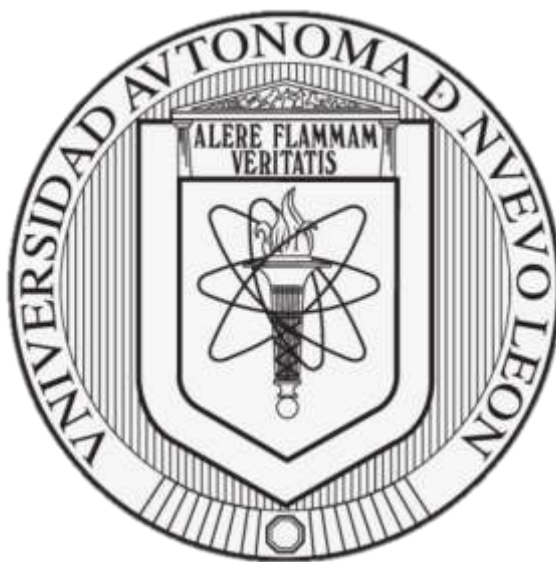


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**“EXPRESIÓN DE QUIMIOTRIPSINÓGENO RECOMBINANTE HUMANO
EN LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. *CREMORIS* MG1363, Y EVALUACIÓN *IN*
VITRO DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA”**

Por

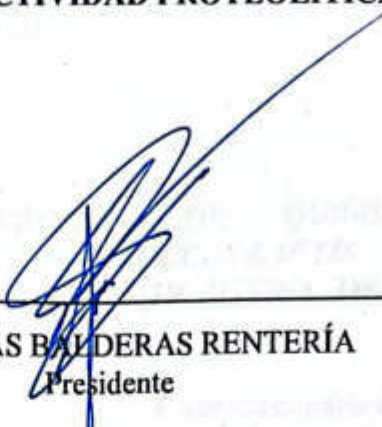
ANGELA ROMERO MENDOZA

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

Julio, 2026

**"EXPRESIÓN DE QUIMIOTRIPSINÓGENO RECOMBINANTE HUMANO EN
LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. CREMORIS MG1363, Y EVALUACIÓN IN
VITRO DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA"**

Aprobación de la Tesis:



DR. ISAÍAS BALDERAS RENTERÍA
Presidente

DR. EDER UBALDO ARREDONDO ESPINOZA
Secretario

DRA. FLORA EDUARDA CRUZ LOPEZ
Vocal

DRA. ELVIRA GARZA GONZALEZ
Vocal

Dr. Javier Rivera de la Rosa
Sub-Director de Posgrado

**"EXPRESIÓN DE QUIMIOTRIPSINÓGENO RECOMBINANTE HUMANO
EN *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *CREMORIS* MG1363, Y EVALUACIÓN *IN*
VITRO DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA"**

Revisión de la Tesis:



DR. ISAIÁS BALDERAS RENTERÍA
Director de Tesis

DR. EDER UBALDO ARREDONDO ESPINOZA
Comité tutorial

DRA. FLORA EDUARDA CRUZ LÓPEZ
Comité tutorial

DRA. ELVIRA GARZA GONZALEZ
Comité tutorial

DR. JAVIER RIVERA DE LA ROSA
Sub-Director de Posgrado

RESÚMEN**Q.F.B Angela Romero Mendoza****Fecha de Graduación: Junio, 2026.****Universidad Autónoma de Nuevo León****Facultad de Ciencias Químicas**

Título del Estudio: “EXPRESIÓN DE QUIMIOTRIPSINÓGENO RECOMBINANTE HUMANO *EN LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *CREMORIS* MG1363, Y EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Número de páginas: 112**Candidata para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia****Área de estudio: Biotecnología Farmacéutica**

Propósito y Método de Estudio: La insuficiencia pancreática exocrina es una de las principales complicaciones en enfermedades como la fibrosis quística, caracterizada por la deficiencia en la secreción de enzimas digestivas, lo que conduce a malabsorción y desnutrición. En este contexto, la producción recombinante de zimógenos pancreáticos representa una alternativa biotecnológica de interés terapéutico. El presente estudio tuvo como objetivo diseñar, construir y evaluar la expresión del gen humano *CTRB1*, que codifica el quimiotripsinógeno B1, en el sistema de expresión *Lactococcus lactis* MG1363. Para ello, se diseñó una unidad de transcripción sintética bajo el control del promotor pGroESL, incorporando el péptido señal PSExp4 para dirigir la secreción de la proteína recombinante.

El diseño bioinformático incluyó la verificación del marco de lectura abierto, la predicción del péptido señal mediante SignalP, así como la identificación de dominios funcionales y

residuos conservados utilizando InterPro. Adicionalmente, se realizó un análisis estructural tridimensional mediante UCSF Chimera, confirmando la presencia y correcta disposición espacial de la triada catalítica característica de las serin proteasas (His75, Asp120 y Ser213). El gen sintetizado fue clonado inicialmente en el vector pUC57 y posteriormente subclonado en el vector de expresión pLB333. La construcción del plásmido recombinante pLB333-CTRB1 fue confirmada mediante PCR, electroforesis en gel de agarosa y secuenciación Sanger. La expresión de la proteína recombinante se evaluó en *Lactococcus lactis*, y su análisis se llevó a cabo mediante SDS-PAGE. Finalmente, la actividad proteolítica fue determinada mediante un ensayo enzimático utilizando el sustrato BTEE, posterior a la activación del zimógeno con tripsina.

Contribuciones y conclusiones: Los resultados obtenidos demostraron la correcta construcción del plásmido recombinante pLB333-CTRB1 y la expresión de una proteína con un peso molecular aproximado al esperado (~26 kDa). El análisis bioinformático confirmó la identidad funcional de la proteína y la conservación de los elementos estructurales necesarios para su actividad catalítica. El ensayo enzimático evidenció actividad proteolítica tras la activación del zimógeno, lo que sugiere que la proteína recombinante conserva su funcionalidad biológica. Estos hallazgos respaldan el uso de *Lactococcus lactis* como un sistema eficiente para la producción heteróloga de proteínas de interés biomédico.

Este trabajo aporta evidencia sobre la viabilidad de producir quimiotripsinógeno humano recombinante mediante sistemas bacterianos, abriendo la posibilidad de su aplicación en estrategias terapéuticas orientadas al tratamiento de enfermedades asociadas a la deficiencia enzimática digestiva.

Firma de asesor: _____

Dr. Isaias Balderas Rentería

DEDICATORIA

EBENEZER

*A Jesús, mi fiel amigo,
porque hasta aquí me has sostenido.*

AGRADECIMIENTOS

A la **Facultad de Ciencias Químicas (UANL)**, por brindarme la formación académica y las herramientas necesarias para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al **Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos**, por facilitar las instalaciones, y recursos que hicieron posible la realización de este proyecto.

A la **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación**, por el apoyo económico otorgado a través de la beca, la cual fue fundamental para la continuidad de mis estudios de posgrado.

Al **Instituto de Biotecnología** de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, por la oportunidad de realizar una estancia de investigación que enriqueció significativamente mi formación académica y experimental.

Al **Dr. Isaías Balderas Rentería**, por la dirección académica brindada durante el desarrollo de este trabajo, así como por las observaciones realizadas y el apoyo a lo largo del proceso.

A mi **comité tutorial**: Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza, Dra. Flora Eduarda Cruz y Dra. Elvira Garza González por su acompañamiento académico, sus valiosas observaciones y el seguimiento brindado durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos: **Aissa Nieto, Aldo González, Adela, Daniela Gallegos, Ariel Balderas, Laura Montenegro, Andrea Chavez, Marbella Galán, Carlos Mireles, Andre Garza, Albino Rodríguez, Lalo y Gael**; por su apoyo y compañerismo, por hacer de los días

complicados en el laboratorio momentos más amenos, y por las experiencias compartidas a lo largo de este proceso, valoro mucho sus consejos y su amistad.

Porque, al final, los verdaderos resultados significativos son las amistades que se construyen en el camino.

A **Aissa**, por su amistad, su apoyo constante y por compartir conmigo este camino. Gracias por tu asesoría a lo largo de este proyecto, por tu paciencia y por estar presente en cada momento importante. Has sido, sin duda, un gran sostén en mi vida durante estos años, y tu presencia hizo posible que este proceso fuera más llevadero y significativo. Te quiero mucha amiga, gracias.

A mis amigos fuera del ámbito académico, **Ale** y **Miguel** por su apoyo y compañía y por recordarme la importancia de mantener el equilibrio más allá del laboratorio.

A mi novio **Tomás García**, por llegar en el momento indicado, por hacer de este sueño también suyo y por impulsarme a seguir adelante aun en medio de las dificultades. Tu apoyo, confianza y compañía fueron fundamentales para poder concluir este proceso, ¡te amo!

A mis hermanas, **Montse** y **Danna**. A Montse, por ser una inspiración constante y un ejemplo que me motiva a ser mejor cada día, así como ella, a Danna, por impulsarme a esforzarme y recordarme que todo es posible; sé que lograras grandes cosas, muchísimo mejores de todo lo que yo soy. Y a **Isabella**, por ser mi mayor motor e inspiración en la vida, por su luz y por darme la fuerza para seguir adelante incluso en los días más difíciles.

A Candy, siempre en mi corazón. Y a One Direction, por acompañarme siempre.

A mis abuelos, **Armando Mendoza, Isabel Flores, Víctor Romero y Ofelia**, por sus oraciones, su cariño y por estar siempre presentes de distintas formas en mi vida.

