación de insulina en las células  $\beta$  del páncreas<sup>26</sup>.

La liberación de insulina es estimulada gracias a que las células  $\beta$  del páncreas tienen en sus membranas celulares transportadores de glucosa tipo 2 (GLUT2) constitutivos de baja afinidad por la glucosa. Esto hace que la absorción de glucosa sea independiente de la insulina. La glucosa que ingresa a las células es fosforilada por una hexoquinasa que impide su salida, y mediante glucólisis genera aumento de trifosfato de adenosina (ATP). Este incremento cierra los canales de potasio (K) dependientes de ATP, bloquea el paso a  $K^+$  y despolariza la membrana de las células. Estos eventos causan que los canales de calcio (Ca) dependientes de voltaje se abran y se acumule los iones  $Ca^{2+}$  intracelular. El incremento de  $Ca^{2+}$  origina la fusión de los gránulos que contienen la insulina con la membrana y finalmente la exocitosis de la insulina<sup>27</sup>.

La acetilcolina estimula la liberación de insulina mediante la unión a su receptor muscarínico M3 expresado en la superficie celular de las células  $\beta$  pancreáticas. Esta misma, es secretada mediante exocitosis por las células  $\alpha$  pancreáticas en presencia de niveles reducidos de glucosa, lo que prepara y sensibiliza a las células  $\beta$  a los aumentos de la concentración de glucosa posterior<sup>28</sup>.

De la misma manera, el eje hipotalámico-pituitario-adrenal genera la liberación de la insulina cuando el organismo se encuentra en estado de ayuno o estrés. Al estar en este estado, se liberan neuropéptidos como la

vasopresina, que estimula la secreción de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) desde la hipófisis anterior. Esta hormona se moviliza a sus células diana en la corteza suprarrenal y genera la secreción del cortisol. El cortisol de manera directa aumenta la concentración de glucosa en sangre por gluconeogénesis en hígado y de forma indirecta genera la secreción de insulina en sangre por el aumento de glucosa<sup>29</sup>.

La liberación de insulina también es estimulada por el GLP-1 proveniente de las células epiteliales tipo L del intestino. Este se almacena en vesículas y cuando se produce un cambio de potencial de membrana debido a la absorción de dipéptidos, tripéptidos, glucosa y sodio (Na) provenientes de los alimentos, se genera la abertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , esta acción eleva la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y estimula la fusión de las vesículas del GLP-1 con la membrana celular generando su exocitosis hacia el torrente sanguíneo; posteriormente, el GLP-1 se une a su receptor tipo proteína G en las células  $\beta$  pancreáticas, lo que genera un aumento intracelular de Adenosín Monofosfato Cíclico (AMPc) activando la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA). La activación de PKA produce varios eventos que juntos amplifican la señal de la secreción de insulina. Uno de estos es la inhibición del canal de  $\text{K}^+$  dependiente de voltaje lo que retrasa la despolarización de la membrana, otro evento es la elevación de la concentración de ATP por la activación de la enzima glucoquinasa, lo que genera el bloqueo de los canales dependientes de ATP y, por último, genera la activación directa de los canales de calcio<sup>30</sup>.

Por otro lado, después de todos los posibles mecanismos de liberación de insulina, esta última viaja a sus tejidos diana mencionados previamente (células adiposas, hepáticas y musculares), donde se da la interacción de la insulina con receptores extracelulares tipo tirosina quinasa (RTK). Este evento genera la unión de proteínas intracelulares como el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) con el receptor insulínico. El IRS-1 recluta y activa varias proteínas a la vez, como la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), la proteína quinasa B (PKB/AKT) y el objetivo molecular de la rifampicina (mTOR). La activación de estas proteínas genera segundos mensajeros como el fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PI3P), que junto con la activación de PKB/AKT estimulan la fusión de vesículas que contienen secuestrado el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) con la membrana de las células adiposas y del músculo esquelético. Además, en los hepatocitos, la activación de mTOR río abajo en la cascada de señalización estimula la síntesis de glucógeno e inhibe enzimas clave implicadas en la gluconeogénesis como la enzima glucosa-6-fosfatasa y la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). Finalmente, la insulina se une a su receptor en las células  $\alpha$  del páncreas lo que ayuda a inhibir la secreción de glucagón al torrente sanguíneo<sup>24,31</sup>.

Sin embargo, como ya se mencionó previamente, cuando existe una función alterada por parte de las proteínas involucradas en las vías de señalización, se da una mala transducción de la señal de los receptores

RTK; alteraciones como la fosforilación de serinas específicas en la proteína IRS-1, la desregulación de la concentración de la subunidad de la proteína PI3K (p110) con su subunidad reguladora (p85) y la activación reducida de la PKB/AKT, reduce la capacidad de estas proteínas para activar otras quinasas y favorece su degradación, esto desencadena la disminución considerable de la fusión de las vesículas de los transportadores GLUT4 en las células adiposas y musculares, mientras que en hepatocitos impide la inactivación de las enzimas clave de la gluconeogénesis<sup>27,32</sup>.

Todo esto, junto con las alteraciones genéticas en las proteínas IRS-1, en el receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ), en el canal de K<sup>+</sup> sensible a ATP, entre otras, ocasiona diferentes eventos en las células como la nula respuesta a la activación del receptor de insulina, menor capacidad de la glucosa para ingresar a las células y, por consiguiente, que se eleve la concentración de glucosa en la sangre. Esto obliga a las células  $\beta$  del páncreas a producir mayor cantidad de insulina con la finalidad de disminuir los niveles elevados de la glucemia, hasta que finalmente, pierden la capacidad de producir insulina en concentraciones efectivas por el exceso de trabajo realizado. Como se mencionó anteriormente, el conjunto de estas condiciones ocasiona que la supresión del glucagón sea deficiente y se eleve aún más la concentración de la glucosa sanguínea<sup>5,33</sup>.

1.1.4 *Diabetes mellitus tipo 2: mecanismos moleculares de los factores de riesgo.*

Aunque es difícil elucidar todos los mecanismos por los cuales se dan las alteraciones en las proteínas de las vías de señalización mencionadas previamente, los avances en los estudios epidemiológicos sobre DM2 en las últimas tres décadas, han ayudado a comprender la existencia de una amplia gama de factores de riesgo para la DM2, entre los que se encuentran los factores genéticos y epigenéticos como los que se describen a continuación:

➤ **Múltiples polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).**

- a) La sustitución de una Pro<sup>12</sup> por Arg<sup>12</sup> del PPAR $\gamma$  conduce a una alteración en su función significativa y por lo tanto un aumento del riesgo a desarrollar DM2 del 20 %. Esto debido a que el PPAR $\gamma$  es un receptor intracelular que activa la síntesis de genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos como el GLUT4 y regula la expresión de los genes de factores secretados en el tejido adiposo como la adiponectina, leptina y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que influyen en la sensibilidad de la insulina por objetivos celulares diferentes y vías de señalización superpuestas<sup>34</sup>.

- b) Modificaciones en Arg<sup>972</sup> y Asp<sup>1057</sup> por Gly, en el IRS-1 y en el IRS-2, respectivamente, se han visto relacionadas con el aumento de la insulina y glucosa en sangre. Esto debido a que se encuentran en sitios de fosforilación de PI3K, lo que afecta en la capacidad de fosforilación del IRS en esta enzima generando así la deficiente transducción de la señalización<sup>35</sup>.
- c) Se han identificado asociaciones entre la DM2 y las mutaciones en los genes SUR1 y KIR 6.2 que codifican el canal de K<sup>+</sup> sensible a ATP, compuesto por dos subunidades: el receptor de sulfonilureas y el canal rectificador interno de K<sup>+</sup>, disminuyendo su sensibilidad al ATP<sup>36</sup>.

➤ **La metilación del DNA, modificaciones de histonas y microRNAs, pueden producir un cambio de la función génica en células somáticas debido a diferentes factores.**

- a) Niveles elevados de glucosa durante la DM2 aumentan la metilación del DNA en genes como el que codifica la insulina (gen INS), el que codifica el coactivador 1- $\alpha$  PPARG (PPARGC1- $\alpha$ ) y el gen que codifica el receptor del GLP-1 (GLP1R) en islotes pancreáticos. Esto a su vez genera la disminución de la expresión de estos genes, generando una secreción de insulina alterada<sup>37,38,39</sup>.
- b) La DM2 genera la disminución de la metilación del promotor del gen inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1A (CDKN1A)

que regula la progresión del ciclo celular a G1, lo que aumenta la expresión de esta proteína y ocasiona la disminución de la proliferación de las células  $\beta$  pancreáticas, estos eventos, se correlacionan con la deficiencia por parte de estas células a contrarrestar la resistencia a la insulina<sup>40</sup>.

➤ **Dieta, obesidad, sedentarismo, consumo de tabaco y alcohol.**

Una dieta hipercalórica y la baja actividad física ocasionan obesidad y favorece la acumulación de grasa en el tejido subcutáneo, en el hígado, el músculo y el páncreas. El conjunto de estos factores y/o en presencia de inflamación crónica, contribuye a la resistencia a la insulina y a la disfunción y muerte de células pancreáticas debido a aumento de la secreción de metabolitos activos (ácidos grasos libres, lípidos y MCP-1), que son secretados por células adiposas. Los ácidos grasos libres se pueden oxidar en músculo inhibiendo la glucólisis. Mientras que la MCP-1 ocasiona que monocitos y macrófagos sean atraídos al tejido para liberar citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6. Estas moléculas se unen a sus respectivos receptores que se expresan en la mayoría de las células del cuerpo y activan a la enzima quinasa I $\kappa$ B (IKK), inhibidora del factor nuclear de la cadena ligera kappa (NF- $\kappa$ B) y causa que NF- $\kappa$ B migre al núcleo, inhiba la transcripción de GLUT4 e induzca la transcripción de quinasas proinflamatorias, quimiocinas y enzimas que a su vez pueden inactivar a IRS-1 por fosforilación de serinas, además de promover apoptosis en células  $\beta$  pancreáticas, atraer más células del sistema

inmune y contribuir aún más a la deficiencia de la transducción de la señal para la secreción de insulina<sup>32,41</sup>.

#### *1.1.5 Complicaciones de la diabetes mellitus tipo 2.*

Si estos mecanismos siguen indiscriminadamente, es probable que la DM2 pueda llegar a provocar complicaciones en la salud de las personas, tales como: ataques cardíacos, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia renal, amputación de extremidades inferiores, pérdida de visión, daños neurológicos e incrementar el riesgo general de muerte prematura<sup>42</sup>.

#### *1.1.6 Diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 2.*

Por todas estas complicaciones es fundamental realizar un diagnóstico temprano de esta patología basado en los criterios recomendados por la OMS, la cual establece que el diagnóstico es positivo cuando aparece alguno de los siguientes resultados: un valor mayor o igual a 126 mg/dl tras la prueba de glucosa en ayunas, un valor mayor o igual a 200 mg/dl durante la prueba de tolerancia a la glucosa y/o un valor mayor o igual a 6.5 % en la prueba de hemoglobina glucosilada<sup>43</sup>.

*1.1.7 Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.*

Una vez establecido el diagnóstico es importante iniciar con el debido tratamiento para disminuir la progresión de esta patología. Estos, generalmente se dividen en tratamientos no farmacológicos y farmacológicos; los primeros se centran en la educación al paciente, para tratar de disminuir la exposición a los factores de riesgo modificables, mediante tratamiento médico nutricional y actividad física. Mientras que, en el tratamiento farmacológico, se encuentran moléculas como: la insulina, los retardantes de la absorción de glucosa, los sensibilizadores de insulina (metformina y tiazolidinedionas), secretagogos de insulina (sulfonilureas y meglitinidas), los inhibidores de la enzima dipeptidilpeptidasa-4 (DPP4) y recientemente los análogos del GLP-1<sup>33</sup>.

➤ **Tratamiento no farmacológico.**

- a) Tratamiento médico nutricional: esta terapia se puede utilizar como medida de prevención para personas que se encuentran en posible riesgo de desarrollar DM2, así como en personas con prediabetes o sobrepeso con la finalidad de mejorar las comorbilidades de esta patología como la hipertensión, dislipidemia y obesidad. Se basa en una dieta hipocalórica con mayor ingesta de fibra dietética y baja en carbohidratos. Un ejemplo de este tipo de régimen es la dieta mediterránea, esta dieta es rica en aceite de oliva, verduras (apio), legumbres, granos

enteros, frutas (uvas rojas), nueces, una cantidad moderada de aves y pescado, una baja cantidad de productos lácteos y carnes rojas. El uso de esta dieta en la DM2 ayuda a lograr el control glucémico, mejorar la función hepática, reducir la resistencia a la insulina y el riesgo cardiovascular.

- b) Actividad física: se recomienda realizar ejercicios en donde se movilicen la mayoría de los músculos del cuerpo para favorecer la eliminación de la glucosa en estos tejidos. Se deben de realizar ejercicios con duración de al menos 150 min por semana, no dejando pasar más de 2 días consecutivos sin hacer ejercicio. Esto último, debido a que se sabe que los beneficios del ejercicio sobre la resistencia a la insulina tienen una duración de 24 a 72 h<sup>44</sup>.

➤ **Tratamiento farmacológico.**

- a) Insulina: está indicada en los casos de DM2 que no respondan a ningún tipo de terapia. La insulina se puede encontrar en preparaciones de acción corta como la insulina regular y la insulina de acción rápida, así como, en preparaciones de acción prolongada. Aunque su mecanismo de acción es el mismo al de la insulina endógena existen estudios *in vitro* que han demostrado efectos mitogénicos y cancerígenos potenciados debido a que los análogos de la insulina tienen mayor afinidad al receptor del IGF-1. Otros efectos adversos que presenta el uso de estos fármacos incluyen el aumento de peso y la hipoglucemia.

- b) Retardantes de la absorción de glucosa: inhiben de manera reversible las alfa glucosidasas y sacarosas, enzimas que se encuentran unidas a la membrana de las células epiteliales en la luz del intestino. Estas enzimas son las encargadas de convertir los disacáridos en fructosa y glucosa, provenientes de polisacáridos como almidones previamente hidrolizados por amilasas pancreáticas. De este modo se retrasa la absorción de los carbohidratos provenientes de la ingesta de los alimentos. Actualmente, existen algunos fármacos disponibles como la acarbosa, la voglibosa y el miglitol. Sin embargo, el retraso de la absorción de los carbohidratos produce un incremento de bacterias intestinales lo que causa incomodidad producto del gas generado por las mismas y flatulencias.
- c) Sensibilizadores de insulina: en este grupo se encuentra la metformina que produce la inhibición del complejo I de la cadena transportadora de electrones elevando la concentración de Adenosin Monofosfato (AMP) activando la quinasa dependiente de AMP, (AMPK). Esta enzima interviene en múltiples vías de señalización relacionadas con la energética celular. Activada, promueve la biosíntesis mitocondrial, estimula la síntesis de GLUT 4 y su movilización a la membrana celular, inhibe la síntesis de proteínas inactivando a mTOR, disminuye la producción de glucosa inhibiendo la enzima piruvato carboxilasa (PC) en el hígado y la síntesis de lípidos. No tiene efectos adversos

significativos, no obstante, puede causar mareos, cansancio, escalofríos, náuseas y vómito.

- d) Secretagogos de insulina: producen el cierre de los canales de  $K^+$  dependientes de ATP de las células  $\beta$  pancreáticas, despolarizando la membrana y abriendo los canales de  $Ca^{2+}$ . El aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular genera la fusión de las vesículas de insulina con la membrana celular liberándola al torrente sanguíneo. Algunos ejemplos de los medicamentos que se encuentran en este grupo son: glibenclamida, glipizida (sulfonilureas), repaglinida y nateglinida (meglitinidas). Algunas limitaciones de su uso es la liberación de insulina independiente de glucosa, hipoglucemia, aumento de peso y puede causar la muerte de las células  $\beta$  pancreáticas.
- e) Inhibidores de la dipeptidilpeptidasa-4: Los fármacos de este grupo se unen a la DPP4 que se encuentra en la membrana de la mayoría de las células del cuerpo. Esta enzima inactiva rápidamente al GLP-1 degradándolo en 2 min. El uso de este fármaco permite que el GLP-1 endógeno aumente su concentración y su vida media generando la secreción de insulina por parte de las células  $\beta$  y la inhibición de la secreción del glucagón. Sin embargo, su uso no genera un aumento de la secreción de insulina tan marcada, ni reducción de peso como en el caso de otros fármacos<sup>45</sup>.

- f) Análogos del GLP-1: A pesar de todos los fármacos existentes, el control glucémico en los pacientes es difícil de alcanzar y cada vez es mayor la demanda de nuevos fármacos que prevengan el desarrollo de la enfermedad, debido a esto, en las últimas décadas se han desarrollado este tipo de fármacos.

#### *1.1.8 Análogos del GLP-1.*

Estos fármacos se desarrollaron al estudiar el efecto incretina (del acrónimo de INtestinal seCRETion of INsulin) generado por péptidos secretados por las células L del tracto gastrointestinal. Estas células expresan el gen proglucagón codificado en el cromosoma 2 humano que genera un péptido de 180 aminoácidos. Este péptido sufre una modificación postraduccional por la enzima proconvertasa 1 (PC1) dando origen a 4 péptidos, glicentina, oxintomodulina, GLP-1 y GLP-2. Estos últimos, pueden ser almacenados en vesículas o secretados al torrente sanguíneo en respuesta a nutrientes provenientes de la alimentación como lo son; lípidos por el receptor de ácidos grasos libres (FFA1), a ácidos biliares por el receptor de ácidos biliares acoplado a proteína G (TGR5), a Ca<sup>+2</sup> por los canales de calcio de tipo L dependientes de voltaje, a péptidos por el transportador de péptidos intestinales 1 (PepT1) y a carbohidratos por el cotransportador sodio-glucosa tipo 1 (SGLT1) por mencionar algunos<sup>30</sup>.

Una vez fuera del intestino el GLP-1 es altamente susceptible a la degradación por la DDPIV que se encuentra en la superficie luminal de las células endoteliales inactivando aproximadamente un 80% del GLP-1 que se difunde a la circulación portal, una vez en el hígado se tiene lugar una degradación similar del 40 a 50 % restante del GLP-1. Por lo tanto, se puede calcular que solo un 10 a 15% del GLP-1 recién secretado llega a la circulación sistémica en forma intacta<sup>46,47</sup>.

Posteriormente, el GLP-1 intacto en el torrente sanguíneo puede experimentar tanto la amidación enzimática como la escisión para producir sus formas principales, el GLP-1 (7–37) amida y el GLP-1 (7–36) amina. Ambas formas provocan el incremento de la secreción de insulina dependiente de la concentración de glucosa. Además, tienen múltiples dianas celulares en donde la unión a su receptor provoca efectos beneficiosos como la proliferación de las células  $\beta$  pancreáticas, en células  $\alpha$  pancreáticas generan la inhibición de la secreción de glucagón, mejoran la contractilidad del miocardio en cardiomiocitos, efecto hipotensor en células endoteliales microvasculares cardíacas, mientras que su acción en adipocitos, células epiteliales y células hipotalámicas, generan la reducción del peso corporal y disminución del retardo del vaciamiento gástrico<sup>48</sup>.

Teniendo estos efectos como objetivo se han desarrollado distintos análogos de GLP-1 con una mayor resistencia a la degradación por parte de la

DPP4 que inactiva rápidamente al GLP-1 endógeno mediante una escisión en el aminoácido Ala<sup>8</sup> en el N-terminal (aproximadamente en 2 minutos)<sup>49</sup>.