Finalmente, a mis padres, **Víctor Romero y Fatima Mendoza** por su apoyo incondicional, por acompañarme día a día, por sus consejos, por sus abrazos cada vez que lo necesité, y sobre todo por sus oraciones, por orar por mí en cada seminario departamental, en cada junta, en cada experimento importante, esto no lo hubiera logrado sin ustedes, y sus oraciones. Sin duda, es por y para ustedes. GRACIAS.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las mutaciones del gen CFTR según su efecto funcional. .	10
Tabla 2. Estrategias terapéuticas utilizadas en el manejo de la fibrosis quística y sus principales ventajas y desventajas ^{27,31,35}	18
Tabla 3. Condiciones experimentales para la digestión con EcoRI.....	50
Tabla 4. Condiciones experimentales para doble digestión con EcoRI y NsiI.	51
Tabla 5. Condiciones de reacción para PCR utilizando Master Mix.	54
Tabla 6. Parámetros estructurales de la proteína CTRB1 en UCSF ChimeraX versión 1.7.1.....	72
Tabla 7. Secuencias y características fisicoquímicas de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen CTRB1.....	75
Tabla 8. Oligonucleótidos empleados para la confirmación del vector pLB333.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura y mecanismo de activación del canal CFTR en células epiteliales^{12,15}. El regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) es un canal de cloruro localizado en la membrana apical, compuesto por dos dominios transmembrana (TMD1 y TMD2), dos dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2) y un dominio regulador (R). La activación del canal depende de la fosforilación del dominio R por la proteína quinasa A (PKA), así como de la unión e hidrólisis de ATP en los dominios NBD, lo que permite la apertura del canal y el transporte de iones cloruro (Cl⁻) hacia el lumen extracelular. Figura elaborada por la autora mediante herramienta digital, con base en la literatura científica.....4

Figura 2. Secreción mediante el sistema Sec en *Lactococcus lactis*. La proteína recombinante es sintetizada como una preproteína que contiene el péptido señal Exp4, el cual dirige su translocación a través del complejo SecYEG mediante la acción de la ATPasa SecA. Durante este proceso, la proteína es transportada en estado parcialmente desplegado y, tras atravesar la membrana citoplasmática, la peptidasa de señal escinde el péptido señal, liberando la proteína recombinante al espacio extracelular. Figura elaborada por la autora mediante herramienta de generación gráfica (FigureLabs), con base en la literatura del sistema Sec.....23

Figura 3. Mapa esquemático del plásmido pLB333. Representación circular del plásmido pLB333. El casete de expresión está bajo el control del promotor inducible

pGroESL, seguido de la señal de secreción Exp4, que dirige la proteína al sistema de exportación tipo Sec.....27

Figura 4. Secuencia del gen CTRB1 optimizado con sitios de restricción. Secuencia nucleotídica del gen CTRB1 optimizado para su expresión en *Lactococcus lactis*. Se indican los sitios de restricción NsiI (verde) y EcoRI (azul), así como los nucleótidos adicionales.....66

Figura 5. Validación bioinformática de la secuencia CTRB1. A) Traducción de la secuencia nucleotídica mediante ExPASy, mostrando la fusión en marco de lectura del péptido señal Exp4 (rosa) con la proteína CTRB1 (naranja). B) Análisis de homología mediante alineamiento de bases de datos (NCBI/UniProt), donde se observa una alta identidad con quimiotripsinógeno humano (CTRB1). C) Identificación de dominios funcionales mediante InterPro, evidenciando la presencia del dominio característico de proteasas tipo tripsina (Peptidase S1), propio de la familia de serin-proteasas.68

Figura 6. Validación funcional y de homología de la proteína CTRB1 recombinante. A) Predicción de dominios y firmas funcionales mediante FASTA36, integrando bases de datos como PROSITE, Pfam y otras plataformas incluidas en InterPro, donde se identifica el sitio activo característico de proteasas de serina tipo tripsina (IPR033116) localizado en la región caralítica de la proteína. B) Resultado del alineamiento de secuencia utilizando FASTA36 contra la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot mostrando una identidad del 99.6% con la proteína CTRB1 humana y en E-value altamente significativa.70

Figura 7. Validación estructural del modelo tridimensional de CTRB1 obtenido mediante AlphaFold. A) Superposición estructural entre el modelo de CTRB1 predicho por AlphaFold (verde) y la estructura cristalográfica de la α -quimotripsina humana (PDB: 1GCT, azul), obtenida mediante la herramienta MatchMaker de UCSF ChimeraX. **B)**

Acercamiento al sitio activo del modelo de CTRB1 mostrando la tríada catalítica conformada por His75, Asp120 y Ser213. Los residuos se representan en ball-and-stick coloreados por elemento químico y las líneas punteadas indican las distancias entre His75 ND1–Asp120 OD2 (2.716 Å) y His75 NE2–Ser213 OG (2.817 Å).....72

Figura 8. Predicción del péptido señal Exp4 de la proteína CTRB1 mediante SignalP 5.0.....74

Figura 9. Representación del plásmido recombinante pLB333-CTRB1 obtenido mediante clonación in silico en la plataforma Benchling.78

Figura 10. Colonias obtenidas tras la transformación de E. coli DH5a con el plásmido pUC57-CTRB1 en agar LB con ampicilina.80

Figura 11. Amplificación del gen CTRB1 mediante PCR en gel agarosa 1%. Se observa una banda correspondiente al tamaño esperado del inserto de ~773 pb.81

Figura 12. Colonias bacterianas obtenidas tras la transformación del constructo pLB333-CTRB1 recombinante en células electrocompetentes. La presencia de colonias en medio selectivo indica la incorporación exitosa del plásmido recombinante.83

Figura 13. Verificación del inserto CTRB1 y del vector pLB333 mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. A) Producto de PCR del gen CTRB1 (~773 pb). B) Banda correspondiente al vector pLB333 (~2763 pb).84

Figura 14. Verificación de la integración del gen CTRB1 en el vector pLB333 mediante PCR, en gel agarosa 1% (~3482 pb)86

Figura 15. Electroferograma representativo de la secuenciación de Sanger del constructo pLB333-CTRB1 visualizado en la plataforma Benchling.....87

Figura 16. Análisis de la expresión de la proteína recombinante CTRB1 mediante SDS-PAGE al 12%. En el carril 1 se observa la proteína CTRB1 con un peso molecular

aproximado de ~26kDa. En el carril 2 se muestra el control positivo correspondiente a la proteína Exp4.89

Figura 17. Evaluación de la actividad enzimática de CTRB1 recombinante mediante ensayo con BTEE en muestras tratadas con TCA. os valores representan el promedio de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar94

Figura 18. Evaluación de la actividad enzimática de CTRB1 en el sobrenadante del cultivo bacteriano mediante ensayo con BTEE. os valores representan el promedio de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar94

NOMENCLATURA

Abreviatura Significado

FQ Fibrosis Quística

CFTR Regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística
(Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)

IPE Insuficiencia pancreática exocrina

L. lactis *Lactococcus lactis*

GRAS Generally Recognized As Safe (generalmente reconocido como seguro)

CTRB1 Quimiotripsinógeno B1 (humano)

UTS Unidad de transcripción sintética

pLB333 Plásmido pLB333 (vector de expresión en *L. lactis*)

ORF Open Reading Frame (marco de lectura abierto)

IL-10 Interleucina-10

IL-12 Interleucina-12

TGF- β 1 Factor de crecimiento transformante beta 1

SLPI	Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (inhibidor de leucoproteasa secretoria)
HtrA	Proteasa HtrA (proteasa de alta temperatura requerida A)
DSS	Dextran sulfato de sodio (agente inflamatorio usado en modelo de colitis)
MPO	Mieloperoxidasa
ENaC	Epithelial Na ⁺ Channel (canal epitelial de sodio)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
SDS	Dodecil sulfato de sodio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ATP	Adenosín trifosfato (trifosfato de adenosina)
ADN	Ácido desoxirribonucleico (DNA)
ARN	Ácido ribonucleico (RNA)

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Transporte iónico en células epiteliales	1
1.1.1	Transporte de iones	2
1.1.2	Transportador ABC	3
1.2	Fibrosis Quística	5
1.2.1	Gen CFTR y su proteína	5
1.2.2	Mutaciones en el regulador de transmembrana de la fibrosis quística.....	7
1.2.3	Correlaciones genotipo-fenotipo en la Fibrosis Quística	8
1.2.4	Consecuencias celulares de la disfunción de CFTR	11
1.2.5	Fisiopatología de la Fibrosis Quística	12
1.2.6	Diagnóstico de Fibrosis Quística	15
1.2.7	Tratamiento de la Fibrosis Quística	17
1.3	<i>Lactococcus lactis</i> como medio de entrega.....	19
1.3.1	Generalidades de <i>L. lactis</i>	19
1.3.2	Mecanismo de secreción de proteínas en <i>L. lactis</i>	22
1.4	Plásmido pLB333	25
1.5	Antecedentes.....	28
1.5.1	Malnutrición en fibrosis quística: prevalencia, mortalidad y trasplante en México	28

1.5.2 <i>Lactococcus lactis</i> como vehículo para la administración de fármacos	30
1.6 Justificación.....	34
1.6.2 Hipótesis.....	35
1.6.3 Objetivos	36
MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	37
2.1 Materiales y Reactivo	37
2.2 Equipos	38
2.3 Metodología experimental	39
2.3.1 Bioinformática.....	39
2.4 Condiciones experimentales para la manipulación de <i>Lactococcus lactis</i> ...	44
2.5 Clonación molecular.....	47
2.5.1 Preparación de células químicamente competentes de <i>Escherichia coli</i>	47
2.5.2 Transformación de <i>Escherichia coli</i> con pUC57 CTRB1.....	48
2.5.3 Extracción de ADN plasmídico	49
2.5.4 Preparación y caracterización del inserto <i>CTRB1</i> y del vector pLB333	50
2.5.5 Ligación del inserto <i>CTRB1</i> al vector pLB333	52
2.5.6 Transformación bacteriana de <i>L. lactis</i> electrocompetentes con pLB333CTRB1 recombinante	52
2.5.7 Confirmación del plásmido recombinante pLB333CTRB1	53
2.6 Expresión de CTRB1 en <i>Lactococcus lactis</i>.....	56

2.6.1 Preparación de las muestras proteicas	56
2.6.2 Precipitación de muestras para análisis por SDS-PAGE y evaluación de actividad enzimática	57
2.6.3 Preparación de muestras para evaluación de actividad enzimática.....	57
2.6.4 Cuantificación de proteínas mediante el método BCA	58
2.6.5 Análisis por SDS-PAGE	59
2.7 Análisis de expresión e inmunodetección mediante Western Blot	60
2.8 Evaluación de la actividad proteolítica del quimiotripsinógeno B1 recombinante	62
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
3.1 Bioinformática	65
3.1.1 Secuencias finales para la UTS CTRB1	65
3.1.2 Verificación <i>in silico</i> de la secuencia <i>CTRB1</i>	67
3.1.3 Análisis estructural de la proteína CTRB1	71
3.1.4 Análisis <i>in silico</i> de la señal de secreción mediante SignalP	73
3.1.5 Diseño y evaluación <i>in silico</i> de los oligonucleótidos	75
3.1.6 Construcción <i>in silico</i> del plásmido recombinante pLB333-CTRB1	77
3.2 Clonación Molecular	79
3.2.1 Transformación de <i>Escherichia coli DH5a</i> con pUC57-CTRB1	79
3.2.2 Construcción del plásmido recombinante pLB333-CTRB1	82

3.2.3 Confirmación del constructo pLB333-CTRB1 mediante PCR.....	84
3.2.4 Confirmación del constructo pLB333-CTRB1 mediante secuenciación de Sanger	87
3.3 Expresión y análisis del quimiotripsinógeno recombinante	88
3.3.1 Análisis de la proteína CTRB1 recombinante mediante SDS PAGE	88
3.4 Evaluación de CTRB1 recombinante <i>in vitro</i> mediante ensayo enzimático	92
3.4.1 Ensayo enzimático de la proteína recombinante CTRB1	92
4 DISCUSIÓN.....	95
5 CONCLUSIONES	98
6 PERSPECTIVAS.....	100
REFERENCIAS	101
Anexos A.....	108
Anexos B.....	110

CAPÍTULO 1

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Transporte iónico en células epiteliales

Las células epiteliales forman capas continuas que recubren superficies y cavidades del organismo y desempeñan funciones esenciales en la absorción, secreción y transporte de sustancias. Estas células constituyen una barrera selectiva que regula el intercambio entre el medio externo e interno, siendo fundamentales en órganos como pulmones, intestino, riñones y glándulas exocrinas^{1,2}.

El transporte epitelial se lleva a cabo mediante mecanismos regulados que permiten el movimiento de iones, agua y solutos a través del epitelio. Este proceso ocurre principalmente a través de dos rutas: la vía transcelular y la vía paracelular^{1,3}. La vía transcelular implica el paso de sustancias a través del interior de la célula, atravesando secuencialmente las membranas apical y basolateral mediante la acción coordinada de canales iónicos, transportadores y bombas^{1,3}. En contraste, la vía paracelular tiene lugar

entre células adyacentes a través de las uniones estrechas, cuya permeabilidad depende de proteínas como claudinas y ocludinas^{1,2}.

La distribución diferencial de proteínas de transporte en cada dominio celular permite mantener gradientes electroquímicos y osmóticos necesarios para la homeostasis tisular^{3,4}.

En este contexto, el movimiento de iones adquiere un papel central, ya que participa directamente en la regulación del volumen celular y el equilibrio ácido-base y la hidratación de las secreciones epiteliales^{5,6}.

1.1.1 Transporte de iones

El transporte de iones constituye uno de los principales mecanismos mediante los cuales los epitelios regulan su función fisiológica^{3,7}. Iones como el cloruro (Cl^-), sodio (Na^+) y bicarbonato (HCO_3^-) participan en procesos que determinan el equilibrio osmótico, el pH intracelular y el movimiento de agua a través de las membranas celulares.

En el sistema respiratorio, el transporte de cloruro, sodio y bicarbonato regula la hidratación de la capa líquida superficial del epitelio de las vías aéreas, lo que influye en la viscosidad del moco y en la eficiencia de los mecanismos de defensa locales^{8,9}. En el sistema digestivo, el transporte iónico controla la absorción y secreción de líquidos y electrolitos en el intestino delgado y el colon; su alteración puede dar lugar a condiciones como diarrea secretora o estreñimiento^{5,10}. En el sistema urinario, bombas y transportadores presentes en los túbulos renales como la Na^+/K^+ -ATPasa y el intercambiador AE1, participan en la reabsorción selectiva de iones y el mantenimiento del equilibrio ácido-base.¹¹

Debido a su participación en múltiples funciones fisiológicas, las alteraciones en el transporte de iones se asocian con diversas patologías. Estos procesos dependen de la acción de proteínas especializadas en el transporte transmembrana, entre las cuales destacan diferentes familias de transportadores con funciones específicas.

1.1.2 Transportador ABC

Entre las proteínas que participan en el transporte transmembrana de solutos, destaca la familia de transportadores ABC (ATP Binding Cassette), ampliamente distribuida en organismos procariotas y eucariotas. Estas proteínas transmembrana utilizan la energía derivada de la hidrólisis de ATP para movilizar diversos sustratos a través de las membranas celulares, generalmente en contra de su gradiente de concentración^{7,8}.

Estructuralmente, los transportadores ABC están compuestos por dos dominios transmembrana (TMD), responsables de la especificidad del sustrato y dos dominios citoplasmáticos de unión a nucleótidos (NBD), encargados de la unión e hidrólisis de ATP. Los NBD contienen motivos altamente conservados, incluyendo secuencias Walker A y Walker B, así como el motivo de firma característico de la familia ABC^{7,12}.

La interacción entre estos dominios permite cambios conformacionales que facilitan el transporte del sustrato a través de la membrana¹³. En eucariotas, los transportadores ABC pueden presentarse como proteínas completas que contienen los cuatro dominios en una sola cadena polipeptídica o como medias proteínas transportadoras que requieren asociarse en homodímero o heterodímero para formar una unidad funcional⁸.

Estas proteínas participan en procesos fisiológicos diversos, tales como la absorción de nutrientes en el intestino, la eliminación de toxinas en hígado y riñones y la protección de barreras especializadas como la hematoencefálica^{7,14}.

Las mutaciones en genes que codifican transportadores ABC se asocian con múltiples enfermedades humanas, incluyendo fibrosis quística, trastornos neurológicos, alteraciones en el transporte de colesterol y resistencia a fármacos^{7,12}. Dentro de esta familia, el regulador de conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR, *por sus siglas en inglés*) representa un caso particular, ya que su disfunción afecta directamente el transporte de cloruro y bicarbonato en epitelios, lo que establece el vínculo con la fisiopatología de la fibrosis quística.

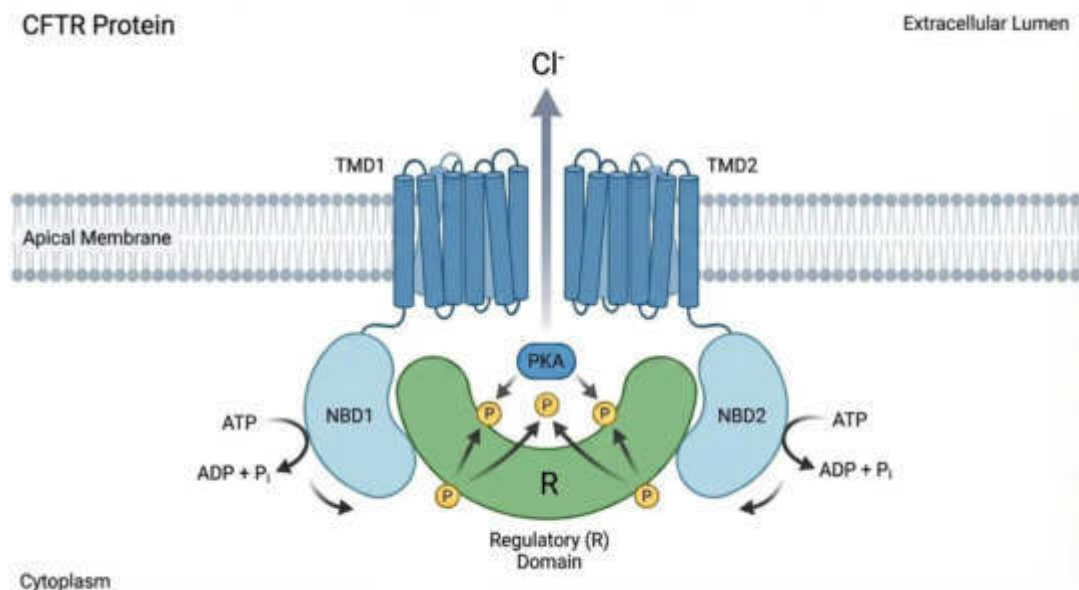


Figura 1. Estructura y mecanismo de activación del canal CFTR en células epiteliales^{12,15}. El regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) es un canal de cloruro localizado en la membrana apical, compuesto por dos dominios transmembrana (TMD1 y TMD2), dos dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2) y un dominio regulador (R). La activación del canal depende de la fosforilación del dominio R por la proteína quinasa A (PKA), así como de la unión e hidrólisis de ATP en los dominios NBD, lo que permite la apertura del canal y el transporte de iones cloruro (Cl^-) hacia el lumen extracelular. Figura elaborada por la autora mediante herramienta digital, con base en la literatura científica.

1.2 Fibrosis Quística

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad genética y crónica con herencia autosómica recesiva, caracterizada por alteraciones en la composición y propiedades de diversas secreciones del organismo, lo que conduce a manifestaciones multisistémicas. Esta patología es causada principalmente por mutaciones en el gen CFTR, localizado en el brazo largo del cromosoma 7, el cual codifica el regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística^{5,16}. La disfunción de esta proteína altera el transporte de iones en la membrana apical de las células epiteliales afectando la secreción de cloruro y bicarbonato, favoreciendo la reabsorción de sodio. Como consecuencia, disminuye el contenido de agua en las secreciones, lo que da lugar a la formación de moco espeso y viscoso que obstruye conductos en distintos órganos^{16,17}.

El gen CFTR se expresa en múltiples tejidos epiteliales, incluyendo pulmón, páncreas, intestino, hígado y sistema reproductor, lo que explica la diversidad de manifestaciones clínicas asociadas a la enfermedad¹⁸.

1.2.1 Gen CFTR y su proteína

Como se ha descrito previamente, el transporte iónico en epitelios depende de la acción coordinada de proteínas transmembrana especializadas, entre las cuales los transportadores ABC desempeñan un papel relevante. Dentro de esta familia, el regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) constituye un caso particular, ya que, a diferencia de otros transportadores ABC funciona como un canal iónico implicado directamente en el transporte de cloruro y bicarbonato en células epiteliales.

El gen CFTR se localiza en la región 7q31.2 y presenta una longitud aproximada de 190 kilo bases (kb), conteniendo 27 exones. Dicho gen codifica una proteína de 170 kDa, compuesta por 1480 aminoácidos, cuya función principal es regular el paso de iones a través de la membrana apical de células epiteliales²⁰.

Estructuralmente, la proteína CFTR está formada por dos dominios transmembrana (TMD), que constituyen el poro del canal, dos dominios de unión a nucleótidos (NBD), responsables de la unión e hidrólisis de ATP, y un dominio regulador (R), cuya fosforilación es necesaria para su activación. Estos elementos estructurales son característicos de los transportadores ABC y permiten que la proteína experimente cambios conformacionales asociados al ciclo de unión e hidrólisis de ATP^{7,12}.

A nivel funcional, CFTR actúa como un canal de cloruro, cuyo estado de apertura depende de la fosforilación del dominio R y de la interacción entre los dominios NBD¹⁵. Este mecanismo permite no solo el flujo de iones cloruro, sino también de bicarbonato, favoreciendo la hidratación de las secreciones y el mantenimiento del equilibrio iónico en los epitelios, lo cual es esencial para la homeostasis celular.