Actualmente, se encuentran disponibles en el mercado 4 análogos del GLP-1 de los cuales se sabe que se eliminan del plasma casi en su totalidad por filtración renal y no por degradación proteolítica teniendo una ventaja notable sobre el GLP-1<sup>50</sup>:

➤ **Exenatida.**

Es el primer fármaco que se desarrolló, fue aislado de la saliva del lagarto monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*) y posteriormente producido sintéticamente y comercializado en 2005 como exendina-4. Este péptido se compone de 39 aminoácidos y comparte un 53 % de homología con el GLP-1 humano. Siendo su cambio más destacable una Gly<sup>8</sup> en lugar de la Ala<sup>8</sup> con respecto al GLP-1 humano. Este cambio favorece que sea resistente a la DPP4 lo que le permite extender su vida media a 2.4 h, en comparación a la del GLP-1 que es de 2-3 min<sup>51</sup>.

➤ **Lixisenatida.**

Es un análogo sintético del exendina-4, es constituido por 44 aminoácidos, se diferencia de este por la adicción de 6 residuos de Lys y la eliminación de una Pro en el C-terminal. Esta modificación lo hace tener una afinidad cuatro veces mayor por el receptor que el exendina-4 y mantener una vida media similar, cerca de las 3 h<sup>52</sup>.

➤ **Liraglutida.**

Es un análogo del GLP-1 constituido por 32 aminoácidos producido por la combinación de las técnicas de síntesis por cromatografía e ingeniería genética. Es comercializado desde el 2010 como Saxenda® y Victoza®. Comparte un 97 % de homología con el GLP-1 humano, solo difiere en el cambio de una Lys<sup>34</sup> por una Arg<sup>34</sup> y por la adición de una cadena de ácido palmítico unido a un ácido glutámico en el residuo de Lys<sup>26</sup>. Esta modificación le confiere una vida media de 13 h<sup>53</sup>.

➤ **Albiglutida.**

Es un dímero recombinante análogo del GLP-1 humano aprobado en 2014. Cada péptido del análogo tiene el 97 % de homología con el GLP-1. Se diferencia de este último por tener una Gly<sup>8</sup> en lugar de la Ala<sup>8</sup>. Ambos péptidos son unidos por una secuencia de Arg<sup>30</sup>-His<sup>1</sup>. Estos cambios le confieren resistencia a la DPP4 mientras que en la región N-terminal se encuentra fusionado a la albumina sérica humana recombinante mediante un enlace covalente, con la finalidad de aumentar su vida media a 5 días<sup>54</sup>.

La mayoría de los análogos del GLP-1 se pueden dar en combinación con otros fármacos para tratar la DM2 y lograr una mayor respuesta al tratamiento, también se han dado de manera individual para lograr un control de peso y contribuir con la disminución de los factores de riesgo de esta enfermedad. Estos

medicamentos, presentan efectos adversos mínimos como náuseas, diarrea y escalofríos, los cuales son despreciables con respecto a todos los efectos beneficiosos.

A pesar de estos efectos, presentan algunas desventajas con respecto a otros medicamentos para tratar DM2, ya que, como la mayoría de los fármacos de naturaleza proteica no es posible administrarlos por vía oral debido a las barreras que presenta el tracto gastrointestinal contra las proteínas, por ejemplo, a) el pH que varía de 1 a 3 en el estómago y de 6.5 a 8 a lo largo del intestino, b) la degradación proteolítica por enzimas secretadas a lo largo de la luz gastrointestinal, como la pepsina, enzimas pancreáticas, peptidasas y enzimas de la microbiota intestinal, c) la difícil absorción a través de las células epiteliales intestinales y la capa de mucina alrededor de la luz del epitelio permitiendo la entrada solo a moléculas pequeñas. Debido a estas barreras los análogos del GLP-1 solo se encuentran disponibles en suspensiones inyectables, las cuales se deben administrar en dosis diarias o semanales<sup>46</sup>.

Además, debido a su modo de administración, que requieren un asesoramiento previo del uso de plumas y agujas para inyectar, un cuidadoso almacenamiento y a la incomodidad que genera su administración, se dificulta el apego al tratamiento terapéutico. De la misma manera, debido a que los análogos del GLP-1 tienen una naturaleza proteica se obtienen mediante procesos costosos, extensos e ineficientes.

Estos inconvenientes de producción se pueden ver claramente en la liraglutida conocida en México con la marca Victoza. Este análogo de GLP-1 hace uso de varias metodologías ya patentadas para su producción, una de ellas es por biotecnología la cual consta de varias etapas; 1) expresión de ADN recombinante que codifica un precursor del análogo de GLP-1, utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, 2) separación del precursor expresado en el medio de cultivo, 3) adicción de un grupo espaciador de ácido glutámico, 4) unión del grupo espaciador con un ácido graso, 5) eliminación de la extensión N-terminal mediante escisión química o enzimática y finalmente, 6) purificación del polipéptido maduro por método de fase solido líquido.

Por otro lado, también utiliza la metodología de solido líquido, que consta de anclar los aminoácidos terminales protegidos a una resina, sin embargo este método conlleva más etapas: 1) taponar la resina, 2) desproteger selectivamente el grupo amino, 3) acoplar el extremo carboxilo del siguiente aminoácido protegido en N al grupo amina en presencia de un reactivo de acoplamiento, 4) repetir los pasos 2) y 3) para formar una secuencia de péptidos, 5) eliminar el grupo protector de la cadena lateral de lisina, 6) realizar el acoplamiento con el palmitoyl-Glu-OtBu, 7) escindir el péptido con una mezcla de cóctel de la resina para aislar la cadena lineal de análogo del GLP-1 y finalmente, 8) purificar el análogo de GLP-1 por HPLC<sup>55,56,57</sup>.

Por este conjunto de áreas de oportunidad, la ingeniería genética ha optado por la investigación y diseño de nuevas formas de producción con el fin

de evitar los inconvenientes de los procesos existentes y buscando nuevas formas de administración de este tipo de medicamentos mediante la búsqueda de microorganismos versátiles, genéticamente modificados que sinteticen y liberen directamente el fármaco al epitelio intestinal de manera continua para contrarrestar las posibles barreras del tracto gastrointestinal, logrando un efecto prolongado, más cómodo para el paciente y ayudando al apego del tratamiento.

## **1.2 Biotecnología de *Lactococcus lactis*.**

### *1.2.1 Generalidades de Lactococcus lactis.*

Desde hace varias décadas se han desarrollado sistemas para la mejora y síntesis de proteínas recombinantes con propiedades terapéuticas. Uno de los microorganismos más utilizados para estos fines es *Escherichia coli* (*E.coli*) por los altos niveles de proteína que produce. Sin embargo, los sistemas que se emplean en esta Gram-negativa se centran en la producción de proteínas a nivel intracelular, lo que implica la remoción de lipopolisacáridos y endotoxinas, así como, procesos de purificación complicados y costosos.

Por otro lado, las proteínas recombinantes que se expresan en Gram-positivas son fácilmente secretadas al medio de cultivo favoreciendo así su obtención. *Bacillus* es uno de los géneros Gram-positivos más utilizados. Sin embargo, debido a que estas bacterias cuentan con complejos proteolíticos en la

superficie celular y secretados al medio de cultivo, gran parte de las proteínas recombinantes que se producen son degradadas.

Para evitar estas complicaciones se han empezado a utilizar bacterias ácido lácticas (LAB) como una alternativa. *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) es una especie perteneciente a las LAB catalogada como una bacteria Generalmente Reconocida Como Segura (GRAS), ya que no es colonizadora del tracto gastrointestinal ni genera endotoxinas, por lo que es ampliamente utilizada en la industria alimenticia. Debido a estas cualidades, la cepa *L. lactis subsp. cremoris* MG1363 se ha utilizado con fines de producción de proteínas recombinantes en el laboratorio. Esta cepa carece de plásmidos, es fácil de manipular, no presenta cuerpos de inclusión, tiene promotores de expresión inducibles en su genoma y genera una única proteína (USP45) al medio extracelular y en contraste a las bacterias Gram-negativas como *E. coli* y Gram-positivas como *Bacillus subtilis*, no secreta proteasas al medio extracelular y solo cuenta con una peptidasa señal de membrana, por lo que presenta un gran potencial para secretar proteínas al medio extracelular sin degradarlas<sup>58,59</sup>.

### 1.2.2 Mecanismo de secreción de las proteínas en *Lactococcus lactis*.

Aunado a todas estas ventajas, en *L. lactis* está ampliamente estudiado el mecanismo por el cual se direccionan y secretan las proteínas, llamado vía

general de secreción (vía-Sec) representado en la figura 1. El inicio de esta vía en *L. lactis* es posible por la presencia de un péptido señal natural denominado PSUsp45 unido a la forma inmadura de la principal proteína que es secretada al medio extracelular, llamada hidrolasa de ubiquitina carboxilo terminal 45 (Usp45)<sup>59</sup>. De manera general, un péptido señal es una secuencia extra de 15 a 30 aminoácidos que se encuentra unido a la región N-terminal de las proteínas inmaduras que serán secretadas. Esta secuencia, en *L. lactis* se compone de tres regiones características, una región N-terminal compuesta por aminoácidos positivos, una región medial hidrófoba y una región C-terminal polar que contiene el sitio de escisión entre el péptido señal y la proteína inmadura.

Las tres regiones destacadas en el péptido señal, son piezas clave para la secreción y direccionamiento de la proteína Usp45 inmadura recién sintetizada hacia el translocón en la pared celular. El translocón, ubicado como el inciso a) en la figura 1, es un complejo que se compone de proteínas llamadas Sec. Las subunidades SecY, SecG y SecE; forman el canal hidrófobo en donde la región medial del péptido señal es atrapada y a través del cual las proteínas inmaduras son conducidas por la membrana celular al medio extracelular; mientras que SecA es la subunidad ATPasa dependiente que proporciona la fuerza motora para realizar dicha translocación. Finalmente, la peptidasa señal tipo I señalada con el inciso b), es la subunidad que realiza la separación del péptido señal, generando la liberación de la proteína en su forma madura al complejo de proteínas de control de calidad como chaperonas y factores de plegado, para

posteriormente darse la secreción al medio extracelular, o en caso de estar mal plegada dirigirla a su degradación en la proteasa de membrana HtrA<sup>60,61</sup>.

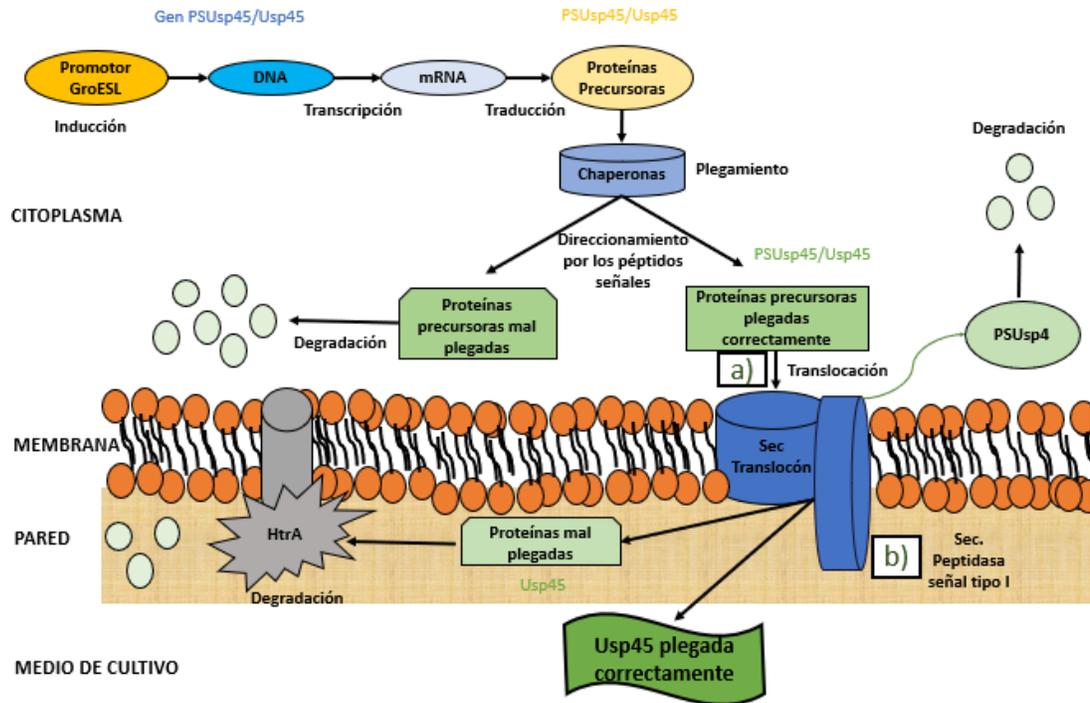


Figura 1. Mecanismo teórico del direccionamiento y secreción de la proteína Usp45 por el PSUsp45 en *L. lactis*.

### 1.2.3 Producción de proteínas heterólogas en *Lactococcus lactis*.

El conocimiento de estos mecanismos, junto al desarrollo de herramientas genéticas, han permitido utilizar con éxito al PSUsp45, así como, ha abierto las

puertas para la creación de nuevos péptidos señales como PS310, AL9 y PSExp4, con el fin de producir proteínas recombinantes tanto homólogas como heterólogas, secretadas al medio extracelular en *L. lactis*. Este último péptido señal (PSExp4) con eficiencias de secreción iguales o mayores que el de PSUsp45<sup>62</sup>.

Por otro lado, gracias al estudio y comparación de múltiples promotores constitutivos e inducibles utilizando genes reporteros, como la nucleasa B (Nuc), se han desarrollado múltiples vectores de expresión en *L. lactis*. Los sistemas inducibles tienen una ventaja sobre los constitutivos, ya que, disminuyen el riesgo de sobre expresión de las proteínas recombinantes y evitan la acumulación de las mismas en el citoplasma de las bacterias en concentraciones tóxicas<sup>63,64</sup>.

Actualmente se aceptan varios sistemas con promotores como Zirex y PxyIT que son inducidos por disponibilidad de Zinc y Xilosa, respectivamente, aunque el sistema que presenta mayor éxito de expresión es el controlado por el péptido antimicrobiano nisina, llamado NICE, que emplea generalmente el plásmido pNZ8048. A manera de desventaja, estos sistemas requieren la presencia de genes reguladores, en algunos casos presencia de moléculas inductoras costosas que limitan las condiciones del proceso de producción, además de requerir procesos de inducción de las cepas recombinantes antes de su uso, en caso de ser utilizada *in situ*<sup>59</sup>.

Es por esto que recientemente se han desarrollado sistemas de expresión autoinducibles, como los vectores de expresión inducidos por disminución de pH, aumento de la concentración de carbohidratos, disminución de temperatura, choque térmico (aumento de la temperatura) y los inducibles por estrés. Estos últimos son de especial interés, debido a que en *L. lactis* se sobreexpresa el operón GroESL en condiciones de estrés celular. El operón GroESL regula la expresión de una familia de proteínas llamadas GroE de 60 KDa (complejo GroEL-GroES), las cuales, son las encargadas del plegamiento de las proteínas recién sintetizadas y el replegamiento de las proteínas desnaturalizadas, por las diferentes condiciones de estrés como: radiación ultravioleta (UV), aumento de concentración salina, disminución de pH y choque térmico. Por ello, el promotor GroESL (pGroESL) ha sido clonado de la cepa de *L. lactis* MG1363 en plásmidos como el pLB263 y subclonado en plásmidos que contienen genes reporteros como la nuc unida al PSExp4 dando origen a plásmidos como el pLB333 autoinducibles por estrés, teniendo resultados iguales o superiores a sistemas como el NICE<sup>65,66</sup>.

Gracias a la versatilidad de estos sistemas de expresión en *L. lactis* y la combinación con los diferentes péptidos señales, se permite maximizar la secreción y producción de las proteínas recombinantes con efectos terapéuticos, así como proveer una nueva forma de administración de los fármacos.

### 1.3 Antecedentes.

Aprovechando todas las herramientas en *L. lactis*, desde hace varias décadas se han realizado ensayos exitosos de la producción y secreción de interleucinas y agonistas de interleucinas, biológicamente activos mediante la administración local de esta bacteria. Uno de los primeros estudios relacionados fue el efectuado por *Steidler, L. et al.*, en 2001, ellos construyeron una cepa de *L. lactis* capaz de producir y secretar la IL10 humana recombinante, utilizando como transporte de secreción al PSUsp45. La IL10 al unirse a su receptor IL10R $\alpha$  expresado en células epiteliales del colon, es un potente antiinflamatorio que previene la colitis. Esto gracias a que inhibe la señalización dada por la unión de lipopolisacáridos e IL6 a sus respectivos receptores, reduciendo la expresión de varias citocinas inflamatorias como IL6, TNF e IL1; debido a estas cualidades, probaron esta cepa recombinante administrando una carga de  $2 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC), para la producción y secreción de IL10 *in situ* durante un periodo de 7 días, mediante una sonda nasogástrica en un modelo murino de colitis inducido por sulfato de dextrano sódico (DSS). Estos ensayos demostraron que la cepa recombinante era resistente a las secreciones biliares y al pH del estómago, así como ser capaz de migrar al colon, producir la IL10 y secretarla, lo que redujo en un 50 % la inflamación en el modelo de ratón empleado. Estos resultados les permitieron concluir que el uso de este método y

el empleo de esta vía de administración, puede ser una alternativa al tratamiento sistémico convencional para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal (EII)<sup>67,68</sup>.

Por otro lado, también se ha usado toda la maquinaria de *L. lactis* para la producción de proteínas recombinantes con la finalidad de provocar una respuesta del sistema inmune, como alternativa a las vacunas contra el virus del papiloma humano16 (VPH16). *Bermúdez-Humarán, L. et al.*, en 2002, crearon una cepa de *L. lactis* inducible por nisina, capaz de expresar y exportar al medio de cultivo la proteína E7 mediante la vía PSUsp45. Este antígeno, se expresa constitutivamente en los carcinomas cervicales, causando la pérdida de control del ciclo celular y favoreciendo a la transformación a células mutadas. La cepa transformada pudo secretar de forma estable 5 µg/ml de la proteína E7 del VPH16, creando un antecedente importante como punto de partida para la purificación de proteínas secretadas al medio extracelular libre de contaminantes tóxicos<sup>69</sup>.

Debido al éxito obtenido en los ensayos anteriores, *Bermúdez-Humarán, L. G. et al.*, volvieron a utilizar una metodología similar en 2003, demostrando la habilidad de la cepa de *L. lactis* para producir y secretar la IL12 murina con dos puentes disulfuro (modificación postraduccional) biológicamente activa, administrándola de manera local. En este estudio, fusionaron los genes de los PSUsp45 y PSExp4 con el gen de la IL12 y el gen de la IL12 truncado en dos

subunidades (IL12 p35-p40), respectivamente. Posteriormente, transformaron dos cepas con estos vectores y determinaron su eficiencia de producción, registrando 25 pg/ml para IL12 truncado y 65 pg/ml para IL12. Esta citocina es una potente inductora del Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) en células T, células B, células dendríticas y macrófagos, confiriendo efectos de inmunoprotección en respuesta a infecciones bacterianas, virales y parasitarias, sin embargo, administrada de manera sistémica confiere una alta toxicidad. Es por esto, que seleccionaron esta última cepa para probar su efecto *in vitro* en esplenocitos de ratón e *in vivo* por la administración intranasal en ratones expuestos al antígeno E7 del virus del papiloma humano. El ensayo *in vivo* confirmó la inducción de IFN- $\gamma$ , mientras que, esta misma cepa productora de IL12 inducida y secretada *in situ*, mejoró la respuesta inmune de la mucosa local de los ratones<sup>70</sup>.

Años más tarde, en 2009 *Vandenbroucke, H. et al.*, dieron otro enfoque a la producción de proteínas terapéuticas contra la enfermedad inflamatoria intestinal; a diferencia de los estudios realizados por *Steidler, L. et al.*, en este se construyó una cepa de *L. lactis* recombinante para la producción de fragmentos de anticuerpos contra el TNF- $\alpha$ , con la finalidad de buscar nuevas estrategias a la administración sistémica de anticuerpos, que, actualmente es costosa y con efectos secundarios no deseados. Administrando la cepa recombinante productora de anti- TNF- $\alpha$  en un modelo de colitis murino inducido por DSS. Este estudio indicó, que la cepa recombinante, generaba anticuerpos capaces de neutralizar al TNF- $\alpha$  *in vitro* y con una eficiencia de secreción superior a los

estudios anteriores, siendo de 135 ng/ml, mientras que en el estudio *in vivo*, la cepa de *L. lactis* recombinante administrada por sonda nasogástrica, fue capaz de disminuir los efectos de la colitis inducida por DSS en el modelo murino<sup>71</sup>.