La alteración en la estructura o función de CFTR compromete el transporte iónico, lo que conlleva a la desregulación del movimiento de agua y electrolitos en epitelios. Estas alteraciones constituyen la base molecular de la fibrosis quística y explican las manifestaciones fisiopatológicas de la enfermedad.

1.2.2 Mutaciones en el regulador de transmembrana de la fibrosis quística

Las mutaciones en el gen *CFTR* pueden presentarse de diversas maneras e incluyen sustituciones, deleciones, inserciones y alteraciones en los sitios de empalme. Estas modificaciones afectan tanto a la secuencia codificante como al procesamiento del ARN mensajero (ARNm), lo que puede dar lugar a proteínas defectuosas o a la ausencia de la proteína funcional⁸.

Las deleciones de nucleótidos implican la pérdida de uno o más nucleótidos, lo que puede alterar el marco de lectura del gen. La mutación $\Delta F508$, correspondiente a la deleción del codón que codifica la fenilalanina en la posición 508, es la más frecuente en pacientes con FQ. Esta alteración provoca un plegamiento incorrecto de la proteína, lo que impide su adecuado procesamiento y favorece su degradación antes de alcanzar la membrana celular^{3,7,21}.

Las inserciones de nucleótidos se caracterizan por la adición de bases en la secuencia genética, lo que puede modificar el marco de lectura y generar proteínas no funcionales. Por otro lado, las mutaciones en sitios de empalme afectan el procesamiento del ARNm, impidiendo la correcta eliminación de intrones y la formación de una proteína completa.

Además, existen reordenamientos estructurales que implican deleciones o duplicaciones de regiones más extensas del gen *CFTR*, afectando uno hasta varios exones. Estas alteraciones pueden comprometer de manera significativa la expresión y función de la proteína^{3,7,21}.

En conjunto, estas mutaciones alteran la capacidad de CFTR para regular el transporte de iones en epitelios⁸.

1.2.3 Correlaciones genotipo-fenotipo en la Fibrosis Quística

Como se mencionó previamente, las mutaciones en el gen *CFTR*, no solo afectan la estructura de la proteína, sino que también determinan el grado en que se altera su función, lo que se traduce en una amplia variabilidad en la expresión clínica de FQ. Con el fin de establecer una relación entre el tipo de alteración molecular y sus consecuencias funcionales, estas mutaciones se han clasificado en seis grupos según el efecto que producen sobre la proteína CFTR.

Esta clasificación funcional permite comprender cómo los distintos defectos en la síntesis, procesamiento, tráfico, regulación o estabilidad del canal impactan directamente en el transporte de iones en epitelios. Las mutaciones que impiden la producción de la proteína o su correcta localización en la membrana se asocian con formas más severas de la enfermedad, mientras que aquellas que conservan parcialmente la función del canal tienden a generar fenotipos más leves o variables.

Las mutaciones de clase I se caracterizan por la ausencia total de síntesis de la proteína CFTR, lo que conduce a una pérdida completa de función. En la clase II, la proteína es sintetizada, pero presenta un plegamiento incorrecto que impide su tránsito hacia la membrana, siendo degradada de manera prematura. Ambas clases se asocian con fenotipos severos, frecuentemente acompañados de insuficiencia pancreática y enfermedad pulmonar progresiva.

En las mutaciones de la clase III, la proteína alcanza la membrana, pero presenta defectos en la regulación del canal, lo que impide su adecuada apertura. Por otro lado, las mutaciones de clase IV afectan la conductancia del canal, reduciendo la eficiencia en el paso de iones. En ambos casos, puede existir una función residual de *CFTR*, lo que se

traduce en manifestaciones clínicas de menor gravedad en comparación con las clases anteriores^{18,22}.

Las mutaciones de clase V se asocian con una disminución en la cantidad de proteína funcional producida, mientras que en la clase VI la proteína es inestable en la membrana y se degrada rápidamente²⁴. Estas alteraciones suelen dar lugar a fenotipos variables, en los que la función parcial del canal puede contribuir a una evolución clínica menos agresiva.

En conjunto, esta clasificación permite comprender la heterogeneidad de la fibrosis quística y para orientar estrategias terapéuticas dirigidas, como el uso de moduladores específicos de CFTR²⁴.

Clasificación	Ejemplo	Efecto	Fenotipo
Clase I: proteína no sintetizada	G542X, W1282X. R553X	No se produce la proteína <i>CFTR</i>	FQ severa con insuficiencia pancreática y enfermedad pulmonar grave
Clase II: Error en el procesamiento y tráfico de la proteína	$\Delta F508$ (la más común, presente en $\approx 70\%$ de los pacientes)	La proteína se sintetiza, pero no se pliega correctamente, por lo que es degradada antes de llegar a la membrana	Enfermedad grave con insuficiencia pancreática, infección pulmonar recurrente y reducción en la función pulmonar.
Clase III: Defecto en la actividad del canal	G551D, S549N	La proteína llega a la membrana, pero el canal no se abre correctamente.	FQ moderada a severa, pero puede responder a fármacos moduladores como ivacaftor (potenciador de <i>CFTR</i>)
Clase IV: Disminución en la conductancia del canal	R117H, D1152H	El canal de cloro se abre, pero con menor eficiencia.	Forma más leve de FQ, algunos pacientes retienen función pancreática.
Clase V: Reducción en la cantidad de proteína funcional	3849+10kbC $\rightarrow$ T, A455E	Menor producción de <i>CFTR</i> funcional.	Síntomas leves o variables, pueden no requerir terapia intensiva.
Clase VI: Inestabilidad de la proteína en la membrana	Q1412X	La proteína <i>CFTR</i> llega a la membrana, pero se degrada rápidamente	Menos grave, pero con función pulmonar comprometida

Tabla 1. Clasificación de las mutaciones del gen *CFTR* según su efecto funcional.

1.2.4 Consecuencias celulares de la disfunción de CFTR

La pérdida de la función de *CFTR* disminuye la secreción de cloruro hacia la superficie epitelial y, en consecuencia, favorece el aumento en la reabsorción de sodio a través de otros canales. Este desequilibrio iónico genera un gradiente osmótico que promueve la salida de agua lo que conduce a la deshidratación de las secreciones^{18,22}.

Por lo tanto, el moco producido por las glándulas exocrinas adquiere una consistencia más densa y viscosa, lo que dificulta su movilización y obstruye los conductos y túbulos. Este fenómeno no solo compromete la función mecánica de limpieza en distintos epitelios, sino que también crea un microambiente propicio para la acumulación de detritos celulares y la colonización bacteriana²³. En las glándulas sudoríparas, el efecto de la disfunción de *CFTR* presenta una particularidad funcional. En condiciones normales, este canal participa en la reabsorción de cloruro y sodio a partir del sudor primario. Sin embargo, su alteración impide este proceso, lo que da lugar a concentraciones elevadas de sal en el sudor²¹. Este hallazgo constituye la base diagnóstica de la prueba del sudor y explica manifestaciones clínicas como la pérdida excesiva de electrolitos en condiciones de estrés térmico²⁴.

Adicionalmente, la alteración del microambiente epitelial inducida por la deshidratación del moco favorece la activación de respuestas inflamatorias. En el epitelio respiratorio, la acumulación de secreciones viscosas promueve la infiltración de células inflamatorias, particularmente neutrófilos, y la liberación de mediadores como IL-8, lo que perpetúa un estado de inflamación crónica²⁵. Este proceso contribuye al daño progresivo del tejido y a la disfunción orgánica.

En conjunto, estas alteraciones reflejan cómo un defecto molecular específico se traduce en cambios celulares y tisulares que afectan de manera directa la función de múltiples órganos. La pérdida de actividad de CFTR como canal de cloruro constituye, por tanto, el evento central que conecta las mutaciones descritas previamente con las manifestaciones fisiológicas y clínicas de la enfermedad^{16,26}.

1.2.5 Fisiopatología de la Fibrosis Quística

Las alteraciones celulares derivadas de la disfunción de CFTR descritas previamente se traducen en un compromiso progresivo de la función de múltiples órganos. Aunque el defecto molecular es común, sus consecuencias fisiopatológicas varían según el tejido afectado y dependen en gran medida del papel que desempeña el transporte iónico en cada epitelio.

En el sistema respiratorio, la deshidratación de la capa líquida superficial favorece la acumulación de secreciones viscosas en las vías aéreas. Este entorno limita la eliminación de partículas y microorganismos, lo que facilita la colonización bacteriana temprana por patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa*^{23,27}. Tal como mencionamos en la sección anterior, se establece una respuesta inflamatoria persistente caracterizada por la infiltración de neutrófilos y la liberación de mediadores proinflamatorios, lo que puede explicar el daño progresivo del epitelio y la aparición de bronquiectasias. Este proceso conduce a un deterioro gradual de la función pulmonar y constituye la principal causa de morbilidad en la enfermedad²⁴.

En el páncreas, la obstrucción de los conductos por secreciones espesas impide la liberación de enzimas digestivas hacia el intestino delgado. Esta alteración da lugar a insuficiencia pancreática exocrina en la mayoría de los pacientes, con consecuencias

directas sobre la digestión y absorción de nutrientes ²¹. La malabsorción resultante afecta principalmente a lípidos y proteínas, lo que desencadena alteraciones en el metabolismo energético sistémico que se manifiestan como esteatorrea, pérdida de peso, deficiencias de vitaminas liposolubles y desnutrición progresiva. En etapas avanzadas, el daño estructural puede extenderse al componente endocrino, favoreciendo el desarrollo de diabetes relacionada con fibrosis quística ^{6,21}.

A nivel intestinal, la reducción en la hidratación del contenido luminal y la deficiencia enzimática contribuyen a la formación de material denso y adherente. En el periodo neonatal, esto puede manifestarse como íleo meconial, mientras que en etapas posteriores se asocia con el síndrome de obstrucción intestinal distal ^{21,25}. Estas alteraciones pueden acompañarse de otras manifestaciones gastrointestinales como reflujo gastroesofágico o prolapso rectal ^{3,28,29}.

En el hígado, la alteración del transporte de bicarbonato y cloruro modifica la composición de la bilis, por lo que tiende a ser más espesa. Este cambio promueve la estasis biliar y desencadena procesos inflamatorios que pueden evolucionar hacia fibrosis peri-portal y cirrosis en un subconjunto de pacientes ³⁰.