Otro tipo de proteínas que se han generado en *L. lactis* son las que tienen un efecto anticancerígeno. A manera de ejemplo, se encuentra el estudio realizado recientemente por *Ciaćma, K. et al.*, en 2018. Ellos utilizaron un plásmido inducible por nisina que contenía el gen para el PSUsp45 unido al ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL). La proteína TRAIL pertenece a la familia del TNF, que ayuda a inducir apoptosis en células cancerosas, sin afectar a células no transformadas. En esta investigación, cuantificaron mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) la cantidad de proteína secretada al medio de cultivo, posterior a 4 horas de inducción, logrando una concentración media de 97.4 ng/ml. Así mismo, se realizó un ensayo *in vitro* utilizando la línea celular HCT116 de cáncer de colon humano, expuesta a diferentes concentraciones de la proteína TRAIL recombinante, secretada en cocultivo por la cepa de *L. lactis* construida. Estos estudios, arrojaron una viabilidad disminuida en las células cancerígenas tratadas con el sobrenadante que contenía las proteínas TRAIL recombinantes, infiriendo que la proteína exportada conservaba su actividad biológica, induciendo la apoptosis<sup>72</sup>.

En lo que respecta a la diabetes mellitus, se han realizado varios estudios utilizando *L. lactis* desde hace una década. Uno de ellos, es el realizado por *Daphne, T.W. Ng., et al.*, en 2011, utilizando *L. lactis* NZ9000. Esta cepa, se transformó con el plásmido pNZP inducible por nisina, que contenía los genes del PSUsp45 unido a SCI-57. Este último gen (SCI-57) codifica un análogo de insulina con una mayor estabilidad y afinidad por el receptor de insulina. Después de una inducción por 4 h analizaron el sobrenadante de la cepa recombinante mediante un Western Blot, en donde observaron una banda correspondiente a la proteína secretada. Asimismo, corroboraron su actividad biológica, mediante un *ensayo in vitro* de unión a su receptor, utilizando la línea celular 3T3-L1 de adipocitos. Este estudio, abrió las puertas para el uso de esta metodología para la producción y posible vía de administración de fármacos en el tratamiento de la diabetes tipo 1<sup>73</sup>.

De la misma manera, *Yanjun, Ma. et al.*, en 2014, exploraron la producción de la proteína de choque térmico HSP65 fusionada con la DiaPep227 en *L. lactis* utilizando un sistema de inducción constitutivo inducible por pH, combinado con el sistema de secreción por el PSUsp45. Estas proteínas se han visto implicadas en la modulación inmunológica de las células  $\beta$  en modelos de ratones con DM1 no obesos, es por esto, que después de comprobar la expresión de las proteínas por Western Blot, llevaron a cabo un estudio *in vitro*, evaluando la producción de citocinas en esplenocitos de ratón, en respuesta a la exposición por 72 h de la proteína de fusión expresada en *L. lactis*, encontrando un nivel reducido de IFN-

y un nivel de IL10 significativamente elevado en comparación de los controles, así mismo, de manera *in vivo*, realizaron una prueba de prevención de DM1 en ratones no obesos con DM1, observando una reducción mayor al 70 % en el desarrollo de la DM1 en contraste con el grupo control, pudiendo demostrar una posible aplicación farmacéutica de *L. lactis* recombinante vía oral, para prevenir la aparición de esta enfermedad<sup>74</sup>.

Por otra parte, en lo que respecta a la investigación para tratar la DM2, fue hasta el año 2014 que *Agarwal, P. et al.* dentro de sus investigaciones expresaron el GLP-1 unido al PSUsp45, empleando *L. lactis*. En este estudio, evaluaron el efecto insulínico dependiente de glucosa en células  $\beta$  del páncreas (HIT-T15), así como, su efecto para disminuir la concentración de glucemia en ratas ZDF (por sus siglas en inglés The Zucker Diabetic Fatty) después de administrarles la cepa recombinante por vía oral. Los resultados obtenidos, mostraron una liberación de 190 % mayor de insulina por parte de las células HIT-T15, en comparación con el control negativo y un efecto igual que el GLP-1 comercial, mientras que en el estudio *in vivo*, encontraron que el nivel de glucemia de las ratas tratadas previamente con la cepa recombinante por vía oral, disminuyó de un 10 a 20 % en las muestras tomadas después de haberse administrado la carga de glucosa, en comparación con el control negativo (cepa transformada con el vector vacío), sin embargo, en esta prueba no utilizaron un control positivo (GLP-1 comercial), dejando un área de oportunidad para que los resultados pudieran ser concluyentes<sup>49</sup>.

Recientemente, fue publicada una investigación realizada en 2016 por Arora, T. et al. estudiando la secreción extracelular y el efecto insulínico del péptido señal PSUsp45 unido al GLP-1 murino (1-37) producido en *L. lactis* en islotes primarios de ratones WT (cepa salvaje), así como, su efecto al administrar la cepa recombinante por vía oral en ratones con dieta regular y en ratones con dieta alta en grasa, observando una liberación mayor de insulina (130 ng/ml) en los islotes primarios de los ratones WT tratados con el medio extracelular de *L. lactis* transformado frente al control negativo (medio extracelular de *L. lactis* con el vector vacío), sin embargo, el nivel de liberación de insulina fue aproximadamente la mitad en comparación al control positivo (GLP-1 comercial). Además, observaron una disminución en la concentración de glucosa, así como, un incremento en la concentración de insulina plasmática en los ratones WT de dieta regular y dieta alta en grasa tratados con la cepa recombinante durante la prueba de tolerancia a la glucosa, en comparación con el control negativo (*L. lactis* con el vector vacío). Nuevamente en este estudio, no se utilizó un control positivo (GLP-1 comercial) para la prueba *in vivo*<sup>75</sup>.

Un año más tarde, Zeng, Z. et al. exploraron la expresión y secreción de exendina-4 por parte de la cepa de *L. lactis* NZ9000, haciendo uso del PSUsp45 como medio de secreción, así como del sistema de expresión controlado por nisina (NICE). Una vez identificado el péptido en el sobrenadante, empleando la

técnica de Western Blot, realizaron un ensayo *in vitro* con la línea celular INS-1 perteneciente a células  $\beta$  pancreáticas de rata, para observar el efecto insulínico y el aumento de la proliferación celular, con la técnica de citometría de flujo para este último, consiguiendo que las células INS-1 secretaran mayor cantidad de insulina en presencia de la cepa de *L. lactis* recombinante que secreta exendina-4 en comparación con los controles negativos y observando un efecto similar que los controles positivos estimulados con GLP-1 y exendina-4 comercial. Además, en el ensayo de proliferación de células INS-1 encontraron que *L. lactis* que secreta exendina-4 promueve la proliferación de manera moderada de la misma manera que lo hacen los controles positivos, dejando como perspectiva el empleo de esta cepa recombinante en ensayos *in vivo*<sup>76</sup>.

A pesar de los avances, el gran interés por *L. lactis* y el potencial que tiene el GLP-1 como un medicamento para la DM2, no existen estudios reportados comparando la actividad *in vitro* de la secreción extracelular del PSUsp45 unido al GLP-1 modificado en *L. lactis*, frente a otros péptidos señales, así como resultados concluyentes *in vivo*, dejando un área de oportunidad para su investigación en el futuro; por ende, en este estudio se comparó la eficiencia *in vitro* de la secreción extracelular en *L. lactis* de los PSUsp45 y PSExp4 unidos a un nuevo análogo de GLP-1 (NAGLP-1) modificado, así como, se evaluó la actividad hipoglucemiante en un modelo murino diabetizado, con los debidos

controles.

#### 1.4 Hipótesis.

El nuevo análogo de GLP-1 modificado unido a los péptidos señales Usp45 y Exp4 producido en *Lactococcus lactis* se secretará al medio extracelular *in vitro* y la administración de la bacteria vía oral tendrá un efecto hipoglucemiante en un modelo murino diabetizado.

#### 1.5 Objetivos.

##### 1.5.1 Objetivo general.

Expresar en *Lactococcus lactis* un nuevo análogo de incretina unido a los péptidos señales Usp45 y Exp4 y evaluar su efecto hipoglucemiante mediante administración oral en un modelo murino diabetizado.

##### 1.5.2 Objetivos específicos.

- Diseñar mediante bioinformática las unidades de transcripción sintética pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 y PSExp4/NAGLP-1.
- Construir los plásmidos recombinantes (pDJ331 y pDJ332) para expresión y secreción de un nuevo análogo de GLP-1 en *L. lactis*.

- Transformar la cepa de *L. lactis* con los plásmidos recombinantes.
- Expresar y comparar la eficacia de secreción de las proteínas de ambas cepas recombinantes (*L.I-DJ331* y *L.I-DJ332*).
- Desarrollar el modelo murino diabetizado.
- Evaluar el efecto hipoglucemiante del nuevo análogo de GLP-1 recombinante de las cepas *L.I-DJ331* y *L.I-DJ332* administradas vía oral en un modelo murino diabetizado.

### **1.6 Aportación científica.**

Contribuir con la evaluación de la capacidad de secreción extracelular de dos péptidos señales: Usp45 y Exp4 en *L. lactis*, y contribuir con el desarrollo de un nuevo fármaco incretina recombinante con una posible nueva vía de administración, con la finalidad de ayudar al apego y comodidad del tratamiento de la DM2.

## CAPÍTULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### **2.1 Bioinformática.**

##### *2.1.1 Diseño bioinformático de las unidades de transcripción sintéticas pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 y PSExp4/NAGLP-1.*

El diseño bioinformático de la Unidad de Transcripción Sintética (UTS) pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 se realizó con la ayuda de la base de datos de secuencias genéticas GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), en esta plataforma se realizó la búsqueda de la secuencia de 461 aminoácidos de la proteína Usp45 (incluyendo su péptido señal) por *L. lactis* (secuencia de referencia AAA25230.1), de los cuales, gracias a la base de datos Universal Protein (UniProt, secuencia de referencia P22865), se ubicó una región de 27 aminoácidos correspondientes al PSUsp45, mismo que realizará la función de dirigir la proteína recombinante de interés por la vía general de secreción (Sec). De manera similar, se realizó la búsqueda de la secuencia de nucleótidos codificante completa de la proteína Usp45 secretada por *L. lactis* (secuencia de

referencia: M60178.1), correspondiente a 1,592 pb, de la cual se ubicó y seleccionó la región de 81 nucleótidos pertenecientes al codón de inicio de la traducción ATG y al péptido señal de la misma proteína (PSUsp45) previamente ubicado.

De manera simultánea, se realizó la búsqueda de la secuencia de nucleótidos del RNA mensajero del proglucagón (secuencia de referencia: NM\_002054.5) y con ayuda de la base de datos UniProt (secuencia de referencia P01275), se seleccionó la región codificante de la proteína GLP-1 de 93 pb. Una vez encontrada esta secuencia se sustituyó el segundo codón GCT que codifica para Ala por el codón GGG codificante de Gly, así mismo se eliminó el penúltimo codón CGA que codifica para Arg, dando lugar un nuevo gen que codifica a un NAGLP-1, esto con el objetivo de resistir al ataque de la DPP4 y extender la vida media del péptido en el organismo. También se agregó en el extremo 3' el codón de paro de la traducción TGA.

Posteriormente, se realizó la fusión de ambas secuencias de nucleótidos para dar origen al gen PSUsp45/NAGLP-1. Este gen se analizó por medio de la herramienta informática ExPASy translate tool, con el objetivo de buscar el marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés), asegurando la correcta traducción *in silico* de la proteína recombinante PSUsp45/NAGLP-1.

A la par, se realizó una predicción *in silico* de la proteína recién traducida PSUsp45/NAGLP-1, para valorar su procesamiento a nivel de membrana celular por parte de la peptidasa señal tipo I. Para esto, se utilizó la herramienta informática SignalP, en donde se observó la necesidad de agregar un codón extra (GAT) que codifica para el aminoácido Asp, con la función de enlazar PSUsp45 con el NAGLP-1.

Una vez teniendo estos datos, se tomó la secuencia de nucleótidos del promotor GroESL (pGroESL) del plásmido PLB333 (pLB333) (Figura 2), con la finalidad de fusionarlas con el gen PSUsp45/NAGLP-1 y obtener la UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1.

También, se le agregaron los sitios de restricción *BglII* en el extremo 5' y *EcoRI* en el extremo 3', para su uso posterior en la etapa de clonación molecular.

Por último, se envió a sintetizar la UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 a la compañía General Biosystems solicitando una optimización de codones para *L. lactis* de la región PSUsp45/NAGLP-1 de la UTS. Recibiendo estos datos *in silico* proporcionados por la compañía General Biosystems, se volvieron a verificar todos los pasos anteriormente mencionados para asegurar la correcta expresión, exportación y corte de la proteína de interés.

Por otro lado, se realizó el diseño bioinformático de la UTS PSExp4/NAGLP-1, haciendo uso nuevamente de la base de datos GenBank del NCBI, en donde se realizó la búsqueda de la secuencia de 144 aminoácidos del precursor parcial de la proteína extracelular Exp4 expresada en *L. lactis* (secuencia de referencia AAC14604.1), de los cuales, gracias a la base de datos UniProt (secuencia de referencia O66086), se ubicó una región de 13 aminoácidos correspondientes al 52 % de la región 3' del PSExp4, el cual se completará con el pLB333 más adelante en la etapa de clonación. El PSExp4, al igual que el PSUsp45, realizará la función de dirigir la proteína recombinante de interés por la vía general Sec.

Asimismo, se realizó la búsqueda de la secuencia de nucleótidos del gen parcial de la proteína Exp4 secretada por *L. lactis* (secuencia de referencia: U95836.1), correspondiente a 432 pb, de la cual se seleccionó la región de 39 nucleótidos pertenecientes a los 13 aminoácidos del PSExp4 ubicados previamente.

Para diseñar el gen PSExp4/NAGLP-1, se utilizó el mismo gen NAGLP-1 anteriormente diseñado, manteniendo la sustitución del segundo codón GCT que codifica para Ala por el codón GGG codificante de Gly y la eliminación del penúltimo codón CGA que codifica para Arg, confiriéndole la misma propiedad de

resistencia a la DPP4, así como la secuencia paro de la traducción TGA en el extremo 3´.

El gen recién diseñado PSExp4/NAGLP-1, se analizó completamente por medio de la herramienta informática ExpASY translate tool, con el objetivo de buscar el ORF, asegurando la correcta traducción *in silico* de la proteína recombinante PSExp4/NAGLP-1 y se realizó una predicción *in silico* de la proteína recién traducida, para valorar su procesamiento a nivel de membrana celular por parte de la peptidasa señal tipo I, utilizando nuevamente SignalP, en donde se observó también la necesidad de agregar un codón extra (GAT) que codifica para el aminoácido Asp, al final del PSExp4.

Una vez obtenidos estos datos del gen diseñado PSExp4/NAGLP-1, se le agregaron los sitios de restricción *NheI* en el extremo 5´ y *EcoRI* en el extremo 3´, para su uso posterior en la etapa de clonación molecular.

Por último, se envió a sintetizar la UTS PSExp4/NAGLP-1 a la compañía General Biosystems solicitando una optimización de codones para *L. lactis*. Al obtener los datos *in silico* proporcionados por la compañía General Biosystems, se volvieron a verificar todos los pasos anteriormente mencionados para asegurar la correcta expresión, exportación y corte de la proteína de interés.

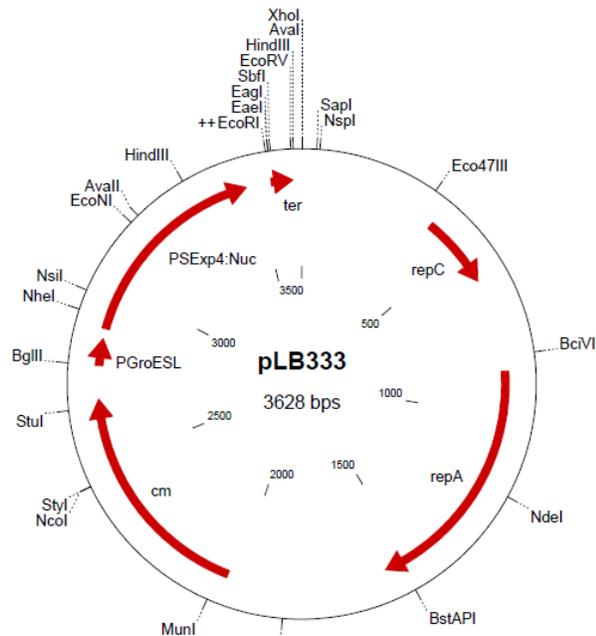


Figura 2. Estructura molecular del plásmido pLB333

## 2.2 Manipulación de *Lactococcus lactis*.

### 2.2.1 Cepas.

Para el proceso de clonación y transformación celular, se utilizó la cepa silvestre libre de plásmidos *Lactococcus lactis subespecie cremoris* MG1363 y la cepa que contiene el pLB333 *L. lactis subespecie cremoris* MG1363, donadas amablemente por el Dr. Luis Bermúdez Humarán (French National Institute for Agriculture, Food, and Environment, INRAE).

### 2.2.2 Plásmido.

Se utilizó el pLB333 (Figura 2), donado amablemente por el Dr. Luis Bermúdez Humarán, con un peso molecular de 3,628 pb. Este plásmido, cuenta con un sitio de clonación múltiple y está dotado de varios sitios de escisión por enzimas de restricción a lo largo de toda su secuencia, de los cuales, se destacan los sitios de corte para las enzimas de restricción *NheI*, *BglII* y *EcoRI*, utilizados en los pasos de la clonación molecular del presente trabajo. Además, cuenta con los genes *repA* y *repC*, que le confieren la posibilidad de su replicación tanto en *E. coli* así como en distintas especies de bacterias ácido lácticas.

Por otro lado, cuenta con un gen de resistencia al cloranfenicol (Cm) utilizado como marcador de selección, además de contar con el promotor GroESL, permitiéndole inducir la expresión de los genes subsecuentes cuando la bacteria que contenga este plásmido se exponga a estrés (pH bajo, alta concentración de sales y temperaturas elevadas para su crecimiento). También, cuenta con el gen que codifica el PSExp4 fusionado con la Nuc estafilocócica, con su respectivo terminador de la transcripción.

### 2.2.3 Medios de cultivo y antibiótico.

La cepa libre de plásmidos se inoculó en Caldo M17 (M17C) suplementado con glucosa al 0.01 % (G-M17C) a 30 °C sin agitación en anaerobiosis. Mientras que, para aislar colonias, las bacterias se sembraron en placas de Petri, con el medio de cultivo antes mencionado, adicionado con agar bacteriológico (G-M17A). Las bacterias electrocompetentes se prepararon utilizando el medio G-M17C, suplementado con sacarosa 0.5 M y glicina al 2.5 % (G-SGliM17C). Se empleó el medio G-M17C de recuperación posterior a la electroporación, complementado con 20 mM MgCl<sub>2</sub> más 2 mM CaCl<sub>2</sub> (G-M17C/MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub>). La cepa portadora del pLB333 se inoculó en el caldo G-M17C suplementado con el antibiótico cloranfenicol a una concentración final de 10 µg/ml (G-CIM17C), mientras que, para aislar y seleccionar las bacterias transformadas con el pLB333 y los plásmidos recién construidos llamados Diego Jaramillo 331 (pDJ331) y Diego Jaramillo 332 (pDJ332), se utilizó el medio de cultivo G-CIM17C suplementado con agar-DNA-azul de toluidina (G-CIM17CAD).

### 2.2.4 Reactivación de *Lactococcus lactis*.

La reactivación inicial se realizó por medio de raspado con asa estéril a un vial criogénico conteniendo la cepa almacenada a -80 °C. La asada se inoculó en un tubo falcón con 5 ml de medio G-M17C fresco. El inóculo se dejó crecer a 30

°C por 12 h, sin agitación en un ambiente anaerobio.

### *2.2.5 Preparación de bacterias electrocompetentes.*

Para preparar las bacterias *L. lactis* libre de plásmidos electrocompetentes, se reactivaron de la manera descrita previamente y se inocularon 50 ml del cultivo en 5 µl de medio G-SGliM17C fresco. El inóculo, se incubó a 30 °C durante 12 h sin agitación en aerobiosis, una vez transcurrido el tiempo, se tomaron 500 µl del cultivo anterior y se inocularon en 50 ml de medio G-SGliM17C fresco, y una vez más, se incubaron por 12 h a las mismas condiciones, después, el inóculo completo se vació en 400 ml de medio G-SGM17C fresco y se dejó crecer hasta llegar a una densidad óptica 600 nm (D.O. 600 nm) de 0.2 - 0.3. Llegada la D.O., se distribuyó el cultivo en tubos falcón de 50 ml y se centrifugaron durante 20 min a 5500 revoluciones por minuto (RPM) a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el botón celular se lavó con una solución de 0.5 M sacarosa y glicerol al 10 % a 4 °C. Después, se centrifugaron las muestras a las mismas condiciones y pasado el tiempo, se descartó el sobrenadante y se volvió a realizar un lavado al botón celular pero ahora con una solución de 0.5 M sacarosa, glicerol al 10 % y 50 mM EDTA a 4 °C. El cultivo resultante se centrifugó en las mismas condiciones, y al finalizar, se eliminó el sobrenadante y se lavaron las células con 0.5 M sacarosa y 10 % glicerol a 4 °C, por último, el cultivo se centrifugó durante 20 min a 5500 RPM a 4 °C, del cual, se eliminó la solución de lavado y se resuspendieron los

botones celulares en 1ml de polietilenglicol 3000. De manera adicional, realizaron alícuotas de 100 µl en tubos eppendorf de 1.5 ml y se almacenaron a -80 °C para su uso posterior.

#### *2.2.6 Transformación de *Lactococcus lactis* electrocompetente con el pLB333.*

Para la transformación de las bacterias electrocompetentes libres de plásmido, se mezclaron a una temperatura de 0 °C 100 µl de bacterias electrocompetentes con 1 µl del pLB333 (aproximadamente 100 ng) y se colocaron en una cubeta de electroporación de 0.2 cm Bio-Rad®, esta misma se expuso rápidamente a un pulso eléctrico de 2000 V, 25 µF y 200 Ω por 5 milisegundos, en un electroporador Eppendorf Eporator®, inmediatamente después de la descarga eléctrica se adicionó a la cubeta de electroporación 1 ml de medio G-M17C/MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub> y se incubó por 1.5 h a 30 °C sin agitación, posteriormente, se tomaron las bacterias y se sembraron con la técnica de extensión en placa con ayuda de una varilla de vidrio tipo L, sobre una placa de Petri con el medio de cultivo G-CIM17CAD y se dejaron crecer durante 48 h a 30 °C. Así mismo, se realizó el mismo procedimiento descrito previamente en bacterias electrocompetentes libres de plásmido sin la presencia de ningún vector a manera de control negativo. Transcurrido el tiempo antes mencionado, se seleccionaron las colonias transformantes puestas bajo el nombre de *L.I-PLB* y se inocularon con ayuda de un asa bacteriológica en caldo de cultivo G-CIM17

por 12 h a 30 °C sin agitación y se realizaron stocks almacenados a -80 °C para su posterior confirmación.

### *2.2.7 Preparación de stocks.*

Para preparar los stocks de células transformadas, se inocularon 100 µl de bacterias crecidas por 12 h en 5 ml de caldo de cultivo G-CIM17C y se dejaron crecer a una temperatura de 30 °C por 12 h, sin agitación. Transcurridas las 12 h, se le agregó 1.6 ml de glicerol al 60 % estéril y se mezcló por pipeteo suave. Finalmente se prepararon alícuotas en tubos criogénicos y se almacenaron a -80 °C para su uso posterior.

## **2.3 Clonación molecular.**

### *2.3.1 Extracción del pLB333 de la cepa L.I-PLB.*

Para la extracción del pLB333 de la cepa *L.I-PLB* recién transformada, se reactivaron de la manera ya descrita en líneas que anteceden y se inocularon 100 µl del cultivo en 10 ml de medio G-CIM17C, dejándose crecer a 30 °C durante 12 h sin agitación. Del cultivo anterior se tomaron 5 ml, se centrifugaron por 10 min a 5,500 x g a 4 °C, descartándose el sobrenadante y adicionándose 200 µl del buffer TES/Lis (Tris-HCl 0.05 M, pH 8.0, EDTA 0.001 M, pH 8, sacarosa 25 %, lisozima 10 mg/ml), incubándose por 1 h a 37 °C. Luego, se agregaron 200 µl

de buffer de lisis (NaOH 0.25 M, SDS 1 %) y se mezcló por inversión durante 3 min, después, se adicionaron 200 µl de acetato de potasio 3 M (pH 5.5) frío, se volvió a mezclar por inversión por 5 min y se incubó por 15 min más a 4 °C. Seguido a esto, se centrifugó durante 30 min a 17,000 x g a una temperatura de 4 °C, una vez transcurrido el tiempo, se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo de 2 ml al cual se le agregó 5 µl de RNasa A (10 mg/ml) y se incubó durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se adicionó 1 volumen de PCI 25:24:1 (fenol;cloroformo;alcohol-isoamílico), se mezcló por inversión por 1 min y se centrifugó por 15 min a 17,000 x g a 4 °C, después de tiempo transcurrido, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo de 2 ml y se adicionó 1 volumen de CI 24:1 (cloroformo;alcohol-isoamílico), se agitó por inversión por 1 min y nuevamente se centrifugó a las mismas condiciones, luego, se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo de 2 ml, se agregó 1 volumen de acetato de sodio 0.3 M pH 5.2, más 1 volumen de isopropanol al 100 %; a continuación, se mezcló por inversión y se centrifugó a 17,000 x g durante 30 min a 4 °C. Transcurrido el tiempo, cuidadosamente se descartó el sobrenadante y se lavó el botón de plásmido dos veces con 1 ml de etanol al 70 % a 4 °C, se centrifugó a 17,000 x g por 15 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Finalmente, el botón se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O estéril grado molecular.

2.3.2 Caracterización del pLB333.

Ahora bien, después de la extracción del pLB333, se llevó a cabo una digestión por 1 h con una enzima de restricción para verificar el peso molecular del vector frente a un marcador de peso molecular Thermo Scientific GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Para esto, se utilizó la enzima *EcoRI* a las condiciones mencionadas en la tabla 1, y finalizado el ensayo, la muestra se cargó en un gel de agarosa al 1.3 % y se corrió por 45 min a 120 V, para finalmente ser visualizado en un transiluminador UV Bio-rad®.

pLB333 (1 µg/µl)	1 µl
Buffer <i>EcoRI</i> (10 x)	2 µl
Enzima <i>EcoRI</i> (10 U/µl)	1 µl
Agua estéril grado molecular libre de nucleasas	Aforar a 20 µl

Tabla 1. Ensayo de restricción del pLB333 con la enzima *EcoRI*

### 2.3.3 Preparación del pLB33.

El pLB333 se sometió a dos dobles digestiones con enzimas de restricción. En la primera (Tabla 2) se utilizaron las enzimas *BglII* y *EcoRI*, mientras que en la segunda (Tabla 3), se utilizaron las enzimas *NheI* y *EcoRI*, ambas sometidas por 2 h a 37 °C con el objetivo de liberar los sitios de restricción cohesivos y su posterior ligación con las UTS diseñadas (*GroESL/PSUsp45/NAGLP-1* y *PSExp4/NAGLP-1* respectivamente) y digeridas con sus respectivas enzimas de restricción. Finalizada la digestión, se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular de DNA de referencia utilizado previamente, en un gel de agarosa al 1.3 % y se corrió a 120 V durante 45 min y se visualizó en el transiluminador UV Bio-rad®.

Tratando de exponer lo menos posible al fragmento digerido de la luz UV, se cortó el fragmento de mayor peso (que corresponde a la región de plásmido sin el gen que codifica el *PSExp4: Nuc*), para después purificarse con ayuda del kit *Monarch® DNA Gel Extraction*.

pLB333 (1 µg/µl)	1 µl
Buffer O (10 x)	2 µl
Enzima BglII (10 U/µl)	1 µl
Enzima EcoRI (10 U/µl)	1 µl
Agua estéril grado molecular libre de nucleasas	Aforar a 20 µl

Tabla 2. Ensayo de doble restricción del pLB333 con las enzimas BglII y EcoRI.

pLB333 (1 µg/µl)	1 µl
Buffer Tango (10x)	2 µl
Enzima NheI (10 U/ µl)	1 µl
Enzima EcoRI (10 U/ µl)	1 µl
Agua estéril grado molecular libre de nucleasas	Aforar a 20 µl

Tabla 3. Ensayo de doble restricción del pLB333 con las enzimas NheI y EcoRI.

*2.3.4 Digestión de las UTS GroESL/PSUsp45/NAGLP-1 y PSExp4/NAGLP-1 con enzimas de restricción.*

La compañía General Biosystems, encargada de sintetizar las UTS envió éstas como productos de PCR en una cantidad aproximada de 5 µg, debido a dificultades para la replicación de las mismas en vectores desarrollados para *E.coli* (PUC57). Dadas las circunstancias, se optó por realizar una doble digestión por 2 h a 37 °C de las UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 (Tabla 4) y PSExp4/NAGLP-1 (Tabla 5) con las mismas enzimas que se utilizaron para digerir el pLB333, con la finalidad de liberar los sitios de restricción puestos en la etapa de diseño bioinformático, y posteriormente, realizar la ligación con el pLB333 previamente digerido. Terminadas las dobles digestiones de las UTS, con ayuda del kit Monarch® PCR & DNA Cleanup, se purificaron los fragmentos de DNA liberados de los sitios de restricción, los buffers y los nucleótidos liberados durante la reacción, obteniendo un rendimiento de final aproximado de 3 µg de DNA.

UTS pGroESL/Usp45/NAGLP-1 (5 µg/10 µl)	10 µl
Buffer O (10x)	2 µl
Enzima BglII (10 U/µl)	1 µl
Enzima EcoRI (10 U/µl)	1 µl
Agua estéril grado molecular libre de nucleasas	Aforar a 20 µl

Tabla 4. Doble digestión de la UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 con las enzimas BglII y EcoRI.

UTS Exp4/NAGLP-1 (5 µg/10 µl)	10 µl
Buffer Tango (10x)	2 µl
Enzima NheI (10 U/µl)	1 µl
Enzima EcoRI 10 U/µl)	1 µl
Agua estéril grado molecular libre de nucleasas	Aforar a 20 µl

Tabla 5. Doble digestión de la UTS PSExp4/NAGLP-1 con las enzimas NheI y EcoRI.

*2.3.5 Ligación de las UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 y PSExp4/NAGLP-1 con el pLB333 digerido.*

Las reacciones de ligación de las UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 (Tabla 6) y PSExp4/NAGLP-1 (Tabla 7) con el pLB333 digerido, se realizaron con la enzima ligasa T4 DNA de la compañía Bio Basic® a una relación molar aproximada de 4:1 inserto: vector. Una vez preparadas las reacciones en tubos eppendorf de 0.2 ml, se incubaron durante 16 h a 4 °C. Transcurrido el tiempo de reacción, se inactivó la ligasa aumentando la temperatura a 65 °C por 10 min y posteriormente, se utilizó el kit Monarch® PCR & DNA Cleanup para limpiar los vectores recién ligados del resto de los componentes de las reacciones y se resuspendieron en agua grado molecular estéril libre de nucleasas. El producto de la ligación conformado por la UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 con el pLB333 dio como resultado el nuevo vector recombinante pDJ331, mientras que el producto de la ligación conformado por la UTS PSExp4/NAGLP-1 dio como resultado el nuevo vector recombinante pDJ332.

UTS pGroESL/Usp45/NAGLP-1 (109 ng/μl)	1 μl
pLB333 linearizado (20 ng/μl)	1 μl
Buffer ligasa T4 DNA 10x	2 μl
Ligasa T4 DNA (120 U/ μl)	1 μl
Agua estéril grado molecular libre de nucleasas	Aforar a 20 μl

Tabla 6. Ensayo de ligación de la UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 con el plásmido pLB333 digerido con las enzimas *Bgl*III/*Eco*RI.

UTS Exp4/NAGLP-1 (119 ng/μl)	1 μl
pLB333 linearizado (37 ng/μl)	1 μl
Buffer ligasa T4 DNA 10x	2 μl
Ligasa T4 DNA (120 U/ μl)	1 μl
Agua estéril grado molecular libre de nucleasas	Aforar a 20 μl

Tabla 7. Ensayo de ligación de la UTS PSExp4/NAGLP-1 con el pLB333 digerido con las enzimas *Nhe*I/*Eco*RI.

2.3.6 Transformación de *Lactococcus lactis* electrocompetente con los plásmidos pDJ331 y pDJ332.

La transformación de las cepas de *L. lactis* electrocompetente con los plásmidos pDJ331 y pDJ332, se mezclaron por separado 100 µl de bacterias electrocompetentes con 20 µl de cada plásmido (aproximadamente 100 ng) y se colocaron en cubetas de electroporación de 0.2 cm Bio-Rad®. Las cubetas se expusieron por 4.5 µs a un pulso eléctrico de 2000 V con 25 µF y 200 Ω en un electroporador Eppendorf Eporator®. Rápidamente y posterior a la descarga eléctrica, se les adicionó 1 ml de medio de recuperación G-M17C/MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub> y se incubó por 1.5 h a 30 °C sin agitación; después de la incubación, se sembraron ambas cepas con la técnica de extensión en placa con ayuda de una varilla de vidrio tipo L, sobre placas de Petri con el medio de cultivo G-CIM17CAD y se dejaron crecer durante 48 h a 30 °C. Una vez pasado el tiempo antes mencionado, se seleccionaron las colonias transformantes puestas bajo el nombre de *Lactococcus lactis* Diego Jaramillo 331 (*L.I-DJ331*) y *Lactococcus lactis* Diego Jaramillo 332 (*L.I-DJ332*), se inocularon con ayuda de un asa bacteriológica en caldo de cultivo G-CIM17 por 12 h a 30 °C, sin agitación y se realizaron stocks almacenados a -80 °C para su posterior confirmación.

## 2.4 Caracterización de los plásmidos recombinantes.

### 2.4.1 Extracción de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.

Para la extracción de los plásmidos recién creados, se reactivaron las cepas recombinantes *L.l-DJ331* y *L.l-DJ332* como se describió anteriormente, y se inocularon 100 µl en tubos con 10 ml de medio G-CIM17C. Estos tubos se dejaron crecer a 30 °C durante 12 h sin agitación, se centrifugaron 10 min a 5,500 x g a 4 °C y una vez transcurrido el tiempo, se descartaron los sobrenadantes y se procedió a realizar la extracción del DNA plasmídico de ambas cepas recombinantes mediante el empleo de 10 mg/ml de lisozima por 1 h y el Kit QIAprep Spin Miniprep QIAGEN®, para finalmente resuspender en agua estéril grado molecular libre de nucleasas.

### 2.4.2 Caracterización de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.

Una vez llevadas a cabo las extracciones de los plásmidos recombinantes, se digirieron ambos plásmidos frente a la enzima de restricción *EcoRI* (Tabla 8) para linearizar el vector y comparar su peso molecular contra el marcador de peso molecular de DNA referencia. Terminadas las digestiones, se cargaron las muestras sobre los pocillos de un gel de agarosa al 1.3 % y se corrió a 120 V durante 45 min, para ser observado en un transiluminador UV Bio-rad®.

Plásmido pDJ331 ó pDJ332 (0.5 µg/µl)	2 µl
Buffer <i>EcoRI</i> (10x)	2 µl
Enzima <i>EcoRI</i> (10 U/µl)	1 µl
Agua estéril grado molecular libre de nucleasas	Aforar a 20 µl

Tabla 8. Mezcla de reacción de los plásmidos pDJ331 y pDJ332 con la enzima *EcoRI*.

#### 2.4.3 Caracterización de las UTS provenientes de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.

Una vez caracterizados los plásmidos pDJ331 y pDJ332 se realizaron dos dobles digestiones de restricción por 2 h a 37 °C con las enzimas *BglIII/NheI*, respectivamente, y la enzima *EcoRI* (Tabla 9 y 10), con el objetivo de liberar las UTS de los plásmidos y comprobar sus pesos moleculares con un marcador de DNA de referencia. Finalizado el periodo de incubación, se cargaron las muestras en un gel de agarosa al 1.3 %, el cual se corrió a 120 V durante 45 min para posteriormente ser visualizada en un transiluminador UV Bio-rad®.

Plásmido pDJ331 (0.5 µg/µl)	2 µl
Buffer O (10x)	2 µl
Enzima BglII (10 U/µl)	1 µl
Enzima EcoRI (10 U/µl)	1 µl
Agua estéril grado molecular libre de nucleasas	Aforar a 20 µl

Tabla 9. Mezcla de reacción del plásmido pDJ331 con las enzimas BglII y EcoRI.

Plásmido pDJ332 (0.5 µg/µl)	2 µl
Buffer Tango (10x)	2 µl
Enzima NheI (10 U/µl)	1 µl
Enzima EcoRI (10 U/µl)	1 µl
Agua estéril grado molecular libre de nucleasas	Aforar a 20 µl

Tabla 10. Mezcla de reacción del plásmido pDJ332 con las enzimas NheI y EcoRI.

*2.4.4 Diseño de primers para la comprobación de la caracterización de las UTS provenientes de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.*

Para realizar la comprobación de la correcta ligación del inserto:vector, se diseñaron los primers forward y reverse con ayuda de las herramientas bioinformáticas OligoAnalyzer y SnapGene para su posterior amplificación mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final. Para su diseño se eligió una longitud entre 18 a 30 pb, un contenido de Guanina: Citosina (GC) entre el 40 – 60 %, valores de temperaturas de fusión ( $T_m$ ) en un rango de temperatura de 50 a 60 °C, y entre ambos primers, una diferencia de temperatura no mayor a 5 °C. Se evitó seleccionar regiones con alto contenido de Timinas en el extremo -3', así como, se procuró terminar las secuencias ya sea con G o C, evitando más de tres repeticiones, además, se diseñaron primers con una  $\Delta G$  menor a -9 Kcal/mol en Hairpin, Self-Dimer y Hetero-Dimer.

*2.4.5 Comprobación de la caracterización de las UTS provenientes de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.*

Para comprobar el peso de las UTS provenientes de los plásmidos pDJ331 y pDJ332, se realizó una amplificación de las UTS mediante una PCR de punto

final utilizando el kit q-Taq DNA Polymerase qARTA Bio® (Tabla 11), haciendo uso de un termociclador de la compañía Applied Biosystems® (Tabla 12), finalizada la PCR de punto final, se cargó el producto de la amplificación de PCR en un gel de agarosa al 1.6 % y se corrió la muestra frente al marcador de peso molecular de DNA de referencia a 120 V durante 45 min, para posteriormente ser visualizada en un transiluminador UV Bio-rad®.

Buffer A Taq (10 X)	5 µl
dNTP´s Mix (20mM)	0.5 µl
Primer Forward (10 pmol/ µl)	1 µl
Primer Reverse (10 pmol/µl)	1 µl
pDJ331 (342 ng/µl) ó pDJ332 (267 ng/µl)	1 µl
q-Taq polimerasa (5 U/ µl)	0.5 µl
Enhancer (10 x)	10 µl
Agua estéril grado molecular libre de nucleasas	Aforar a 50 µl

Tabla 11. Mezcla de reacción de las UTS de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.