Las glándulas exocrinas del páncreas habitualmente secretan enzimas digestivas y bicarbonato hacia el duodeno. En la FQ, la obstrucción de los conductos pancreáticos por tapones de moco espeso impide esta secreción, lo que produce insuficiencia pancreática exocrina en más del 85% de los pacientes, especialmente en aquellos con mutaciones severas del CFTR ^{21,31}. La consecuencia es una digestión incompleta, principalmente de grasas y proteínas, con malabsorción intestinal. Además, la secreción reducida del bicarbonato impide neutralizar la acidez del quimo gástrico, lo que inactiva las enzimas

que logran llegar al intestino. Esto se traduce en esteatorrea, pérdida de peso, déficit de vitaminas liposolubles (A, D, E y K) y, en los niños, la dificultad para ganar peso y crecer de forma adecuada durante la infancia^{21,25}.

En algunos pacientes con función pancreática parcialmente conservada, puede haber inflamación crónica debido a la activación inadecuada de enzimas retenidas, con riesgo de pancreatitis²¹. En etapas más avanzadas, el daño estructural se extiende a las células endocrinas de los islotes de Langerhans, lo que puede llevar al desarrollo de diabetes relacionada con fibrosis quística (CFRD), especialmente en adolescentes y adultos jóvenes^{6,21}.

El intestino también se ve afectado por la disminución en la hidratación de las secreciones y el déficit de enzimas digestivas²¹. En los recién nacidos, se puede presentar íleo meconial, una obstrucción intestinal causada por la acumulación de meconio espeso, que afecta aproximadamente al 15-20% de los lactantes con FQ²⁵. En etapas posteriores de la vida, es frecuente el síndrome de obstrucción intestinal distal (DIOS). Además, son comunes el reflujo gastroesofágico y el prolapso rectal en niños pequeños^{5,21}.

A nivel hepático, la disfunción de CFTR en los colangiocitos altera la secreción de Cl^- y HCO_3^- , generando una bilis más densa y deshidratada.³² Esta estasis biliar favorece la inflamación de los conductos y fibrosis periportal, progresando en un 5-10% de los pacientes hacia hepatopatía significativa, cirrosis biliar focal, hipertensión portal e insuficiencia hepática.

El sistema reproductor también se ve afectado como consecuencia de alteraciones en el desarrollo y mantenimiento de estructuras ductales¹¹. En los hombres, la ausencia

congénita de los conductos deferentes conduce a infertilidad obstructiva, mientras que en las mujeres la fertilidad puede verse comprometida por cambios en la viscosidad del moco cervical y por el impacto sistémico de la enfermedad ^{11,32}.

Finalmente, el estado nutricional constituye un factor determinante en la evolución clínica de la fibrosis quística. La malabsorción crónica y el aumento en el gasto energético contribuyen al deterioro del estado general del paciente, lo que impacta negativamente en la respuesta inmunológica y en la función pulmonar. En este contexto, el soporte nutricional adecuado no solo mejora la calidad de vida, sino que también influye en el pronóstico y en la respuesta a intervenciones terapéuticas³¹.

1.2.6 Diagnóstico de Fibrosis Quística

El diagnóstico de fibrosis quística (FQ) se basa en la confirmación de la disfunción de la proteína CFTR, a través de la integración de manifestaciones clínicas, antecedentes familiares y pruebas bioquímicas y genéticas. Dado que las alteraciones en el transporte iónico afectan múltiples órganos, la presentación clínica es heterogénea y puede variar según la edad y la severidad del defecto molecular.

Entre las manifestaciones clínicas más frecuentes se incluyen infecciones respiratorias recurrentes, tos crónica, malabsorción intestinal, esteatorrea, desnutrición y retraso en el crecimiento. En etapas tempranas pueden observarse alteraciones reproductivas como azoospermia obstructiva o complicaciones hepáticas. La diversidad de estas manifestaciones puede dificultar el diagnóstico en casos atípicos^{1,5,6}.

La FQ presenta una incidencia variable entre poblaciones. En México, se estima una frecuencia aproximada de 1 por cada 8,500 a 10,000 recién nacidos vivos, lo que refleja

una menor prevalencia en comparación con poblaciones europeas, pero con importantes retos en el diagnóstico oportuno y el acceso a tratamiento especializado^{9,16,33}.

En México, el diagnóstico temprano se inicia mediante el tamiz neonatal, basado en la cuantificación de tripsina inmunorreactiva en sangre de talón. Este marcador suele encontrarse elevado como consecuencia del daño pancreático temprano. Ante un resultado positivo, es necesario realizar pruebas confirmatorias dirigidas para evaluar la función de CFTR^{5,10}. La prueba del sudor es estándar para el diagnóstico, ya que evalúa directamente la alteración en el transporte de cloruro en glándulas sudoríparas. Esta prueba se basa en la incapacidad de reabsorber cloruro, lo que resulta en concentraciones elevadas en el sudor³¹. Valores iguales o superiores a 60 mmol/L son indicadores de FQ, mientras que valores intermedios requieren estudios adicionales³⁴.

En casos en los que el diagnóstico no es concluyente, pueden emplearse pruebas funcionales complementarias como el potencial nasal transepitelial (PNT) y la medición de corriente intestinal rectal, las cuales permiten evaluar de manera más directa la actividad del canal CFTR a nivel epitelial^{32,35}.

Las pruebas genéticas representan una herramienta esencial para la identificación de mutaciones específicas en el gen CFTR. Estas incluyen técnicas como PCR dirigida, secuenciación completa y MLPA, lo que permite no solo confirmar el diagnóstico, sino también establecer correlaciones genotipo-fenotipo relevantes para el pronóstico y tratamiento³¹.

1.2.7 Tratamiento de la Fibrosis Quística

El abordaje terapéutico de FQ se basa en la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos asociados a la disfunción de CFTR. Debido a la naturaleza multisistémica de la enfermedad, el tratamiento requiere un enfoque integral que incluya intervenciones dirigidas tanto al defecto molecular como a sus consecuencias a nivel orgánico ³⁵.

Los moduladores de CFTR representan una de las estrategias más relevantes, ya que actúan directamente sobre la proteína defectuosa, mejorando su función dependiendo del tipo de mutación. Fármacos como Ivacaftor, Lumacaftor, Tezacaftor y Elexacaftor han demostrado restaurar parcialmente el transporte iónico en epitelios, lo que se traduce en mejoras en la función pulmonar y el estado nutricional ²⁴. Sin embargo, su acceso en el sistema de salud mexicano continúa siendo limitado debido a su alto costo ^{31,32,35}.

El manejo de las complicaciones respiratorias incluye el uso de antibióticos dirigidos a controlar infecciones crónicas, especialmente por *Pseudomonas aeruginosa*, así como terapias mucolíticas que facilitan la eliminación de secreciones.

Agentes como la dornasa alfa y soluciones salinas hipertónicas contribuyen a reducir la viscosidad del moco y mejorar la función pulmonar ³⁵.

Desde el punto de vista digestivo, la insuficiencia pancreática exocrina constituye una de las principales complicaciones, lo que requiere la administración de enzimas pancreáticas para compensar la deficiencia en la digestión de nutrientes ^{21,27}. Esta intervención es fundamental para mejorar la absorción de grasas y proteínas, así como para prevenir el deterioro del estado nutricional ³⁴.

El soporte nutricional adecuado representa un componente clave del tratamiento para pacientes con malabsorción severa ³⁵.

El manejo de comorbilidades incluye el uso de broncodilatadores, antiinflamatorios y el tratamiento de alteraciones metabólicas como la diabetes relacionada con fibrosis quística^{21,27}. Estas intervenciones contribuyen a estabilizar la progresión de la enfermedad y mejorar la calidad de vida del paciente ^{31,36}.

En conjunto, las estrategias terapéuticas actuales buscan controlar los síntomas e intervenir en los mecanismos subyacentes de la enfermedad. No obstante, las limitaciones en el acceso a terapias específicas representan un desafío importante para el manejo integral de FQ^{24,32,35}.

Tratamiento	Ventajas	Desventajas
Moduladores de CFTR	Corrigen el defecto de base, mejoran función pulmonar y estado nutricional	Alto costo, disponibilidad limitada en México
Antibióticos inhalados/sistémicos	Reducen exacerbaciones respiratorias	Acceso desigual, riesgo de resistencias, requerimiento seguimiento farmacoterapéutico
Mucolíticos e hidratantes	Mejoran el aclaramiento mucociliar, accesibles como solución hipertónica	Alto costo, disponibilidad, adherencia
Enzimas pancreáticas y nutrición	Corrigen la malabsorción, mejoran crecimiento y estado general	Costos variables, necesidad de monitoreo nutricional constante, falta de acceso en sector público
Terapias de soporte y comorbilidades	Abordan complicaciones comunes, estabilizan al paciente	Requieren seguimiento multidisciplinario, acceso desigual

Tabla 2. Estrategias terapéuticas utilizadas en el manejo de la fibrosis quística y sus principales ventajas y desventajas^{27,31,35}.

1.3 *Lactococcus lactis* como medio de entrega

1.3.1 Generalidades de *L. lactis*

Como se describió en el capítulo anterior, la FQ compromete de manera importante la función pancreática exocrina, lo que reduce la disponibilidad de enzimas digestivas en la luz intestinal y contribuye a la malabsorción y al deterioro nutricional. En este contexto, la producción recombinante de proteínas de interés digestivo representa una estrategia biotecnológica relevante. Para ello, es necesario contar con un hospedador que combine la seguridad biológica, facilidad de manipulación genética y capacidad de secreción proteica eficiente. Dentro de estas características, *Lactococcus lactis* se ha consolidado como una plataforma atractiva para la expresión de proteínas heterólogas con potencial biomédico³⁷.

El genoma de *Lactococcus lactis* presenta un tamaño aproximado de 2.3 Mbp, con una organización relativamente simple que facilita su manipulación genética y la introducción de elementos exógenos. Se han descrito principalmente dos subespecies: *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*, siendo esta última una de las más empleadas en aplicaciones biotecnológicas debido a su estabilidad y comportamiento en sistemas de expresión recombinante^{37,38}.

Lactococcus lactis es una bacteria Gram positiva, catalasa negativa, no esporulada y no móvil, ampliamente utilizada en la industria alimentaria y reconocida por su perfil de inocuidad. Su condición de organismo food-grade y Generally Recognized As Safe (GRAS, *por siglas en inglés*), junto con la ausencia de endotoxinas, la convierte en una

alternativa ventajosa frente a sistemas clásicos como *Escherichia coli* cuando se busca producir proteína con posible aplicación terapéutica.

Además, su fisiología relativamente simple y la disponibilidad de herramientas moleculares han favorecido su uso como hospedero para la expresión recombinante, la secreción de proteínas y, en algunos contextos, como vehículo de entrega mucosal.