	Ciclos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	5 minutos	95 °C
Desnaturalización	33	50 segundos	95 °C
Alineamiento		45 segundos	57 °C
Elongación		30 segundos	72 °C
Extensión	1	10 minutos	72 °C
Enfriamiento		indefinidamente	4 °C

Tabla 12. Condiciones de la PCR para la amplificación de la UTS de los plásmidos pDJ331 y pDJ332

## **2.5 Expresión y análisis de GLP-1.**

### *2.5.1 Inducción de las cepas recombinantes L.I-DJ331 y L.I-DJ332.*

Se reactivaron las bacterias recombinantes de los stocks anteriormente almacenados a -80 °C como se describió previamente y se inocularon 500 µl en 100 ml de G-CIM17C dejándose crecer ambos tubos a una temperatura de 30 °C sin agitación hasta llegar a una D.O. 600 nm ~ 1.8. Alcanzada la D.O. deseada, se centrifugaron las células por 20 min a 5500 RPM a 4 °C, transcurrido el tiempo

se eliminaron los sobrenadantes y los botones celulares se resuspendieron, lavaron y centrifugaron (a las mismas condiciones mencionadas) en dos ocasiones con una solución de buffer de fosfatos pH 7.4, después, se les descartó el sobrenadante y los botones celulares se resuspendieron en 100 ml de medio G-CIM17C fresco y se dejaron crecer a 30 °C sin agitación hasta alcanzar una D.O. 600 nm ~ 0.8 – 1.4 Alcanzada esta D.O. se les agregó una solución de NaCl hasta llegar a una concentración final de 2.5 % en los 100 ml del medio G-CIM17C y finalmente se dejó expresando durante 3 h a 37 °C.

#### *2.5.2 Concentración de las proteínas expresadas por las cepas recombinantes L.I-DJ331 y L.I-DJ332.*

Finalizada la expresión, se centrifugaron los tubos durante 20 min a 5500 RPM a 4 °C, y una vez pasado el tiempo, se filtraron los sobrenadantes de ambas cepas recombinantes a través de una membrana de 0.22 µm, se transfirieron a nuevos tubos y se les agregó inhibidor de proteasas. Después, los sobrenadantes de ambas cepas se distribuyeron en alícuotas de 25 ml por tubo y se concentraron hasta recuperar un volumen de 10 ml de sobrenadante de cada cepa recombinante mediante vacío, centrifugación y calor, utilizando un SpeedVac® de la compañía Thermo Scientific, luego, a los 10 ml de sobrenadante recuperados se les adicionó ácido tricloroacético (TCA) al 100 % hasta llegar a una concentración final de 10 % de TCA, se mezclaron por inversión y se incubaron por 2 h a 4 °C, después, se centrifugaron a 17,000 x g durante 20 min a 4 °C, finalizado el tiempo, se descartaron los sobrenadantes y

los botones se resuspendieron en 2 ml de TRIS base 50 mM, ajustándoles a pH 8. Posteriormente, se pasaron sobre un concentrador de 2,000 MWCO, Vivaspin® 15R Centrifugal Concentrators y se centrifugaron por 1 h hasta recuperar un volumen de 500 µl, seguido a esto, se tomaron 50 µl de cada concentrado en tubos eppendorf, se mezclaron con 50 µl de buffer de carga SDS-PAGE y se calentaron en un baño de agua a 95 °C por 10 min para su posterior análisis.

### *2.5.3 Electroforesis de las proteínas expresadas por las cepas recombinantes L.I-DJ331 y L.I-DJ332.*

Una vez listas las muestras, se preparó un gel de poliacrilamida (Tabla 13), sobre un soporte Mini-PROTEAN® de la compañía Bio-Rad®. Una vez polimerizado el gel, se colocó dentro del tanque de la cámara de electroforesis que contenía el buffer de corrida (Tris base 0.025 mM, Tricina 0.025 mM, SDS 0.05 % pH 8.8), después, se cargó en los carriles del gel, el marcador de peso molecular de proteínas Page™ Unstained Low Range Protein Ladder, el análogo del GLP-1 control (Liraglutida Victoza®) y posteriormente las muestras con el NAGLP-1 y se corrió el gel a 150 V por 2 h.

Concluida la electroforesis, se desensambló el gel de los soportes y se lavó tres veces con agua desionizada durante 10 min. Seguido a esto, el gel se incubó en una solución fijadora de glutaraldehído al 5 % durante 30 min, luego, se volvió a lavar el gel 3 veces con agua desionizada por 30 min, después, se

tiñó en una solución de ácido acético al 10 % y azul de coomassie (0.025 %) durante 1 h. Finalmente se lavó nuevamente el gel con agua desionizada y destiñó durante 3 h en una solución de ácido acético al 10 %.

Reactivos	Gel concentrador al 4 %	Gel separador al 16 %
Acrilamida/bis-acrilamida 29:1 (30 % p/v)	0.66 ml	5.33 ml
Buffer Tris 2.5 M pH 8.8	0.76 ml	4.3 ml
Agua desionizada	3.42 ml	0.22 ml
TEMED	6 µL	7 µL
APS (10 mg/ml)	150 µL	150 µL
Total	5 ml	10 ml

Tabla 13. Protocolo para la preparación del gel de poliacrilamida.

#### 2.5.4 Ensayo Dot Blot de las proteínas expresadas por las cepas recombinantes *L.I-DJ331* y *L.I-DJ332*.

Una vez identificadas las bandas correspondientes a las proteínas recombinantes de interés, se tomaron 2 µl de los sobrenadantes de las cepas recombinantes *L.I-DJ331* y *L.I-DJ332* concentradas anteriormente, 2 µl de sobrenadante de la cepa de *L. lactis* libre de plásmidos (control negativo) y 2 µl

del análogo del GLP-1 control (Liraglutida Victoza® 100 µg/ml), se colocaron lentamente sobre una región de 5 mm de diámetro en una membrana de transferencia de fluoruro de polivinilideno (previamente activada en metanol al 100 % por 1 min) y se dejaron secar durante 30 min. Posteriormente, se bloqueó la membrana con la solución de bloqueo (leche en polvo al 5 % en el buffer TBS-T) a temperatura ambiente por 1 h en agitación constante, y una vez pasado el tiempo se lavó la membrana 3 veces con el buffer TBS-T durante 5 min. Seguido de esto, se incubó la membrana con el anticuerpo primario anti-GLP-1 (Santa Cruz número de identificación: SC-57168) en una dilución de 1:1,000 anticuerpo: buffer (TBS-T- leche en polvo 1 %), durante 1 h a temperatura ambiente y una vez finalizado el tiempo, la membrana se lavó 3 veces con el buffer TBS-T durante 5 min, para después incubar la membrana con el anticuerpo secundario mIGGK-BP-HRP (Santa Cruz número de identificación: SC-51602) a una dilución de 1:10,000 anticuerpo: buffer (TBS-T-leche en polvo 1 %) en agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente se lavó la membrana 5 veces por 5 min en el buffer TBS-T a temperatura ambiente en agitación.

Para el proceso de revelado, a la membrana se le eliminó el exceso del buffer de lavado y se incubó en condiciones de oscuridad con el sustrato de la peroxidasa quimioluminiscente (CPSOC-100 ml SIGMA) durante 2 min a temperatura ambiente, concluido el tiempo, rápidamente se le retiró el exceso de líquido a la membrana y se envolvió con plástico para colocarse junto con la placa radiográfica en el cassette de exposición por 30 min, luego, la placa radiográfica

se incubó por 1 min en una solución reveladora, para después lavarse con agua e incubarse nuevamente por 30 s en una solución fijadora. Finalmente, la placa se lavó con agua y se dejó secar a temperatura ambiente.

## **2.6 Evaluación de la actividad hipoglucemiante del NAGLP-1 *in vivo*.**

### **2.6.1 Manejo de ratones.**

Todos los procedimientos que se realizaron, fueron hechos bajo supervisión del comité de ética de la Facultad de Ciencias Químicas. Se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6J de 10-12 semanas de edad, obtenidos del bioterio ubicado en el Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, estos mismos, se mantuvieron a una temperatura entre 20 – 25 °C, aislados del ruido excesivo y expuestos a ciclos de luz/oscuridad de 12 h cada uno.

El esquema de diabetización comenzó desde el momento del destete a las 3 semanas de edad hasta concluir en la semana 11. A la tercera semana de edad, los ratones fueron alimentados *ad libitum* mediante una dieta sólida alta en grasa (30 % de manteca en una dieta estándar 340 Kcal/100 g), y la administración oral de fructosa al 15 % con glucosa al 1 %, durante 8 semanas, así como, mediante una única administración intraperitoneal de estreptozotocina (100 mg/kg) disuelta

en buffer de citratos (0.1 M) frío a pH 4.5 a mitad del tratamiento de diabetización. Una vez cumplido el esquema de diabetización, se consideró diabético a todo ratón que presentara una lectura de 200 mg/dl de glucosa en sangre venosa (mediante un corte distal de la cola), utilizando un glucómetro comercial Accu-Chek®.

### *2.6.2 Ensayo de producción del NAGLP-1 in situ.*

Para realizar la prueba de tolerancia a la glucosa vía oral, una vez concluido el esquema de diabetización se seleccionaron ratones al azar y se separaron en 3 grupos de 3 ratones cada uno: el grupo de estudio A (administrado con cepa recombinante *L.l-DJ331*), el grupo control negativo B (administrado con la cepa de la *L. Lactis* libre de plásmidos), y el grupo control positivo C (administrado con el análogo de GLP-1 comercial Liraglutida Victoza®); el ensayo tuvo una duración de 9 días, en los días 1° al 8° a los ratones pertenecientes al grupo de estudio A, así como el grupo control negativo B, se les administró una dosis única por día con ayuda de una sonda vía oral, un volumen de 0.1 ml de una solución de buffer de fosfatos conteniendo una densidad de  $1 \times 10^9$  UFC de su respectiva cepa, mientras que a los ratones del grupo control C se les administró un volumen de 0.1 ml de la solución de buffer de fosfatos. Una vez llegado el día nueve, a los ratones de todos los grupos se les realizó la administración correspondiente del tratamiento de los días

anteriores y fueron puestos en condiciones de ayuno durante 4 h. Concluido el tiempo, a los ratones de los grupos A y B se les inyectó un volumen de 0.1 ml de solución salina vía subcutánea, mientras que al grupo C se le administró el análogo de GLP-1 (Liraglutida Victoza®) en un volumen de 0.1 ml a una concentración de 0.1 mg/kg de peso por vía subcutánea; inmediatamente después, se les tomó una muestra de sangre mediante la técnica descrita previamente a los ratones de todos los grupos para determinación de glucosa (tiempo -30). Posteriormente, 30 min después todos los grupos fueron administrados por vía oral con una carga de 0.2 ml de una solución de glucosa al 20 % e inmediato a esto se les tomó una muestra de sangre (tiempo 0). Finalmente, se tomaron muestras de sangre a los ratones de todos los grupos y se les determinó la concentración de glucosa en sangre (tiempos 30 y 60 min). Pasado el tiempo los ratones fueron sacrificados mediante dislocamiento cervical y se recolectaron muestras de sangre necesaria para la determinación de insulina a tiempo final.

A todas las muestras tomadas se les determinó la concentración de glucosa e insulina mediante el uso de un glucómetro comercial Accu-Chek® para la primera, mientras que, para la segunda, por la técnica de ELISA mediante el uso del kit comercial Diagnostic Automation Insulin ELISA.

Una vez concluidas las determinaciones de glucosa a diferentes tiempos e insulina, con ayuda de la herramienta estadística computacional R Commander se realizó la prueba estadística ANOVA de un factor para determinar si los resultados obtenidos eran diferentes entre sí y finalmente se realizó la prueba de Tukey para ver cual conjunto de valores eran estadísticamente distintos.

### *2.6.3 Ensayo cualitativo de absorción de péptidos en el intestino de ratón.*

Para tener una mayor idea de la posible vía de entrada de los péptidos se realizó una prueba piloto de absorción en la luz intestinal *in vitro* utilizando como marcador visual a la proteína verde fluorescente en el intestino de un ratón.

Para realizar la prueba se utilizó un ratón macho de la cepa C57BL/6J de 6 meses de edad, obtenido del bioterio del Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El ratón se mantuvo a una temperatura entre 20 – 25 °C, aislado del ruido excesivo, expuesto a ciclos de luz/oscuridad de 12 h y separado de su camada hasta el día de la realización del experimento.

El ratón seleccionado fue sacrificado por dislocación cervical, posteriormente se le realizó una incisión en la parte abdominal hasta dejar expuestos los intestinos. Después se diseccionó una parte del intestino delgado

y se lavó con un amortiguador de fosfatos estéril previamente atemperado a 37.5 °C. Inmediatamente se cerró un extremo del mismo con ayuda de un hilo de sutura, se llenó la parte de la luz intestinal con la proteína verde fluorescente purificada con ayuda de una jeringa para insulina y se cerró el otro extremo del intestino. Seguido a esto, el intestino se puso en una caja de Petri con amortiguador de fosfatos y se dejó incubando a 37.5 °C por dos horas.

Finalmente se observó la caja de Petri en un transiluminador iniciado el ensayo de la absorción de la proteína verde fluorescente (tiempo 0 h) y transcurrido el tiempo del ensayo se observó nuevamente la caja de Petri (tiempo 2 h) y para mayor apreciación del resultado final del ensayo, se tomaron muestras en tubos Eppendorf de 1.5 ml del sobrenadante de la caja de Petri, así como de la luz intestinal y se observaron nuevamente en el transiluminador.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### **3.1 Bioinformática.**

##### *3.1.1 Secuencias finales del diseño bioinformático de las UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 y PSExp4/NAGLP-1.*

A continuación, se muestran las secuencias finales *in silico* optimizadas una vez terminado el proceso de diseño bioinformático de las UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 y PSExp4/NAGLP-1, la primera consta de un total de 289 pb (Figura 3), y la segunda de un total de 148 pb (Figura 4).

5' AGATCTAAATGTTTTCTTTGACTAAATCTGACCATTGAGATAAAATAAGAATATGTTAGCACTCAACT  
ATTAAGAGTGCTAAAAATAAAAAATGGAGGAAAGTATATGAAAAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAAT  
GTCTACAGTGATACTTTCTGCTGCAGCCCCGTTGTCAGGTGTTACGCTGATCATGGGGAAGGGACCTT  
ACCAAGTATGTAAGTTCTTATTTGGAAGGCCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGC  
GGATGAGAATTC3'

Sitio de restricción BglII, Promotor GroESL, Gen PSUsp45, Codón extra (Asp), Gen NAGLP-1,  
Sitio de restricción EcoRI.

Figura 3. Unidad de transcripción sintética pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1.

5' GCTAGCTACTCTAATGGGAGTCTCATCAACAGCCGTTGTATTTGCTGATCATGGGGAAGG  
GACCTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGGCCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTT  
GGCTGGTGAAAGGCCGGATGAGAATTC3'

Sitio de restricción NheI, Gen incompleto PSExp4, Codón extra (Asp), Gen NAGLP-1, Sitio de  
restricción EcoRI.

Figura 4. Unidad de transcripción sintética PSExp4/NAGLP-1.

Del análisis bioinformático realizado mediante la herramienta ExPASy translate tool, se obtuvieron las correctas traducciones del ORF, por parte de los ribosomas bacterianos Gram-positivos de las UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 (figura 5) y PSExp4/NAGLP-1 (figura 6) optimizadas.

Translate is a tool which allows the translation of a nucleotide (DNA/RNA) sequence to a protein sequence.

DNA or RNA sequence

```
atgaaaaaaaaagattatctcagctattttaatgtctacagtgatactttctgctgcagccccgttgcaggtgtttacgctgatcatggggaaggacctttaccagtgatgtaagtcttatttgaaggccaagctgccaaggaattcattgcttggctgggaaaggcggatga
```

Results of translation

- Open reading frames are highlighted in red
- Select your initiator on one of the following frames to retrieve your amino acid sequence

5'3' Frame 1

```
Met K K K I I S A I L Met S T V I L S A A A P L S G V Y A D H G E G T F T S D V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K G G Stop
```

Figura 5. Traducción *in silico* del ORF de la UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1.

Translate is a tool which allows the translation of a nucleotide (DNA/RNA) sequence to a protein sequence.

DNA or RNA sequence

```
atgaaaaaaaaataaaccttgcctttattaacgctagctactctaatgggagctcatcaacagccgttgtatttgcctgatcatggggaaggacctttaccagtgatgtaagtcttatttgaaggccaagctgccaaggaattcattgcttggctgggaaaggcggatga
```

Results of translation

- Open reading frames are highlighted in red
- Select your initiator on one of the following frames to retrieve your amino acid sequence

5'3' Frame 1

```
Met K K I N L A L L L T L A T L Met G V S S T A V V F A D H G E G T F T S D V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K G G Stop
```

Figura 6. Traducción *in silico* del ORF de la UTS PSExp4(completa)/NAGLP-1.

Con respecto al análisis bioinformático realizado en la herramienta SignalP, se obtuvo la probabilidad del tipo de vía secretora, y, por consiguiente,

el tipo de enzima que realizará el corte, así como, la probabilidad del sitio de corte realizado por la peptidasa señal en las proteínas recombinantes PSUsp45/NAGLP-1 y PSExp4/NAGLP-1. En el gráfico obtenido, se observó el correcto procesamiento a nivel transmembranal de las proteínas PSUsp45/NAGLP-1 y PSExp4/NAGLP-1 permitiendo la liberación del NAGLP-1 hacia el medio extracelular *in silico*.

Para la primera proteína recombinante, se muestra que la vía Sec es la vía secretora más probable (0.995), así como el sitio más probable de corte (0.9842) por la peptidasa señal tipo I, (representado por la línea vertical roja) el cual se encuentra situada entre la posición 27 y 28 de la proteína, entre los aminoácidos Ala<sup>27</sup>-Asp<sup>28</sup> (Figura 7); de la misma manera, para la segunda, se muestra la vía Sec como la ruta más probable (0.9912), así como el sitio más probable de corte (0.9530) por la peptidasa señal tipo I (representado por la línea vertical roja), el cual se encuentra situado entre la posición 25 y 26 de la proteína, entre los aminoácidos Ala<sup>25</sup>-Asp<sup>26</sup> (Figura 8).



### 3.2 Manipulación de *Lactococcus lactis*.

#### 3.2.1 Selección de las colonias de *L.I-PLB*.

No hubo crecimiento por parte de las colonias obtenidas después de la reactivación, electrocompetencia y electroporación de la cepa de *L. lactis* libre de plásmidos, crecida en una placa de Petri con el medio de cultivo G-CIM17CAD posterior a las 48 h de incubación (Figura 9), mientras que se observó un crecimiento de colonias y una decoloración del agar de cultivo ocasionado por el crecimiento de la cepa de *L.I-PLB* en la placa de Petri con el medio de cultivo G-CIM17CAD posterior a las 48 h de incubación (Figura 10).



Figura 9. Control negativo de la cepa de *L. lactis* libre de plásmidos.

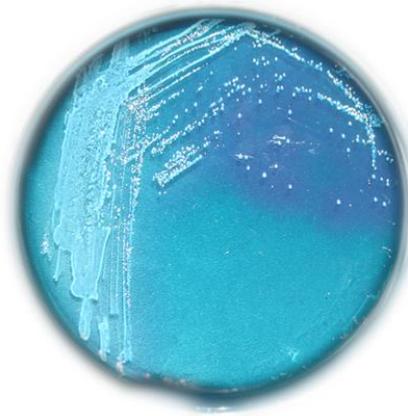


Figura 10. Colonias de la cepa recombinante *L.I-PLB*.