Otra ventaja importante de *L. lactis* es que permite recuperar proteínas directamente en el medio extracelular, lo que simplifica el procesamiento posterior y disminuye la necesidad de procedimientos agresivos de ruptura celular ^{39,40}. Esto resulta particularmente útil cuando se trabaja con proteínas cuya conformación y estabilidad son críticas para su funcionalidad. En comparación con otros sistemas bacterianos, *L. lactis* puede ofrecer una mejor calidad conformacional y una menor complejidad asociada a contaminantes propios de bacterias Gram negativas ⁴¹.

En el caso específico de este trabajo, el interés *L. lactis* no radica únicamente en su valor como hospedero seguro, sino en su potencial como sistema de expresión y secreción de una proteína digestiva humana como CTRB1.

Dado que el objetivo no solo es producir la proteína, sino recuperarla en una forma compatible con su evaluación funcional, resulta especialmente relevante aprovechar una plataforma capaz de dirigir la secreción hacia el medio extracelular y reducir la acumulación intracelular de proteína recombinante. Esta lógica hace de *L. lactis* una elección coherente con el problema fisiopatológico planteado previamente, particularmente con la insuficiencia pancreática exocrina asociada a fibrosis quística.

Aunque *L. lactis* ofrece ventajas claras, también presenta limitaciones que deben considerarse. Los niveles de expresión pueden ser menores que los alcanzados en sistemas más robustos como *E. coli*, y la secreción de proteínas heterólogas puede verse restringida por factores como el plegamiento prematuro, la saturación del sistema de exportación o la acción de proteasas ⁴². Aun así, su perfil de seguridad, su capacidad de secreción y su versatilidad genética mantienen a esta bacteria como un hospedero particularmente valioso para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas.

1.3.2 Mecanismo de secreción de proteínas en *L. lactis*

En bacterias Gram positivas como *Lactococcus lactis*, la exportación de proteínas hacia el medio extracelular ocurre principalmente por el sistema de secreción Sec, favorecido por la ausencia de membrana externa y una envoltura celular estructuralmente más simple. Este sistema permite el transporte de proteínas desde el citoplasma hacia el exterior celular de manera altamente regulada⁴³.

El sistema Sec está constituido por una maquinaria translocadora compleja que incluye la ATPasa SecA, responsable de impulsar el transporte mediante la hidrólisis de ATP, y el translocón SecYEG, un canal proteico integrado en la membrana citoplasmática que permite el paso de las proteínas a través de la bicapa lipídica. Adicionalmente, cofactores como SecDF-YajC contribuyen a estabilizar el complejo y facilitan el proceso de translocación^{44,45}. Una vez que la proteína ha atravesado la membrana, la peptidasa de señal tipo I (LepB) escinde el péptido señal, liberando la proteína en su forma madura hacia el espacio extracelular^{43–45}.

Las proteínas destinadas a este sistema se sintetizan como preproteínas que contienen un péptido señal en el extremo N-terminal. Este péptido presenta una organización estructural característica, compuesta por una región N con una carga positiva, una región hidrofóbica central (región H) y una región C que incluye el sitio de clivaje, frecuentemente asociado a la secuencia consenso Ala-X-Ala⁴⁴. Esta arquitectura permite el reconocimiento por la maquinaria Sec y dirige la proteína hacia la membrana para su exportación.

En *L. lactis*, el péptido señal más utilizado es el derivado de la proteína Usp45, ampliamente validado por su eficiencia en la secreción de proteína heterólogas. Sin embargo, la selección del péptido señal puede modificarse dependiendo de la proteínas de interés y de las condiciones experimentales. En este trabajo, se emplea la secuencia de Exp4, la cual dirige la secreción de la proteína recombinante a través del sistema Sec, favoreciendo su liberación al medio extracelular.

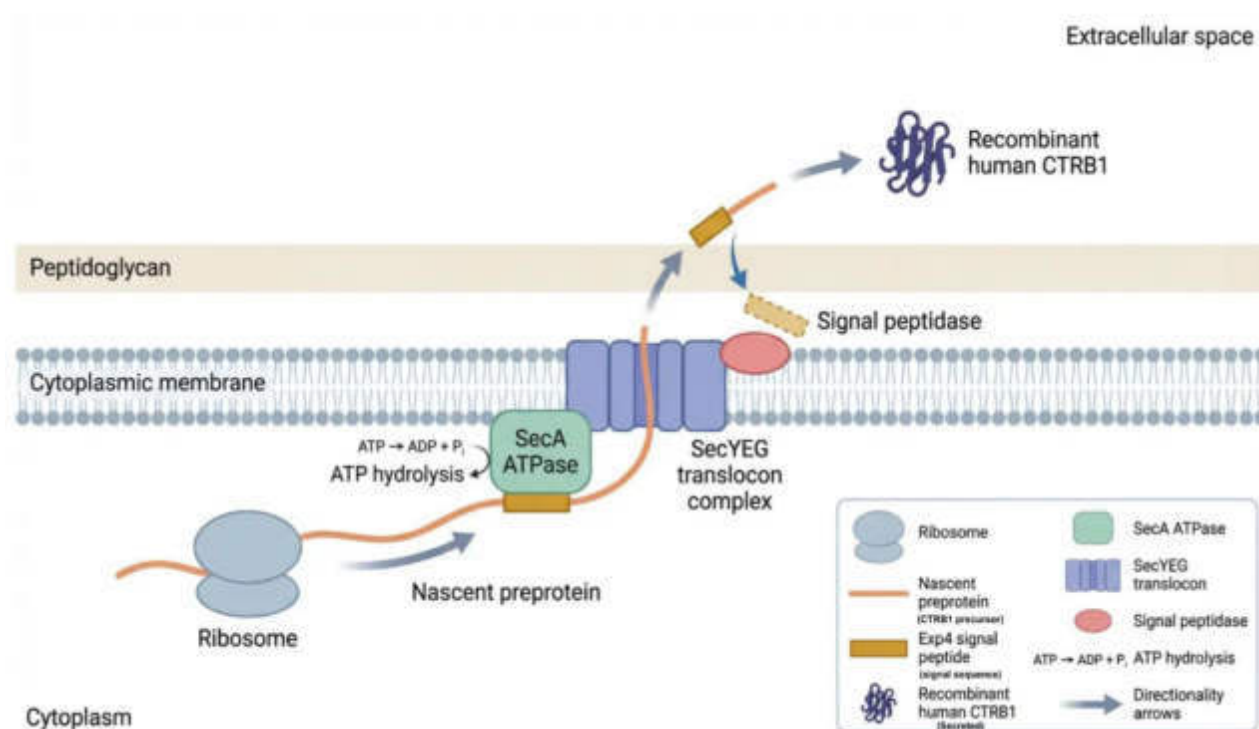


Figura 2. Secreción mediante el sistema Sec en *Lactococcus lactis*. La proteína recombinante es sintetizada como una preproteína que contiene el péptido señal Exp4, el cual dirige su translocación a través del complejo SecYEG mediante la acción de la ATPasa SecA. Durante este proceso, la proteína es transportada en estado parcialmente desplegado y, tras atravesar la membrana citoplasmática, la peptidasa de señal escinde el péptido señal, liberando la proteína recombinante al espacio extracelular. Figura elaborada por la autora mediante herramienta de generación gráfica (FigureLabs), con base en la literatura del sistema Sec.

Durante el proceso de translocación, las proteínas son mantenidas en un estado parcialmente desplegado, lo cual es esencial para su paso a través del canal SecYEG. Este proceso puede ser asistido por chaperonas citoplasmáticas que evitan el plegamiento prematuro y facilitan su transporte eficiente⁴³. Posteriormente, una vez en el exterior celular, la proteína puede adquirir su conformación nativa y en condiciones adecuadas mantener su actividad biológica.

En contraste, si el proceso de secreción es ineficiente o la proteína no logra plegarse correctamente, puede ser degradada por proteasas intracelulares o por sistemas asociados a la membrana, como la proteasa HtrA⁴⁴. Este mecanismo actúa como un sistema de control de calidad que previene la acumulación de proteínas mal plegadas y reduce el estrés celular.

En conjunto, el sistema Sec en *L. lactis* constituye una herramienta clave en biotecnología, ya que permite no solo la expresión, sino también la secreción de proteínas recombinantes directamente al medio extracelular.

1.4 Plásmido pLB333

El plásmido pLB333 es un vector de expresión diseñado para su uso en *L. lactis*, ampliamente empleado en estudios de producción y secreción de proteínas recombinantes con aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. Su diseño permite la expresión eficiente de genes heterólogos, y su direccionamiento hacia el medio extracelular, lo cual resulta especialmente relevante en sistemas donde se busca recuperar la proteína en forma soluble.

Este plásmido presenta un tamaño aproximado de 3628 pares de bases y una organización genética orientada a facilitar la inserción, expresión y secreción de genes de interés (Figura 3). Su arquitectura integra diversos elementos funcionales que actúan de manera coordinada para asegurar un sistema de expresión eficiente y estable.

El casete de expresión se encuentra bajo el control del promotor inducible pGroESL, derivado del operón groESL de *L. lactis*⁴⁶. Este promotor responde a condiciones de estrés fisiológico, como elevación de temperatura, cambios de pH o presencia de compuestos específicos, lo que permite modular la expresión del gen de interés de manera controlada. Bajo condiciones basales, la actividad del promotor es baja, incrementándose cuando la célula experimenta estrés, lo cual contribuye a reducir la carga metabólica y favorece la viabilidad celular durante la producción de proteínas recombinantes.

Aguas abajo del promotor se localiza la secuencia señal de secreción, que en este sistema corresponde a Exp4. Esta secuencia dirige la proteína recombinante hacia la vía de secreción dependiente del sistema Sec, permitiendo su translocación a través de la membrana citoplasmática⁴⁶. Al igual que otros péptidos señal, Exp4 presenta una organización estructural característica compuesta por una región N-terminal con carga

positiva, una región hidrofóbica central y un sitio de clivaje reconocido por la peptidasa de señal tipo I. La eficiencia de secreción depende de la adecuada interacción entre esta señal y la maquinaria Sec, lo cual resulta determinante para evitar la acumulación intracelular de la proteína y favorecer su liberación al medio extracelular.

El vector pLB333 fue originalmente construido con el gen *nuc*, que codifica una nucleasa termoestable de *Staphylococcus aureus*, utilizado como gen reportero. Este gen puede ser reemplazado por el gen de interés mediante el uso de sitios de restricción estratégicamente ubicados, lo que permite mantener el marco de lectura con la señal de secreción y asegurar la correcta expresión de la proteína recombinante.

Después del casete de expresión, el plásmido contiene una secuencia terminadora que garantiza el adecuado final de la transcripción, evitando la lectura hacia otras regiones del vector y contribuyendo a la estabilidad del ARN mensajero. Asimismo, incluye los genes *repA* y *repC*, responsables de la replicación del plásmido en *L. lactis* mediante un mecanismo de círculo rodante, característico de plásmidos en bacterias Gram positivas ⁴⁷.

Para la selección de clones transformados, el vector contiene un gen de resistencia a cloranfenicol (cm), el cual permite el crecimiento selectivo en medios suplementados con este antibiótico, facilitando la identificación y mantenimiento de las bacterias portadoras del plásmido.

Adicionalmente, el plásmido presenta múltiples sitios de restricción que facilitan su manipulación molecular. Entre las enzimas más relevantes se encuentran EcoRI, BglII, NsiI, HindIII, XhoI, BstAPI y BamHI, entre otras, las cuales permiten realizar cortes específicos en el ADN para estrategias de clonación, validación de construcciones y

análisis de mapas de restricción. En particular, la combinación de EcoRI y NsiI resulta útil para la clonación direccional del inserto, ya que genera extremos cohesivos compatibles que permiten su incorporación en una orientación específica dentro del vector, manteniendo el marco de lectura adecuado con la señal de secreción y asegurando la correcta expresión de la proteína recombinante.

En conjunto, las características estructurales y funcionales del plásmido pLB333 lo convierten en una herramienta robusta para la expresión y secreción de proteínas recombinantes en *Lactococcus lactis*, permitiendo integrar de manera eficiente los elementos de control transcripcional y direccionamiento extracelular descritos previamente, y constituyendo la base del sistema experimental empleado en este trabajo.

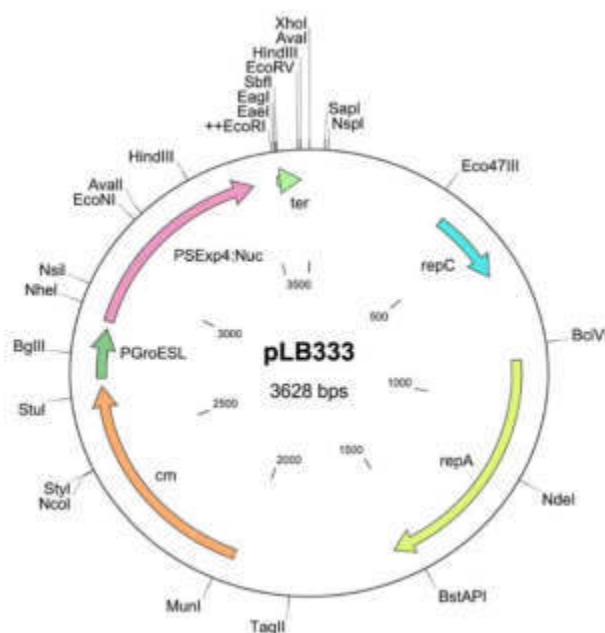


Figura 3. Mapa esquemático del plásmido pLB333. Representación circular del plásmido pLB333. El casete de expresión está bajo el control del promotor inducible pGroESL, seguido de la señal de secreción Exp4, que dirige la proteína al sistema de exportación tipo Sec.

1.5 Antecedentes

1.5.1 Malnutrición en fibrosis quística: prevalencia, mortalidad y trasplante en México

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética autosómica recesiva que cursa con daño multisistémico, destacando la afectación pulmonar crónica y la insuficiencia pancreática exocrina. En Latinoamérica se estima una prevalencia entre 1:1600 y 1:14,000 nacidos vivos; en México se calcula alrededor de 1 en 5,000–8,500 nacidos vivos^{16,33}, lo que equivale aproximadamente a ~350 nuevos casos por año⁹. Pese a ser una enfermedad rara, en México existe un número considerable de pacientes con FQ, y su supervivencia ha mejorado en las últimas décadas. No obstante, la supervivencia mediana de los pacientes mexicanos con FQ (~21.3 años) sigue siendo muy inferior a la reportada en países desarrollados. Un estudio de cohorte nacional (2000–2020) reportó dicha mediana de 21.37 años, identificando como factores de riesgo independientes para mortalidad el bajo nivel socioeconómico, la infección crónica por *Pseudomonas* a los 6 años y de manera destacada, la insuficiencia pancreática.

La malnutrición es una característica frecuentemente en pacientes con FQ y presenta una fuerte asociación con la evolución clínica. Aproximadamente 85–90% de los pacientes desarrollan insuficiencia pancreática exocrina (IPE) debido a mutaciones graves en CFTR, lo que ocasiona mala absorción de grasas y proteínas. Desde la primera infancia se observan síntomas gastrointestinales como íleo meconial, esteatorrea y falla de medro, que derivan en desnutrición, retraso del crecimiento y deficiencias vitamínicas si no se implementa un tratamiento adecuado.

El estado nutricional deficiente se relaciona directamente con una peor función pulmonar, mayor colonización bacteriana y disminución en la calidad de vida. Por ello, el manejo nutricional intensivo y la terapia de reemplazo enzimático pancreático constituyen pilares fundamentales en el tratamiento de la FQ. Sin embargo, en México, la alta carga de malnutrición e insuficiencia pancreática continúa representando un reto importante debido al acceso limitado a diagnóstico temprano, tratamiento especializado y trasplante pulmonar en etapas avanzadas.

La supervivencia en países desarrollados ha mejorado significativamente gracias al diagnóstico precoz, la atención multidisciplinaria y el acceso a terapias avanzadas, incluyendo trasplante pulmonar⁴⁸.

En contraste, pacientes con FQ y bajo índice de masa corporal ($\text{IMC} \leq 17 \text{ kg/m}^2$) presentan menor probabilidad de ser candidatos a trasplante y mayor riesgo de mortalidad⁹.

Actualmente, el tratamiento de la insuficiencia pancreática se basa en la administración de enzimas digestivas en forma de cápsulas con cubierta entérica diseñadas para su liberación en condiciones alcalinas^{22,50}. No obstante, estas terapias presentan limitaciones, incluyendo su alto costo y la asociación con efectos adversos como la colonopatía fibrosante, particularmente tras su uso prolongado. Se ha sugerido que ciertos componentes de estas formulaciones, como el ácido metacrílico y el etil acrilato, podrían estar implicados en estas complicaciones⁵¹.

En este contexto, resulta necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que permitan optimizar el tratamiento de la insuficiencia pancreática. El uso de herramientas

biotecnológicas para la producción de enzimas digestivas representa una alternativa prometedora para mejorar la absorción de nutrientes y contribuir a una mejor calidad de vida en pacientes con fibrosis quística.

1.5.2 *Lactococcus lactis* como vehículo para la administración de fármacos

Escherichia coli ha sido tradicionalmente el sistema más utilizado para la expresión de proteínas recombinantes, empleándose en la producción de aproximadamente el 30% de las proteínas terapéuticas aprobadas⁵². Esto se debe a su rápido crecimiento, alto rendimiento y facilidad de manipulación genética.

Sin embargo, la ausencia de modificaciones postraduccionales, como glicosilación o procesamiento proteolítico, así como la frecuente formación de cuerpos de inclusión, limitan su uso en la producción de biofármacos funcionales^{52,53}.

En contraste, *Lactococcus lactis* ha emergido como una alternativa eficiente para la expresión de proteínas recombinantes solubles, ya que presenta menor tendencia a la formación de agregados proteicos. Se ha propuesto que, en este organismo, los mecanismos celulares favorecen la degradación de proteínas mal plegadas en lugar de su acumulación, lo que contribuye a una mayor proporción de proteína funcional^{40,54,55}.

Además, *L. lactis* presenta ventajas adicionales, como su bajo costo de cultivo, la disponibilidad de herramientas genéticas bien desarrolladas y su estatus GRAS, lo que la convierte en un sistema seguro para aplicaciones biomédicas⁵⁶.

Su maquinaria de secreción relativamente simple y la presencia de una proteasa extracelular principal (HtrA) permiten minimizar la degradación de proteínas heterólogas, favoreciendo su recuperación en el medio extracelular⁵⁴.

Diversos estudios han demostrado el potencial de *L. lactis* como sistema de producción y entrega de proteínas terapéuticas. En particular, Bermúdez-Humarán et al. (2015) evaluaron cepas recombinantes capaces de secretar moléculas antiinflamatorias, observando una reducción significativa en modelos de colitis experimental. Estos resultados evidencian que *L. lactis* no solo permite la expresión de proteínas heterólogas, sino también su secreción funcional y su actividad biológica *in vivo*⁵⁷.

Además, *L. lactis* ha sido utilizado como vector de vacunas mucosales, coexpresando antígenos y adyuvantes inmunológicos. Por ejemplo, Chatel, Bermúdez-Humarán et al. construyeron una cepa de *L. lactis* capaz de secretar la citocina interleucina-12 (IL-12) bioactiva, para usarla como adyuvante en una inmunización intranasal. IL-12 es una citocina heterodimérica potente que induce respuestas Th1, pero su administración sistémica conlleva toxicidad; por ello se buscó producirla localmente con *L. lactis*. Los investigadores expresaron IL-12 murina en *L. lactis* como dos cadenas separadas (p35 y p40) o como una sola cadena fusionada (scIL-12), bajo un promotor inducible. Comprobaron que la IL-12 secretada por *L. lactis* era funcional, induciendo la producción de IFN- γ en esplenocitos de ratón *in vitro*. Este estudio demuestra la versatilidad de *L. lactis*: puede simultáneamente portar un antígeno (superficialmente) y una citocina moduladora (secretada), logrando inducir inmunidad protectora en mucosas. Así también, han explorado el uso de *L. lactis* para producir distintas moléculas terapéuticas, desde enzimas antioxidantes hasta antígenos para enfermedades infecciosas⁵⁷. Por ejemplo, se han expresado *in situ* en *L. lactis* citocinas antiinflamatorias (IL-27, IL-35) para modular enfermedades inflamatorias, así como autoantígenos tolerogénicos para diabetes tipo 1 y otros desórdenes autoinmunes⁵⁷.

Estas características, sumadas a su estatus GRAS, bajo costo de cultivo y facilidad de manipulación genética, posicionan a *L. lactis* como una plataforma atractiva para aplicaciones biomédicas.

1.5.3 Quimiotripsinógeno B1 recombinante en *L. lactis* como auxiliar en tratamiento para deficiencias nutricionales en FQ.

Las proteasas pancreáticas han sido ampliamente estudiadas debido a su papel esencial en la digestión de proteínas. Tradicionalmente, la quimiotripsina de origen bovino ha sido utilizada como modelo en estudios bioquímicos y estructurales, debido a su disponibilidad y estabilidad. Sin embargo, estas aproximaciones no reflejan completamente la complejidad funcional de las enzimas humanas.