### 3.3 Clonación molecular.

#### 3.3.1 Caracterización del *pLB333*.

En la figura 11, se observan dos carriles en un gel de agarosa al 1.3 % visto con luz UV sobre un transiluminador correspondiente a múltiples bandas del marcador de peso molecular de DNA (carril 1) y a una banda correspondiente al peso molecular de 3,628 pb del plásmido linearizado *pLB333* digerido con la enzima *EcoRI* (carril 2).

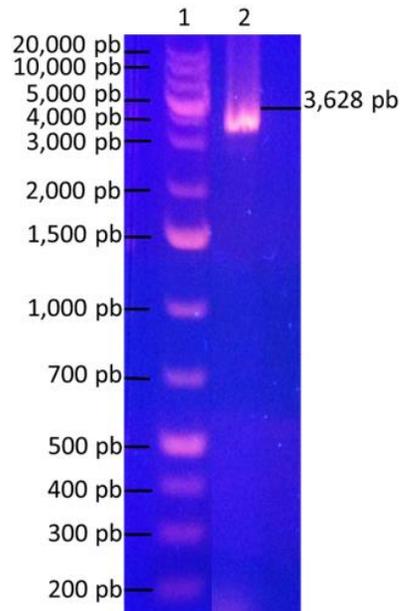


Figura 11. Digestión del pLB333 con la enzima *EcoRI* en un gel de agarosa al 1.3 %.

### 3.3.2 Preparación del pLB333.

Ahora bien, abajo se muestra un gel de agarosa al 1.3 %, visto sobre un transiluminador en donde se destaca el carril 1 correspondiente al marcador de peso molecular de DNA y el carril 2 donde se observan dos bandas, la primera correspondiente al pLB333 digerido con las enzimas de restricción *BglII* y *EcoRI* con un peso molecular de 2,863 pb y otra banda correspondiente al fragmento liberado del gen del promotor GroELS/Exp4: nuc con un peso molecular de 765 pb (Figura 12).

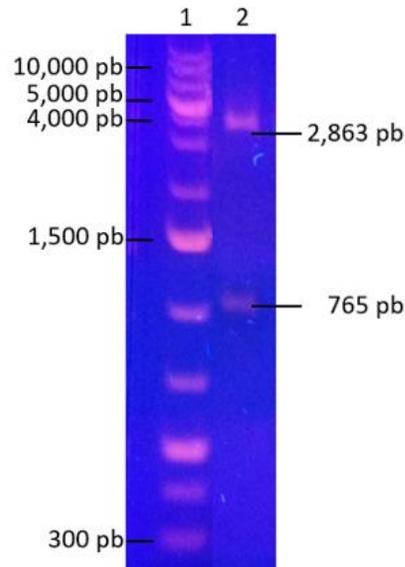


Figura 12. Digestión del pLB333 con las enzimas *BglII* y *EcoRI* en un gel de agarosa al 1.3 %.

De la misma manera, en la figura 13 se muestra un gel de agarosa al 1.3 % visto sobre un transiluminador, en donde se destaca el carril 1 correspondiente al marcador de peso molecular DNA y el carril 2 donde se observan dos bandas, la primera correspondiente al pLB333 digerido con las enzimas de restricción *NheI* y *EcoRI* con un peso molecular de 2,998 pb y otra banda correspondiente al fragmento liberado del gen PSExp4 incompleto: nuc con un peso molecular de 630 pb.

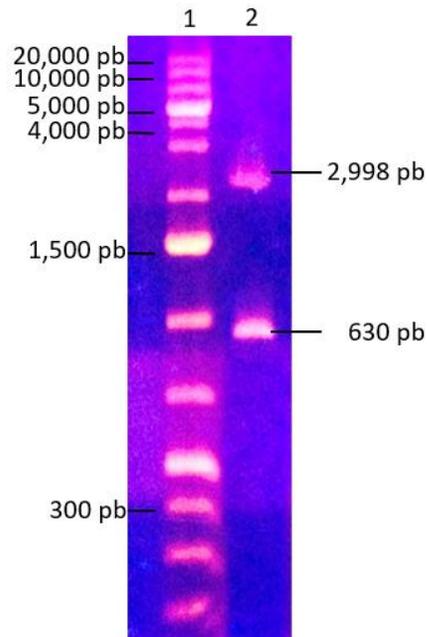


Figura 13. Digestión del pLB333 con las enzimas *NheI* y *EcoRI* en un gel de agarosa al 1.3 %.

### 3.3.3 Ligación de los plásmidos *pDJ331* y *pDJ332*.

Se obtuvo el plásmido *pDJ331* (Figura 14) mediante la ligación de las UTS *pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1* con el *pLB333* digerido con las enzimas de restricción *BglII* y *EcoRI*, mientras que el plásmido *pDJ332* (figura 15) se obtuvo

producto de la ligación de la UTS PSExp4/NAGLP-1 y el pLB333 digerido con las enzimas de restricción *NheI* y *EcoRI*.

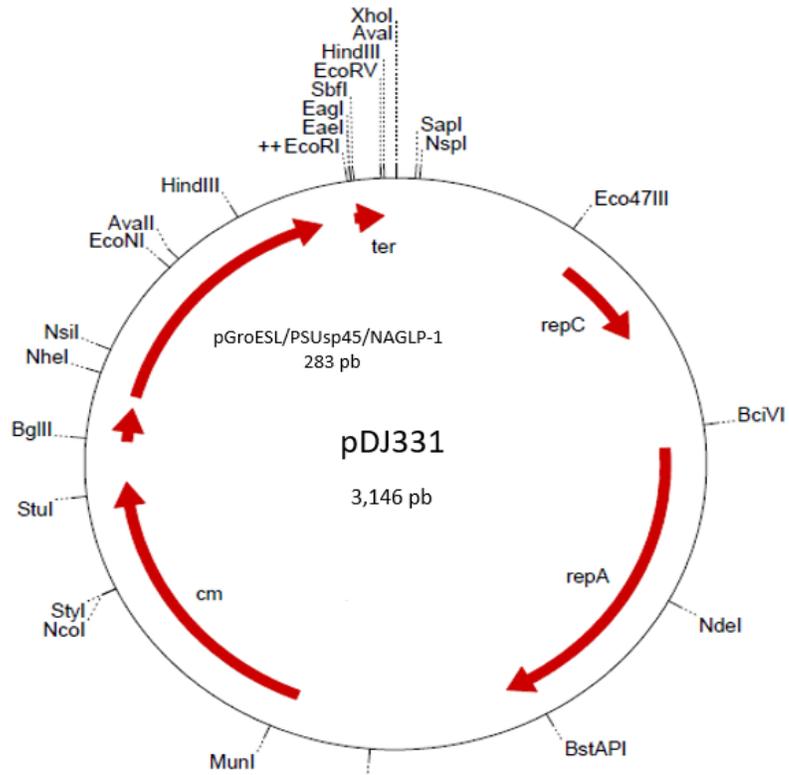


Figura 14. Estructura del plásmido pDJ331.

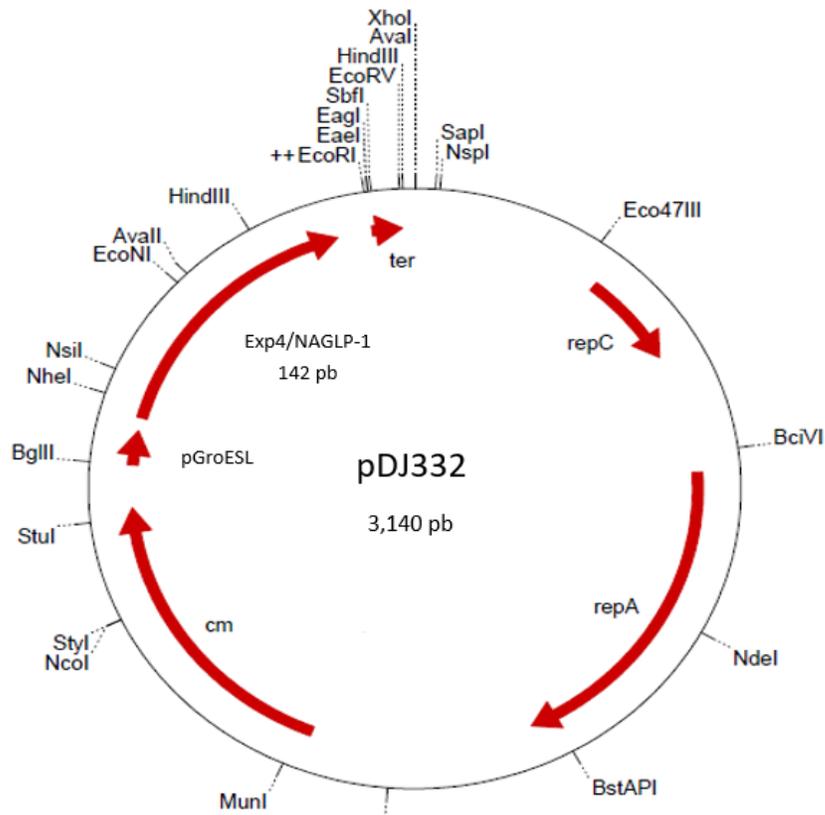


Figura 15. Estructura del plásmido pDJ332.

### 3.3.4 Selección de las colonias L.I-DJ331 y L.I-DJ332.

Se dio un crecimiento positivo sin degradación del colorante, por parte de las colonias obtenidas después de la reactivación y electrocompetencia de las cepas de *L. lactis* libres de plásmidos transformadas con el plásmido pDJ331

(figura 16) y el plásmido pDJ332 (Figura 17) crecidas en placas de Petri con el medio de cultivo G-CIM17CAD posterior a las 48 h de incubación.



Figura 16. Cepa recombinante *L.I-DJ331*.



Figura 17. Cepa recombinante *L.I-DJ332*.

### 3.4 Caracterización de los plásmidos recombinantes.

#### 3.4.1 Caracterización de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.

Se examinó el gel de agarosa al 1.3 %, en el cual se aprecia el primer carril con las bandas correspondientes al marcador de peso molecular DNA, el segundo carril perteneciente a las bandas correspondientes a la UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 (283 pb), así como el plásmido pDJ331 digerido con las enzimas *BglII* y *EcoRI* (2,863 pb), y el tercer carril pertenece al plásmido linearizado pDJ331(3,146 pb) digerido con la enzima de restricción *EcoRI* (Figura 18). Mientras que en el cuarto carril se observan dos bandas correspondientes a la UTS PSExp4/NAGLP-1 (142 pb) y el plásmido pDJ332 digerido con las enzimas *NheI* y *EcoRI* (2,998 pb) y finalmente, en el quinto carril se observa una única banda correspondiente al plásmido linearizado pDJ332 (3,140 pb) con la enzima de restricción *EcoRI* (figura 19).

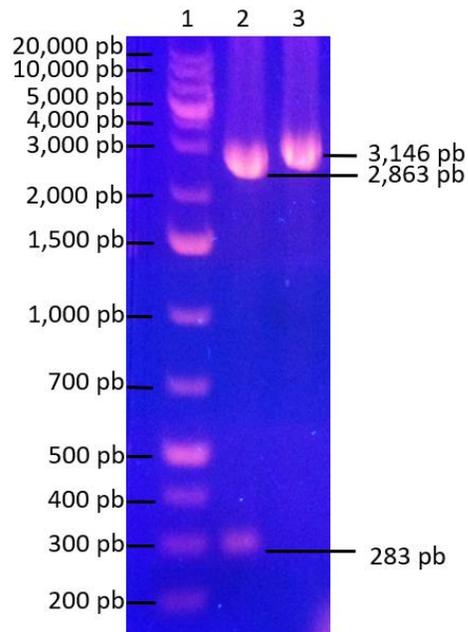


Figura 18. Digestiones del plásmido pDJ331 con las enzimas *BglII* y *EcoRI*.

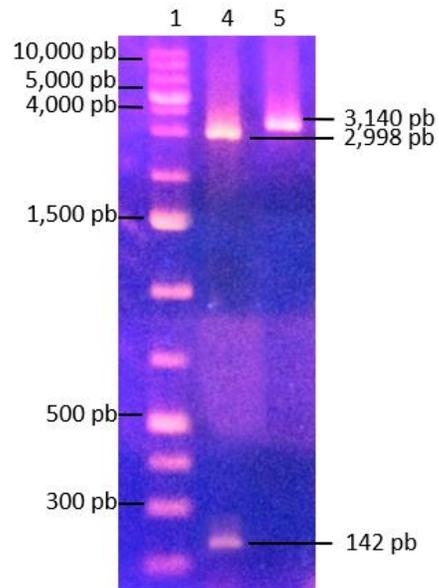


Figura 19. Digestiones del plásmido pDJ332 con las enzimas *NheI* y *EcoRI*.

### 3.4.2 Diseño de primers.

Mediante la herramienta OligoAnalyzer, se obtuvieron los valores ideales de las secuencias del par de primers forward y reverse, diseñados para comprobar las UTS de los plásmidos pDJ331 y pDJ332 por la técnica de PCR (figura 20); además, se muestra el resultado de la PCR *in silico* para la amplificación de las UTS de los plásmidos pDJ331 (figura 21) y pDJ332 (Figura 22) realizada en la herramienta SnapGene, observando la amplificación de las regiones de interés y corroborando el correcto diseño del par de primers.

#### Resultados

RESUSPENSIÓN

DILUCIÓN

SECUENCIA	5'- GTC ACT AAC CTG CCC CGT TAG TTG -3'					
LONGITUD	24					
CONTENIDO DE GC	54.2%					
TEMPERATURA	59.5 °C					
PESO MOLECULAR	7279.8 g/mole					
<b>Structures</b>						
structure	Image	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)	$\Delta H$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (cal.K <sup>-1</sup> mole <sup>-1</sup> )	Output
1		-1.9	41.9	-35.4	-112.36	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det

HAIRPIN

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5'  GTCACTAACCTGCCCGTTAGTTG
      :   ||   :
3'  GTTGATTGCCCGTCCAATCACTG
    
```

Delta G: -3.29 kcal/mole Base Pairs: 3

```

5'  GTCACTAACCTGCCCGTTAGTTG
      |||  :  :  ::
3'  GTTGATTGCCCGTCCAATCACTG
    
```

SELF-DIMER

Resultados

RESUSPENSIÓN

DILUCIÓN

SECUENCIA	5'- GTA TCG ATA GCC CGC CTA ATG AGC -3'
LONGITUD	24
CONTENIDO DE GC	54.2%
TEMPERATURA	59.1 °C
PESO MOLECULAR	7337.8 g/mole

Structures

structure	Image	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)	$\Delta H$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (cal.K <sup>-1</sup> .mole <sup>-1</sup> )	Output
1		0.24	21.3	-18.8	-63.85	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
2		0.32	19.1	-15.7	-53.73	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
3		0.49	17.2	-18.2	-62.69	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det

HAIRPIN

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2

```
5'   GTATCGATAGCCCGCCTAATGAGC
      ||   ::
3'   CGAGTAATCCGCCCGATAGCTATG
```

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2

```
5'   GTATCGATAGCCCGCCTAATGAGC
      ::   ||   ::
3'   CGAGTAATCCGCCCGATAGCTATG
```

SELF-DIMER

Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2

```
5'   GTATCGATAGCCCGCCTAATGAGC
      :   :   ||   :   :
3'   CGAGTAATCCGCCCGATAGCTATG
```

Delta G: -4.5 kcal/mole Base Pairs: 4

```
5'   GTCACTAACCTGCCCGTTAGTTG
      :   :   |||   :
3'   CGAGTAATCCGCCCGATAGCTATG
```

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2

```
5'   GTCACTAACCTGCCCGTTAGTTG
      ||   ::
3'   CGAGTAATCCGCCCGATAGCTATG
```

HETERO-DIMER

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2

```
5'   GTCACTAACCTGCCCGTTAGTTG
      :   :   ||   :
3'   CGAGTAATCCGCCCGATAGCTATG
```

Figura 20. Valores obtenidos del diseño del par de primers Forward y Reverse a través de la herramienta informática OligoAnalyzer.

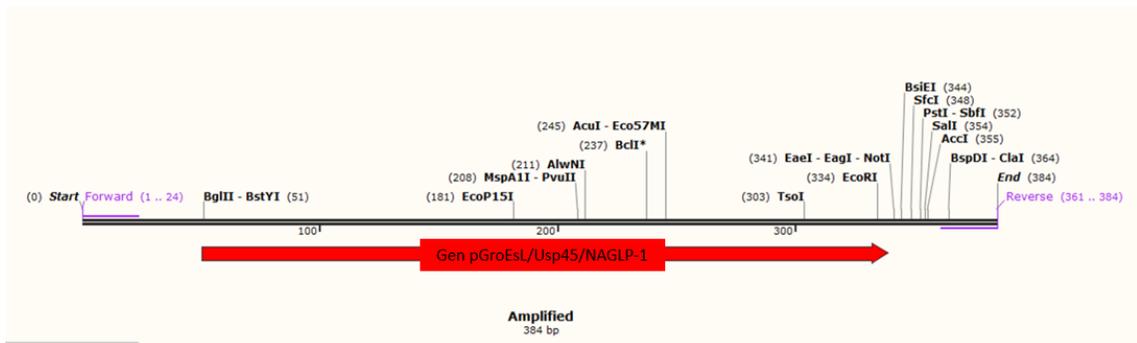
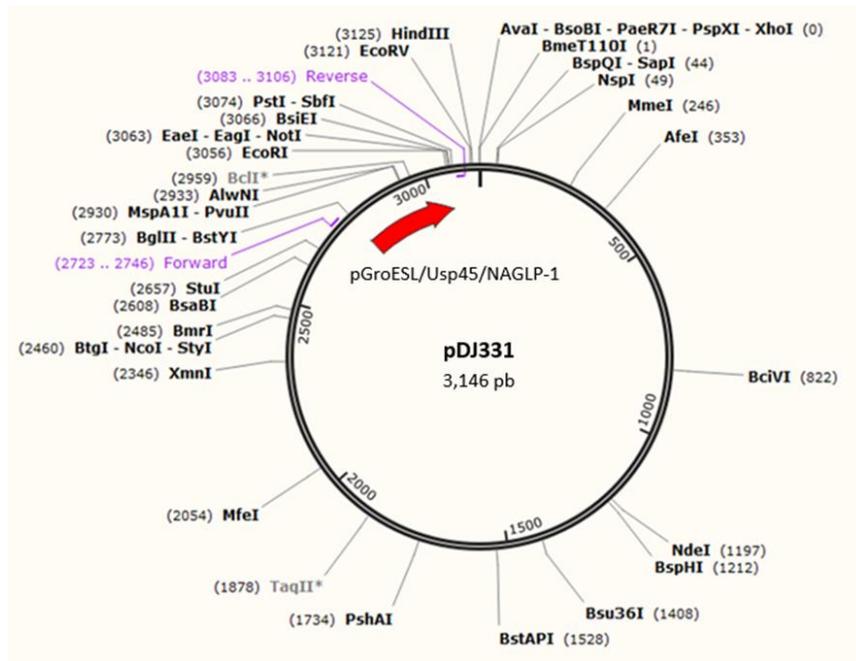


Figura 21. Amplificación de la UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLp-1 utilizando la herramienta informática SnapGene.

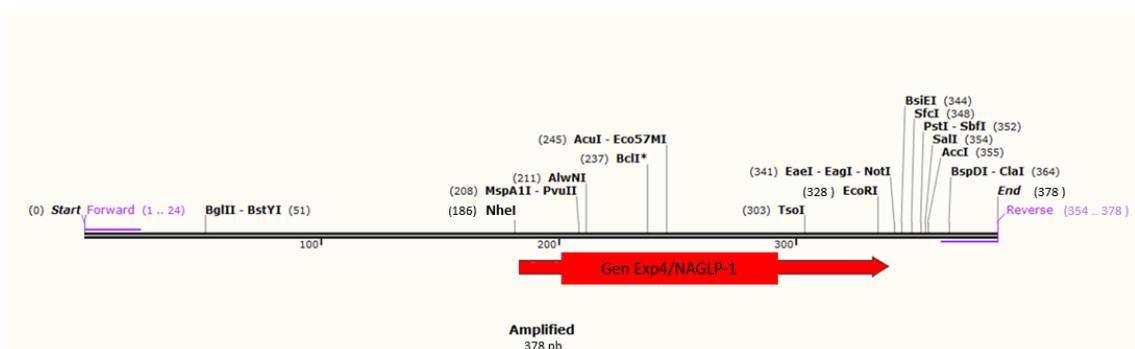
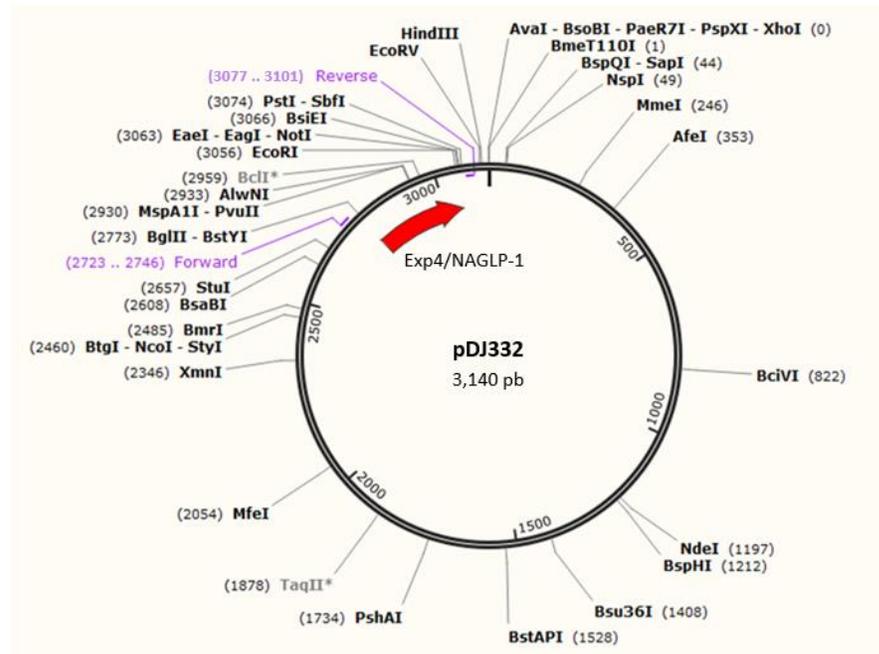


Figura 22. Amplificación de la UTS PSExp4/NAGLP-1 utilizando la herramienta informática SnapGene.

3.4.3 Amplificación de las UTR de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.

En la figura 23 se muestra un gel de agarosa al 1.6 % donde se cargaron los productos de la PCR de los plásmidos pDJ331 y pDJ332, en donde se confirmó la presencia de las bandas pertenecientes a las UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 de peso molecular de 384 pb (carril 2) del plásmido pDJ331, y la UTS PSExp4/NAGLP-1 con un peso molecular de 378 pb (carril 3) del plásmido pDJ332, también se muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular DNA.

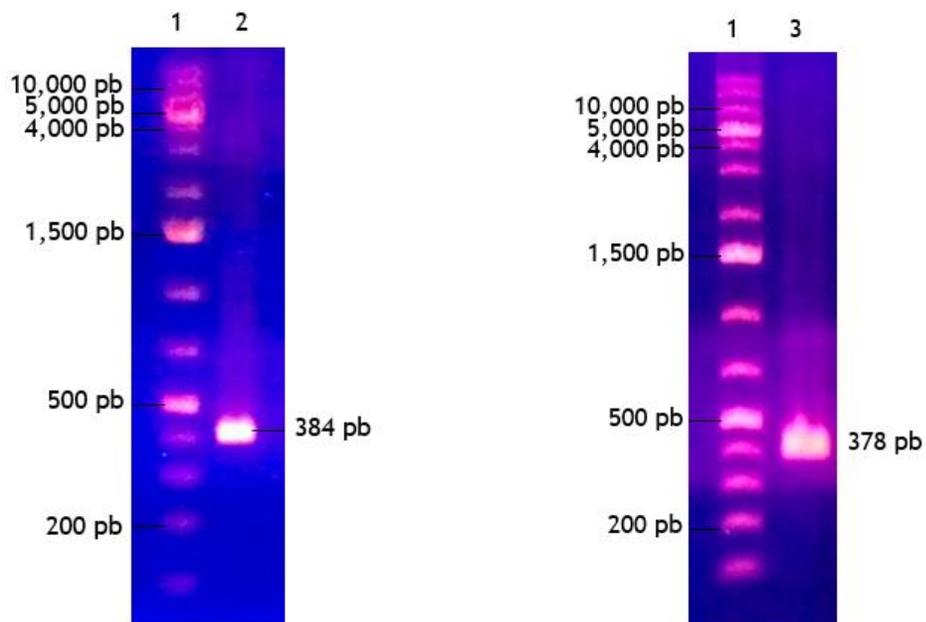


Figura 23. Amplificación de las UTS de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.

### 3.5 Expresión y análisis de NAGLP-1 recombinante.

#### 3.5.1 Electroforesis de NAGLP-1 secretado por las cepas *L.I-DJ331* y *L.I-DJ332*.

El gel de poliacrilamida teñido, producto de la electroforesis de las proteínas expresadas y concentradas de las cepas recombinantes *L.I-DJ331* y *L.I-DJ332* arrojó las bandas correspondientes al peso de 3 kDa de la proteína recombinante NAGLP-1 en los carriles 3 (*L.I-DJ332*) y 5 (*L.I-DJ331*) del gel de poliacrilamida (figura 24), en donde también se aprecia en el primer y segundo carril el control positivo del análogo del GLP-1 (Liraglutida, Victoza®), así como el marcador de peso molecular de proteínas en el carril 4.

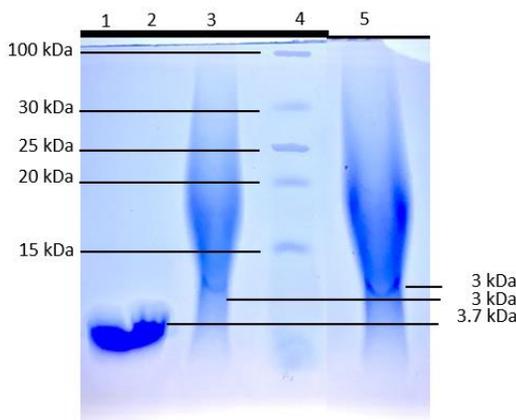


Figura 24. Gel de poliacrilamida de la expresión de las cepas recombinantes *L.I-DJ331* y *L.I-DJ332*.

3.5.2 *Ensayo Dot Blot de las proteínas expresadas por las cepas recombinantes L.I-DJ331 y L.I-DJ332.*

La placa radiográfica mostró tres señales marcadas con una línea (Figura 25), la primera de ellas muy intensa (1) correspondiente al control positivo del análogo del GLP-1 (Liraglutida, Victoza®), así como, una nula señal por parte del control negativo (2) correspondiente al sobrenadante concentrado de la cepa de *L. lactis* libre de plásmidos, mientras que las señales marcadas con los números 3 y 4 corresponden al nuevo análogo de GLP-1 expresado y concentrado de los sobrenadantes de las cepas recombinantes *L.I-DJ331* y *L.I-DJ332*, respectivamente.

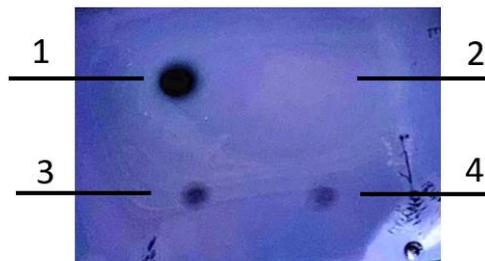


Figura 25. Placa radiográfica revelada del Dot Blot del NAGLP-1 expresado en las cepas recombinantes *L.I-DJ331* y *L.I-DJ332*.

**3.6 Evaluación de la actividad hipoglucemiante del NAGLP-1 en ratones *in situ*.**

*3.6.1 Ensayo de producción del NAGLP-1 in situ.*

Una vez realizada la prueba de tolerancia a la glucosa vía oral los datos obtenidos de la determinación de glucosa en sangre de todos los grupos de estudio se promediaron y se resumieron en la tabla 14, mientras que los resultados que la prueba ANOVA arrojó se sintetizaron y se mencionan posteriormente.

Grupos de estudio	Tiempo de recolección de la muestra	Promedio de glucemia mg / dL	Desviación estándar
Grupo A	-30	121	5
	0	203	16
	30	161.3	2.5
	60	168	8
Grupo B	-30	153	2
	0	166	2
	30	161	9
	60	168.5	24.5
Grupo C	-30	167.5	4.5
	0	143.5	19.5
	30	104	8
	60	124.5	12.5

Tabla 14. Valores de glucemia a diferentes tiempos de los grupos de estudio A, B y C.

Los resultados de la prueba ANOVA arrojaron que las medias en la glucosa del tiempo -30 de los 3 grupos son distintos con un intervalo de confianza del 95 %. Mientras que en la prueba de Tukey arrojó que las medias de glucosa del grupo B y C son iguales y la media de glucosa de A es distinta a estas en el tiempo 0. Por otra parte, las medias de glucosa de A y B son iguales y la media de glucosa de C es distinta a estas en el tiempo 30 y el tiempo 60.

En la tabla 15 se observan los valores obtenidos de la determinación de insulina de manera sintetizada de los grupos A, B y C en el tiempo final (60 min después de la administración de glucosa oral), mientras que los resultados de la prueba ANOVA se mencionan posteriormente.

Grupos de estudio	Promedio de Insulina en sangre ( $\mu$ UI / ml)	Desviación estándar
Grupo A	18.62	0.38
Grupo B	10.75	2.17
Grupo C	21	2.75

Tabla 15. Valores de insulina de los grupos A, B y C.

Los resultados de la prueba ANOVA y de Tukey arrojaron que las medias de la insulina de los grupos A y C son iguales mientras que la media del grupo B es diferente de las primeras.

### *3.6.2 Ensayo cualitativo de absorción de péptidos en el intestino de ratón.*

La comparación de los resultados del tiempo 0 h contra el tiempo 2 h de la caja de Petri arrojó una mayor intensidad en la fluorescencia del intestino del intestino de ratón en el tiempo 0 h, mientras que, en el tiempo 2 h se observó una marcada reducción de la fluorescencia en el intestino y un aumento en la fluorescencia en el sobrenadante de la caja de Petri (Figura 26).

Finalmente, los tubos Eppendorf en el transiluminador (Figura 27) arrojaron de manera cualitativa una máxima fluorescencia correspondiente a la proteína verde fluorescente concentrada recolectada de la luz intestinal (tubo 1), mientras que la muestra correspondiente al sobrenadante de la caja de Petri (tubo 2) se observa con una fluorescencia menos intensa comparado a la proteína concentrada. Finalmente, de manera de control se observa que el amortiguador de fosfatos no muestra fluorescencia al ser puesto en el transiluminador (tubo 3).

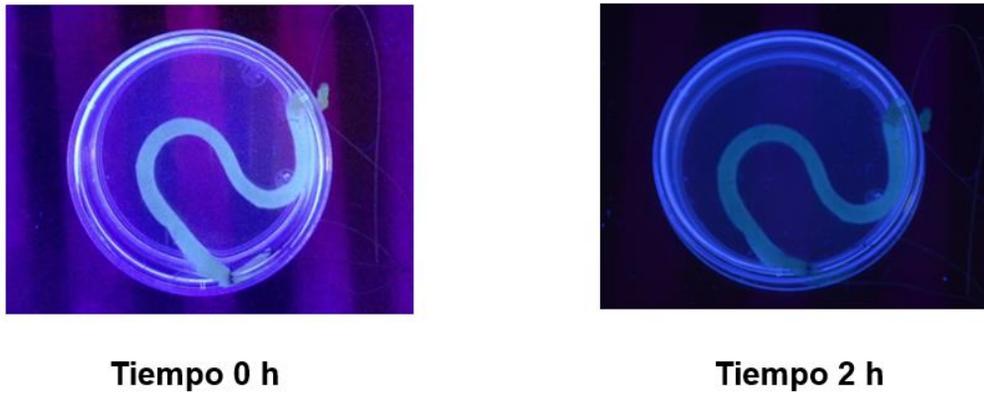


Figura 26. Caja de Petri a diferentes tiempos en el ensayo de la absorción de la proteína verde fluorescente.



Figura 27. Muestras del ensayo de la absorción de la proteína verde fluorescente de la luz intestinal *in vitro*.

## CAPÍTULO 4

### *DISCUSIÓN DE RESULTADOS.*

#### **4.1 Bioinformática.**

Este estudio se centró en la creación de una bacteria que mediante el empleo de vías de secreción con péptidos señales, fuera capaz de secretar al medio extracelular nuestro nuevo análogo del GLP-1 recombinante, así como, de ser autoinducible al ser empleada *in situ*. Es por esto que se optó por la elección de la cepa de *L. lactis subsp. cremoris* MG1363, los péptidos señales PSUsp45 y PSExp4, así como del pLB333, este último, debido a que porta el promotor GroESL inducible por estrés.

En ese sentido, el diseño bioinformático se basó en primera instancia en la creación de los genes pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 y PSExp4/NAGLP-1 y su fusión con el pLB333 digerido, primero, analizando las UTS diseñadas, la fusión de los genes que codifican los péptidos señales (PSUsp45 y PSExp4) con el gen

que codifica el NAGLP-1, permite que, al ser expresados, transporten a nuestro NAGLP-1 por la vía de secreción Sec<sup>60,61</sup>.

Analizando más a detalle cada uno de los genes diseñados, a la UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 se le agregó el promotor GroESL debido a que el pLB333 (Figura 2) no cuenta con el gen del PSUsp45 y el sitio de clonación más próximo se presenta antes del promotor, mientras que, la UTS con el PS parcial Exp4/GLP-1 se pudo fusionar con un sitio de clonación que se encuentra en la región medial del gen PSExp4 que porta el pLB333, justo después de su promotor, por esta misma razón se omitió el promotor GroESL en el diseño de esta UTS.

Por otro lado, las modificaciones realizadas en el gen NAGLP-1, como la adición al inicio del codón GAC el cual codifica para el aminoácido Asp, permitió asemejar la secreción extracelular del NAGLP-1 con la secreción de la proteína Usp45 por la peptidasa señal tipo I<sup>77</sup>.

Por otra parte, al cambiar el codón que codifica la Ala<sup>8</sup> por Gly<sup>8</sup> se eliminó el sitio de reconocimiento por la DPP4, con esta acción según lo reportado en la literatura su vida media se verá aumentada<sup>78</sup>.

## 4.2 Manipulación de *Lactococcus lactis*.

### 4.2.1 Selección de las colonias L.I-PLB.

Como era de esperarse, la bacteria libre de plásmidos, no tuvo crecimiento en el medio de cultivo G-CIM17CAD, debido a que no porta ningún gen que le confiera la capacidad para crecer en medio con cloranfenicol. En contraste, las colonias transformadas con el pLB333 que contienen el gen de resistencia al antibiótico presentaron un crecimiento abundante y un halo de degradación en el agar color rosa, mismo que es ocasionado por la enzima secretada nuc B<sup>66,79</sup>, presente en el pLB333, lo que nos confirmó la correcta transformación de la cepa electrocompetente (Figura 10).

### 4.2.2 Preparación del pLB333.

En la figura 12 se pudo apreciar en carril 2, una banda (2,863 pb peso esperado) correspondiente al peso del pLB333 (digerido con las enzimas BglII y EcoRI), entre las bandas 2,000 pb y 3,000 pb del marcador de peso molecular, así como el fragmento liberado Exp4:Nuc (765 pb peso esperado), entre las bandas de 500 pb y 1,500 pb del marcador de peso molecular de DNA. De la misma manera, en la figura 13 se observó que las bandas del pLB333 digerido con las enzimas NheI y EcoRI (2,998 pb) y el fragmento liberado Exp4:Nuc (630

pb) se observan ligeramente arriba de los pesos esperados. Este ligero aumento entre el peso esperado de las bandas y el peso real, ha sido reportado en muestras de DNA en diversas condiciones que alteran su migración en el gel de agarosa<sup>80,81,82</sup>.

#### *4.2.3 Selección de las colonias L.I-DJ331 y L.I-DJ332.*

Las colonias transformadas *L.I-DJ331* y *L.I-DJ332* presentaron crecimiento moderado sobre el medio de cultivo G-CIM17CAD, esto confirmó que portaban el gen de resistencia al cloranfenicol, sin embargo, a diferencia de la cepa *L.I-PLB*, los plásmidos ya no cuentan con el gen de la Nuc B por lo que no generarán un cambio de color en el medio de cultivo lo que confirmó la correcta transformación de las cepas electrocompetentes. (Figuras 16 y 17).

#### **4.3 Caracterización de los plásmidos pDJ331 y pDJ332.**

Las bandas observadas de las digestiones de los plásmidos pDJ331 y pDJ332, concordaron con los pesos esperados de los plásmidos linearizados y los fragmentos liberados, así como, las bandas observadas de las amplificaciones por PCR de punto final correspondientes a las UTS pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 y PSExp4/NAGLP-1 diseñadas, también tuvieron

la migración esperada, confirmando la correcta ligación de los plásmidos y la correcta transformación de las cepas recombinantes (Figuras 18 y 19).

#### **4.4 Expresión y análisis de las proteínas recombinantes.**

##### *4.4.1 Expresión de NAGLP-1 recombinante.*

En la figura 24 del gel de poliacrilamida de las expresiones de las cepas recombinantes *L.I-DJ331* y *L.I-DJ332* inducidas, se aprecia que las bandas (carril 3 y 5) migraron ligeramente por encima del peso molecular esperado, mientras que las bandas en los carriles 1 y 2 el control del análogo del GLP-1 (Liraglutida Victoza®) se desplazaron correctamente, con respecto a las bandas de 5 kDa y 3.4 kDa de la escalera molecular en el carril 4, esto puede deberse a varios factores, como la evidente contaminación, en los carriles 3 y 5 por partículas del medio de cultivo que no se pudieron eliminar y la poca concentración por parte de las mismas, así como la excesiva concentración por parte de los controles del análogo GLP-1, los cuales afecta en la correcta migración de las bandas<sup>83,84</sup>.

##### *4.4.2 Ensayo Dot Blot del NAGLP-1.*

El revelado de la placa radiográfica mostró 2 señales, la de mayor intensidad correspondiente al NAGLP-1 expresado en la cepa recombinante *L.I-DJ331* y la otra de menor intensidad correspondiente al NAGLP-1 expresado en

la cepa recombinante *L.I-DJ332* (Figura 25). Esta prueba fue confirmatoria para la identidad de las bandas vistas en el gel de poliacrilamida.

#### **4.5 Evaluación de la actividad hipoglucemiante del NAGLP-1 en ratones *in situ*.**

Sorpresivamente los resultados arrojados por la prueba ANOVA en el tiempo -30, nos hizo suponer que después de los 9 días de tratamiento con la cepa *L.I-DJ331* a una densidad de  $1 \times 10^9$  UFC el grupo de estudio "A" mostró una mejora significativa en los niveles de glucemia, mostrando valores promedio inferiores a los 125 mg / dL en estado de ayuno comparado a los grupos B y C que mostraron valores mayores a 150 mg / dL. Esto podría indicarnos que probablemente la liberación de nuestro NAGLP-1 por nuestra cepa recombinante *L.I-DJ331* inoculada vía oral y la absorción de nuestro NAGLP-1 en la luz intestinal de los ratones se llevó acabo de manera constante a lo largo de los días que fueron administrados y esto pudo ocasionar una mejoría en la tolerancia a la glucosa por parte de los ratones de estudio, esta suposición es basada en los estudios *in vitro* realizados durante la expresión de nuestro NAGLP-1 recombinante, en donde determinamos que las mejores condiciones de inducción de la expresión de nuestro NAGLP-1 en nuestra cepa recombinante *L.I-DJ331* fueron en condiciones de estrés para la misma, a una temperatura de 37° C y en un aumento de la concentración de NaCl (2.5 %), condiciones que se encuentran presentes en el intestino del ratón<sup>66</sup>.

Para darle mayor solides a este estudio al mismo tiempo se realizó una prueba de absorción de la proteína verde fluorescente a través de la luz intestinal del intestino de un ratón, en donde por los resultados cualitativos podemos observar que si hubo una absorción parcial de la proteína siendo esta de mayor tamaño (aproximadamente 40 KDa) que nuestro NAGLP-1 (3 KDa), lo que nos permite suponer que si es posible la entrada a través de los enterocitos intestinales de ratón.

A pesar de que el estudio arrojó solo resultados cualitativos, otras bibliografías indican que puede ser posible la absorción de proteínas de manera paracrina, a través de los enterocitos, además de que aún no se conocen por completo todas las posibles vías de entrada de proteínas pequeñas en los enterocitos del intestino<sup>46</sup>.

Por otro lado, uno de los posibles mecanismos por el cual puede actuar nuestra cepa recombinante administrada vía oral es mediante la sobreexpresión y la secreción constante de nuestro NAGLP-1 en la luz intestinal para posteriormente una parte de este ser degradado a tripéptidos y dipéptidos entrando por el transportador de péptidos intestinales 1 (PepT1), para contribuir y después activar la despolarización de la membrana generando salida de calcio del retículo endoplásmico liso y posteriormente la liberación de las vesículas de

GLP-1 endógeno en las células L del intestino. Basados en este fundamento se pudiera suponer que nuestra cepa recombinante *L.-DJ331* también puede actuar indirectamente mediante la secreción de GLP-1 endógeno hacia el torrente sanguíneo<sup>30</sup>.

La prueba de Tukey también arrojó que el grupo B (media de 153 mg / dL glucemia) fue diferente del grupo C (media de 167.5 mg / dL) lo cual indica que probablemente la cepa de *L. Lactis* libre de plásmidos administradas por 9 días también pudieron ocasionar una mejoría en la tolerancia a la glucosa en ayunas probablemente ocasionada por la proteína mayormente expresada en esta cepa USP45 la cual pudo fungir como fuente de aminoácidos posterior a su degradación por las enzimas de la luz intestinal, que al degradarse facilitar su entrada por el transportador de péptidos intestinales 1 (PepT1) ocasionando la despolarización de la membrana de las células L intestinales, el incremento de iones calcio y la posterior fusión de las vesículas del GLP-1 endógeno por las células L del intestino hacia el torrente sanguíneo. Los ratones del grupo C no fueron administrados con ninguna cepa de *lactococcus* lo que nos permite suponer el motivo por el cual no mostraron mejoría en los valores de glucemia en ayunas<sup>59</sup>.

Como era de esperarse, el grupo control positivo liraglutida tuvo un efecto más notable en la prueba de la tolerancia a la glucosa con una media de 143.5 mg/dL inmediatamente después de la administración de la glucosa vía oral, sin

embargo, los valores elevados de la desviación estándar en este análisis nos indican que los resultados no pueden ser del todo concluyentes, dejando como perspectiva el análisis a futuros ensayos. Finalmente podemos observar el efecto inmediato y corto que tiene la liraglutida ya que es de acción rápida en los tiempos 30 y 60.

Finalmente, no podemos descartar que nuestra cepa recombinante *L./DJ331* pueda tener un efecto a mediano plazo con respecto a la tolerancia de la glucosa, como lo indican las mediciones de glucosa del tiempo -30, lo cual también es motivo de estudio en futuros ensayos.

En lo que respecta a la evaluación de la insulina, por los resultados de la prueba ANOVA creemos que nuestra cepa recombinante *L./DJ331* actuó viajando expresando nuestro NAGLP-1 en la luz intestinal, atravesando de manera paracrina las células intestinales, generando secreción de GLP-1 endógeno mediante dipéptidos y tripéptidos para posteriormente viajar por el torrente sanguíneo, llegar hasta las células  $\beta$  del páncreas, unirse a su receptor tipo proteína G y generando la liberación de insulina de la misma manera que lo hizo nuestro control liraglutida en el grupo de estudio C al no haber diferencia significativa entre las medias, mientras que el control negativo B correspondiente a la cepa de *L. Lactis* libre de plásmidos si mostró diferencia significativa en la prueba de Tukey con un 95 % de confianza.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

- Se comprobó la funcionalidad *in silico* e *in vitro* de las unidades de transcripción sintéticas diseñadas pGroESL/PSUsp45/NAGLP-1 y PSExp4/NAGLP-1.
- Se transformó la cepa *L.I-PLB* que secreta la Nuc B con el plásmido pLB333.
- Se obtuvieron y caracterizaron los plásmidos pDJ331 y pDJ332 mediante técnicas de biología molecular.
- Se transformó la cepa silvestre libre de plásmidos *L. lactis* subespecie *cremoris* MG1363 con los plásmidos obtenidos pDJ331 y pDJ332 dando lugar a las cepas *L.I-DJ331* y *L.I-DJ332* que secretan el NAGLP-1.
- Se confirmó la expresión y secreción *in vitro* de un nuevo análogo de GLP-1 recombinante en las cepas de *Lactococcus lactis*, *L.I-DJ331* y *L.I-DJ332* en condiciones de estrés, empleando el promotor GroESL y los péptidos señales Usp45 y Exp4, comprobando la funcionalidad de ambos sistemas de secreción.
- Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, podemos sugerir

que *Lactococcus lactis* empleando el sistema GroESL y los sistemas de secreción PSUsp45 y PSExp4 es un método viable para poder competir contra otros organismos y sistemas de expresión para la producción de proteínas de interés farmacéutico, con capacidad de emplearse en una nueva vía de administración.

- Se demostró que nuestra cepa recombinante *L.I-DJ331* administrada vía oral en ratones de la cepa C57BL/6J diabetizados tiene un efecto hipoglucemiante aparentemente ocasionado por la secreción *in situ* y absorción de nuestro NAGLP-1 recombinante.

### PERSPECTIVAS

- Realizar un ensayo de Western Blot para identificación completa del NAGLP-1.
- Realizar un ensayo del NAGLP-1 frente a diversas peptidasas para evaluar la capacidad de resistencia a la degradación.
- Evaluar el efecto insulínico en la línea celular Hit-T15.
- Realizar un ensayo *in vitro* de permeabilidad de membrana por parte del NAGLP-1 en células epiteliales.

REFERENCIAS

1. Cowan, M. & Riley, L. *Noncommunicable diseases country profiles 2018*. World Health Organization. <http://apps.who.int/iris>. (2018).
2. Hall, R., Hall, I. P. & Sayers, I. Genetic risk factors for the development of pulmonary disease identified by genome-wide association. *Respirology* 24, 204–214 (2019).
3. Shukla, H., Mason, J. L. & Sabyah, A. Identifying genetic markers associated with susceptibility to cardiovascular diseases. *Futur. Sci. OA* 5, (2019).
4. Karlsson, I. K. *et al.* Genetic susceptibility to cardiovascular disease and risk of dementia. *Transl. Psychiatry* 7, e1142 (2017).
5. Hansen, T. Genetics of type 2 diabetes. *Curr. Sci.* 83, 1477–1482 (2002).
6. Prasad, R. B. & Groop, L. Genetics of type 2 diabetes—pitfalls and possibilities. *Genes (Basel)*. 6, 87–123 (2015).
7. IDF. *Diabetes atlas ninth edition 2019*. International Diabetes Federation. <https://www.diabetesatlas.org> (2019).
8. INSP. Diabetes, causa principal de muerte en México 2018. Instituto Nacional de Salud Pública. <https://www.insp.mx/presencia-insp/3877->

- diabetes-causa-muerte-mexico.html. (2018).
9. INSP. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016*. Instituto Nacional de Salud Pública. (2017).
  10. INSP. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018*. Instituto Nacional de Salud Pública  
[https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut\\_2018\\_presentacion\\_resultados.pdf](https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf) (2019).
  11. Fernández-Morera, J. L., Rodríguez-Rodero, S., Menéndez-Torre, E. & Fraga, M. F. The Possible Role of Epigenetics in Gestational Diabetes: Cause, Consequence, or Both. *Obstet. Gynecol. Int.* 1–7 (2010).
  12. Abell, S. K., De Courten, B., Boyle, J. A. & Teede, H. J. Inflammatory and other biomarkers: Role in pathophysiology and prediction of gestational diabetes mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 13442–13473 (2015).
  13. Franzago, M., Fraticelli, F., Stuppia, L. & Vitacolonna, E. Nutrigenetics, epigenetics and gestational diabetes: consequences in mother and child. *Epigenetics* **14**, 215–235 (2019).
  14. Li, X., Yang, W. & Fang, Y. Epigenetic Profiles Reveal That ADCYAP1 Serves as Key Molecule in Gestational Diabetes Mellitus. *Comput. Math. Methods Med.* (2019).
  15. Elliott, H. R., Sharp, G. C., Relton, C. L. & Lawlor, D. A. Epigenetics and gestational diabetes: a review of epigenetic epidemiology studies and their

- use to explore epigenetic mediation and improve prediction. *Diabetologia* **62**, 2171–2178 (2019).
16. Eschler, D. C. *et al.* Circulating Levels of Bone and Inflammatory Markers in Gestational Diabetes Mellitus. *Biores. Open Access* **7**, 123–130 (2018).
  17. Kuzmicki, M. *et al.* Circulating Pro- and anti-inflammatory cytokines in polish women with gestational diabetes. *Horm. Metab. Res.* **40**, 556–560 (2008).
  18. Yoon, J.-W. & Jun, H.-S. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am. J. Ther.* **12**, 580–591 (2005).
  19. Saberzadeh-Ardestani, B. *et al.* Type 1 diabetes mellitus: Cellular and molecular pathophysiology at a glance. *Cell J.* **20**, 294–301 (2018).
  20. Simmons, K. M. Type 1 diabetes: A predictable disease. *World J. Diabetes* **6**, 380 (2015).
  21. Paschou, S. A., Papadopoulou-Marketou, N., Chrousos, G. P. & Kanaka-Gantenbein, C. On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Endocr. Connect.* **7**, R38–R46 (2018).
  22. Jerram, S. T., Dang, M. N. & Leslie, R. D. The Role of Epigenetics in Type 1 Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **17**, (2017).
  23. Diabetes, D. O. F. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **33**, (2010).

24. Diao, J., Asghar, Z., Chan, C. B. & Wheeler, M. B. Glucose-regulated glucagon secretion requires insulin receptor expression in pancreatic  $\alpha$ -cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 33487–33496 (2005).
25. Gardner, D. G. & Shoback, D. *Endocrinología básica y clínica. GREENSPAN*. (Mc Graw Hill, 2012).
26. Cersosimo, E., Triplitt, C., Mandarino, L. J. & DeFronzo, R. A. *Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus*. (MDText.com, Inc., 2018).
27. Saini, V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes* **1**, 68 (2010).
28. Rodriguez-Diaz, R., Dando, R. & Jacques-Silva, M. C. Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming human beta cell function. **5**, 1–8 (2016).
29. Beurel, E. & Nemeroff, C. B. Interaction of stress, corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin and behaviour Eléonore. *Brain Imaging Behav. Neurosci.* 289–320 (2014).
30. Daniel, H. & Zietek, T. Taste and move: Glucose and peptide transporters in the gastrointestinal tract. *Exp. Physiol.* **100**, 1441–1450 (2015).
31. Kawamori, D. *et al.* Insulin signaling in alpha cells modulates glucagon secretion in vivo. **9**, 350–361 (2010).
32. Badawi. Type 2 diabetes mellitus and inflammation: Prospects for biomarkers of risk and nutritional intervention. *Diabetes, Metab. Syndr.*

*Obes. Targets Ther.* 173 (2010).

33. Balderas Rentería, I. *Diabetes, obesidad y síndrome metabólico: Un abordaje multidisciplinario.* (2015).
34. Ahmadian, M., Myoung, J. & Evans, R. M. PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* **19**, (2013).
35. Le Fur, S., Le Stunff, C. & Bougnères, P. Increased insulin resistance in obese children who have both 972 IRS-1 and 1057 IRS-2 polymorphisms. *Diabetes* **51**, 3–6 (2002).
36. Hani, E. H. *et al.* Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel gene (KIR6.2/BIR): A meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians. *Diabetologia* **41**, 1511–1515 (1998).
37. Hall, E. *et al.* DNA methylation of the glucagon-like peptide 1 receptor (GLP1R) in human pancreatic islets. *BMC Med. Genet.* **14**, 1 (2013).
38. Ling, C. *et al.* Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. *Diabetologia* **51**, 615–622 (2008).
39. Yang, B. T. *et al.* Insulin promoter DNA methylation correlates negatively with insulin gene expression and positively with HbA1c levels in human pancreatic islets. *Diabetologia* **54**, 360–367 (2011).
40. Dayeh, T. *et al.* Genome-Wide DNA Methylation Analysis of Human

- Pancreatic Islets from Type 2 Diabetic and Non-Diabetic Donors Identifies Candidate Genes That Influence Insulin Secretion. *PLoS Genet.* **10**, (2014).
41. Tsalamandris, S. *et al.* The role of inflammation in diabetes: Current concepts and future perspectives. *Eur. Cardiol. Rev.* **14**, 50–59 (2019).
42. WHO. *Global Report on Diabetes*. vol. 978 <http://www.who.int/about/licensing/> (2016).
43. WHO. OMS | Qué es la diabetes. *WHO* (2013).
44. Raveendran, A. V, Chacko, E. C. & Pappachan, J. M. Non-pharmacological Treatment Options in the Management of Diabetes Mellitus. *Eur. Endocrinol.* **40**, 854–857 (2018).
45. Thulé, P. M. Mechanisms of current therapies for diabetes mellitus type 2. *Am. J. Physiol. - Adv. Physiol. Educ.* **36**, 275–283 (2012).
46. Araújo, F., Fonte, P., Santos, H. A. & Sarmiento, B. Oral delivery of glucagon-like peptide-1 and analogs: alternatives for diabetes control? *J. Diabetes Sci. Technol.* **6**, 1486–97 (2012).
47. Holst, J. J. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol. Rev.* **87**, 1409–1439 (2007).
48. Cantini, G., Mannucci, E. & Luconi, M. Perspectives in GLP-1 Research: New Targets, New Receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **27**, 427–438 (2016).

49. Agarwal, P., Khatri, P., Billack, B., Low, W.-K. & Shao, J. Oral Delivery of Glucagon Like Peptide-1 by a Recombinant *Lactococcus lactis*. *Pharm. Res.* **31**, 3404–3414 (2014).
50. Prickett, K. S. & Young, A. A. US 6,924,264 B1 United States Patent MODIFIED EXENDINS AND EXENDIN AGONISTS. vol. 1 (2005).
51. Kyriacou, A. & Ahmed, A. B. Exenatide use in the management of type 2 diabetes mellitus. *Pharmaceuticals* **3**, 2554–2567 (2010).
52. Newsome, J. S. Lixisenatide: A New Option for Managing Type 2 Diabetes. *J. Pharm. Technol.* **33**, 195–203 (2017).
53. Mehta, A., Marso, S. P. & Neeland, I. J. Liraglutide for weight management: a critical review of the evidence. *Obes. Sci. Pract.* **3**, 3–14 (2016).
54. Rendell, M. S. Albiglutide for the management of type 2 diabetes. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* **13**, 1–8 (2018).
55. Kuppana, A., Bhaskara, M. & Venjivaka, S. Process for the preparation of liraglutide WO2014/199397 A2. (2014).
56. Gandavadi, S. K. & Nunaswamy, N. Process for preparation of liraglutide WO 2016 005960 A1. (2016).
57. Bonde, C. Formulations of peptides containing propylene glycol that are optimal for the production and use in injection devices. MXPA06005581A. (2004).

58. Le Loir, Y. *et al.* Protein secretion in *Lactococcus lactis*: An efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microb. Cell Fact.* **4**, 1–13 (2005).
59. Song, A. A., In, L. L. A., Lim, S. H. E. & Rahim, R. A. A review on *Lactococcus lactis* : from food to factory. *Microb. Cell Fact.* 1–15 (2017).
60. Morello, E. *et al.* *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 48–58 (2007).
61. Freudl, R. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. *Microb. Cell Fact.* **17**, 1–10 (2018).
62. Poquet, I., Ehrlich, S. D. & Gruss, A. An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: Application to *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **180**, 1904–1912 (1998).
63. Ng, D. T. W. & Sarkar, C. A. Engineering signal peptides for enhanced protein secretion from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 347–356 (2013).
64. Le Loir, Y., Gruss, A., Ehrlich, S. D. & Langella, P. A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **180**, 1895–1903 (1998).
65. Desmond, C. *et al.* Improved Stress Tolerance of GroESL-Overproducing *Lactococcus lactis* and Probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. **70**,

5929–5936 (2004).

66. Benbouziane, B. *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.* **168**, 120–129 (2013).
67. Steidler, L. *et al.* Treatment of Murine Colitis by *Lactococcus lactis* Secreting. *Science (80-. )*. **289**, 1352–1355 (2000).
68. Shouval, D. S. *et al.* Interleukin 10 Receptor Signaling: Master Regulator of Intestinal Mucosal Homeostasis in Mice and Humans. 177–210 (2014).
69. Langella, P. *et al.* Production of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein in *Lactococcus lactis* Production of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 917–22 (2002).
70. Bermúdez-Humarán, L. G. *et al.* Intranasal Immunization with Recombinant *Lactococcus lactis* Secreting Murine Interleukin-12 Enhances Antigen-Specific Th1 Cytokine Production. *Infect. Immun.* **71**, 1887–1896 (2003).
71. Vandenbroucke, K. *et al.* Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis. *Mucosal Immunol.* **3**, 49–56 (2009).
72. Ciaćma, K. *et al.* Secretion of tumoricidal human tumor necrosis factor-

- related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) by recombinant *Lactococcus lactis*: Optimization of in vitro synthesis conditions. *Microb. Cell Fact.* **17**, 1–16 (2018).
73. Ng, D. T. W. & Sarkar, C. A. Nisin-inducible secretion of a biologically active single-chain insulin analog by *Lactococcus lactis* NZ9000. *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 1987–1996 (2011).
74. Ma, Y. *et al.* Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing HSP65 and tandemly repeated P277 reduces the incidence of type I diabetes in non-obese diabetic mice. *PLoS One* **9**, 1–10 (2014).
75. Arora, T. *et al.* Microbially produced glucagon-like peptide 1 improves glucose tolerance in mice. *Mol. Metab.* **5**, 725–730 (2016).
76. Zeng, Z. *et al.* Recombinant *Lactococcus lactis* expressing bioactive exendin-4 to promote insulin secretion and beta-cell proliferation in vitro. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 7177–7186 (2017).
77. Schneewind, O. & Missiakas, D. Sec-Secretion and Sortase-Mediated Anchoring of Proteins in Gram-Positive Bacteria. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **23**, 1–7 (2008).
78. Manandhar, B. & Ahn, J. M. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogs: Recent advances, new possibilities, and therapeutic implications. *J. Med. Chem.* **58**, 1020–1037 (2015).
79. Lachica, R. V., Genigeorgis, C. & Hoepflich, P. D. Metachromatic agar-

diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.* **21**, 585–587 (1971).

80. Stellwagen, N. C. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis* **30**, S188–S195 (2014).
81. Ersson, C. & Möller, L. The effects on DNA migration of altering parameters in the comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments. *Mutagenesis* **26**, 689–695 (2011).
82. Stellwagen, N. C. & Stellwagen, E. Effect of the matrix on DNA electrophoretic mobility. *J. Chromatogr. A* **1216**, 1917–1929 (2009).
83. Berg, J., Tymoczko, J. & Stryer, L. *The Purification of Proteins Is an Essential First Step in Understanding Their Function*. vol. Biochemist (2002).
84. Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G. & Deber, C. M. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 1760–1765 (2009).