En el caso de las isoformas humanas, se han estudiado diferentes miembros de la familia de quimiotripsinas, como el quimiotripsinógeno C (CTRC), el cual participa principalmente en la regulación de la activación de otras proteasas pancreáticas. Aunque estos estudios han contribuido al entendimiento del procesamiento y activación de estas enzimas, CTRC no representa la principal actividad digestiva¹².

El quimiotripsinógeno B1 (CTRB1), por otro lado, corresponde a una de las principales proteasas implicadas en la digestión de proteínas en humanos. El CTRB1 codifica un miembro de la familia de enzimas serina proteasa y forma un precursor principal de las enzimas proteolíticas pancreáticas, con una secuencia de 263 aminoácidos y peso de 27.7 kDa. La proteína codificada se sintetiza en las células acinares del páncreas y se secreta en el intestino delgado, donde se somete a una activación proteolítica para generar una

enzima funcional con función catalítica desdoblando los enlaces peptídicos en el lado carboxilo de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina).

En el contexto de la fibrosis quística, la insuficiencia pancreática exocrina conlleva una reducción significativa en la secreción de enzimas digestivas, incluyendo proteasas como la quimiotripsina, lo que resulta en maldigestión de proteínas, malabsorción y desnutrición progresiva.

Estas observaciones sugieren que: 1) la expresión del quimiotripsinógeno C recombinante bovino abre el camino a nuevos estudios estructura-función en humanos y 2) la evidencia disponible indica que *Lactococcus lactis* es capaz de expresar proteínas recombinantes de manera eficiente, sin formación significativa de cuerpos de inclusión. En este sentido Singh, S. K. et al en 2020 demostraron la expresión exitosa de la proteína circunsporozoíto de *Plasmodium falciparum* (PfCSP), obteniendo una proteína soluble secretada con adecuada formación de enlaces disulfuro. Esta proteína, con una longitud de 412 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 40.2 KDa, confirma la capacidad de este sistema para producir proteínas de tamaño intermedio (9 a 90 kDa) con estructura funcional^{54,58}.

En conjunto, estos antecedentes sustentan el potencial de *Lactococcus lactis* como plataforma para la producción de proteasas pancreáticas recombinantes, posicionando a CTRB1 como una proteína candidata relevante para el desarrollo de estrategias biotecnológicas orientadas al tratamiento de la insuficiencia pancreática asociada a fibrosis quística.

1.6 Justificación

La expresión de proteínas humanas en sistemas bacterianos continúa siendo un área de gran interés en biotecnología. Sin embargo, los sistemas más utilizados, como *Escherichia coli*, presentan diversas limitaciones cuando se busca obtener proteínas funcionales, especialmente aquellas que requieren un plegamiento adecuado o procesos de secreción eficientes.

En este contexto, *Lactococcus lactis* se ha propuesto como una alternativa interesante, ya que es organismo considerando seguro (GRAS), con la capacidad de secretar proteínas mediante el sistema Sec. Esta característica permite obtener la proteína directamente en el medio extracelular, lo que facilita su recuperación y reduce problemas como la acumulación intracelular o la formación de agregados.

Por otro lado, el uso del vector pLB333 en este sistema permite contar con elementos que favorecen tanto la expresión como la secreción de la proteína recombinante. El promotor pGroESL permite controlar la expresión bajo condiciones de estrés, mientras que la señal de secreción Exp4 dirige la proteína hacia el sistema Sec, aumentando la probabilidad de obtenerla en forma soluble.

La elección del quimiotripsinógeno B1 (CTRB1) se basa en una problemática bien definida. En pacientes con fibrosis quística, la insuficiencia pancreática exocrina provoca una disminución en la secreción de enzimas digestivas, lo que ocasiona una digestión deficiente, malabsorción de nutrientes y, como consecuencia, malnutrición crónica. Aunque actualmente existen terapias de reemplazo enzimático, estas no siempre son accesibles y pueden presentar limitaciones a largo plazo.

En este sentido, la producción recombinante de enzimas digestivas humanas, como CTRB1, en un sistema seguro como *Lactococcus lactis*, representa una alternativa interesante que podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. La posibilidad de producir y secretar estas proteínas en un sistema bacteriano abre la puerta a futuras aplicaciones en el tratamiento de enfermedades asociadas a deficiencia enzimática.

Por lo tanto, este proyecto se enfoca en diseñar y evaluar un sistema de expresión del gen CTRB1 humano en *Lactococcus lactis*, utilizando el vector pLB333 y una estrategia dirigida a su secreción extracelular. Con ellos, se busca explorar el potencial de este sistema como plataforma para la producción de proteínas recombinantes con posibles aplicaciones en el tratamiento de la fibrosis quística.

1.6.2 Hipótesis

El quimiotripsinógeno recombinante humano expresado en la bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363, tendrá un efecto proteolítico, tras su posterior activación con tripsina.

1.6.3 Objetivos

1.6.3.1 Objetivo general

Evaluar la expresión y la actividad proteolítica del quimiotripsinógeno B1 recombinante humano en *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363, tras su posterior activación con tripsina.

1.6.3.2 Objetivos específicos

- Diseñar la unidad de transcripción sintética.
- Construir el plásmido recombinante para expresar quimiotripsinógeno B1 en *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363.
- Transformar la cepa de *Lactococcus lactis* con el plásmido recombinante.
- Expresar el quimiotripsinógeno B1 recombinante humano en *L. lactis*.
- Evaluar la actividad proteolítica *in vitro*, tras su posterior activación con tripsina.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 Materiales y Reactivo

A continuación, se enlistan los principales materiales y reactivos utilizados durante el desarrollo experimental.

- Medio M17 (Difco) en forma sólida (con agar) o líquida.
- Glucosa (Sigma-Aldrich), sacarosa y glicerol (J.T. Baker).
- Antibiótico cloranfenicol grado molecular (Sigma-Aldrich).
- EDTA, CaCl₂, MgCl₂ (J.T. Baker).
- Enzimas de restricción: EcoRI, NsiI (Thermo Scientific).
- Soluciones tampón: Buffer STE, soluciones de lisis I, II y III (preparadas en laboratorio).
- Fenol:cloroformo (mezcla equilibrada, en frío).
- Etanol absoluto y al 70 %, grado molecular.
- Buffer TE (Tris-EDTA, pH 8.0).
- Ladder de ADN: GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

- Kits comerciales: QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

2.2 Equipos

Los equipos principales utilizados en los procedimientos experimentales fueron:

- Centrífugas refrigeradas y no refrigeradas (Thermo Scientific, Eppendorf).
- Electroporador Eppendorf Eporator®.
- Termobloques y baños de temperatura controlada.
- Cámara de electroforesis horizontal con fuente de poder (Bio-Rad®).
- Transiluminador UV (Bio-Rad®).
- Micropipetas de precisión (Eppendorf®).
- Cabina de bioseguridad tipo II.
- Incubadoras anaerobias y estufas bacteriológicas (30 °C y 37 °C).
- Balanza analítica, vortex, espectrofotómetro NanoDrop y cámara de gel.

2.3 Metodología experimental

2.3.1 Bioinformática

2.3.1.1 Diseño bioinformático de la unidad de transcripción sintética

pGroESL/PSUsp45/CTRB1

El diseño bioinformático de la unidad de transcripción sintética (UTS) *CTRB1* se realizó mediante la base de datos de secuencias genéticas GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI, por sus siglas en inglés), donde se obtuvo la secuencia del gen humano *CTRB1*, que codifica para el zimógeno quimiotripsinógeno B1 (secuencia de referencia: NP_001897.4). El análisis de la anotación funcional de dicha secuencia permitió identificar la presencia de un péptido señal nativo localizado en los aminoácidos 1-18, correspondiente a una señal de secreción propia de células eucariotas, el cual fue excluido del diseño bioinformático debido a que la estrategia de expresión heteróloga contempla el uso del péptido señal Usp45 para dirigir la secreción de la proteína recombinante en *Lactococcus lactis*. Con la ayuda de la base de datos Universal Protein (UniProt), se seleccionó la región codificante correspondiente de la proteína CTRB1, excluyendo el péptido señal nativo, con una longitud de 263 aminoácidos (secuencia de referencia: P17538).

A partir de la secuencia codificante seleccionada de *CTRB1*, se generó el diseño del inserto correspondiente para su posterior clonación. Con el fin de asegurar la correcta traducción de la proteína recombinante se incorporaron nucleótidos adicionales en los extremos de la secuencia para preservar el marco de lectura abierto (ORF). Asimismo, se añadieron los sitios de restricción NsiI en el extremo 5' y EcoRI en el extremo 3', permitiendo la clonación direccional del inserto en el vector de expresión correspondiente (pLB333).

La secuencia de nucleótidos diseñada correspondiente al gen *CTRB1* fue analizada mediante diversas herramientas bioinformáticas con el objetivo de verificar su correcta traducción y correspondencia con la proteína de interés. En primero lugar, la secuencia fue traducida utilizando la herramienta ExPASy Translate Tool, con la finalidad de comprobar la conservación del marco de lectura abierto (ORF) y la ausencia de codones de paro prematuros.

Posteriormente, la secuencia proteica obtenida fue evaluada mediante herramientas de análisis de dominios, con el fin de identificar la presencia de dominios característicos asociados a serin proteasa tipo tripsina. Asimismo, se realizaron alineamientos de similitud utilizando la herramienta BLAST del National Center for Biotechnology Information, para comparar la secuencia diseñada con proteínas reportadas en bases de datos públicas y verificar su similitud con quimiotripsinógenos humanos y proteínas relacionadas de la misma familia.

Posteriormente, la secuencia fue sometida a un proceso de optimización de codones para su expresión en *Lactococcus lactis* utilizando Integrated DNA Technologies (IDT), con el objetivo de ajustar el uso de codones a las preferencias del hospedero y favorecer

una expresión eficiente de la proteína recombinante. Finalmente, la secuencia diseñada del gen *CTRBI* fue enviada a la compañía GenScript para su síntesis química, siendo clonada en el vector pUC57. Este constructo fue posteriormente utilizado para su amplificación en *Escherichia coli* y la obtención del inserto mediante digestión enzimática para su posterior clonación en el vector de expresión pLB333.

2.3.1.2 Diseño y verificación de primers para la confirmación de *CTRBI* y pLB333

Los primers utilizados para la amplificación y confirmación del gen *CTRBI* así como para el análisis del vector pLB333, fueron diseñados de manera manual a partir de las secuencias de referencia correspondientes, seleccionando regiones específicas que permitieran una amplificación adecuada mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la confirmación del gen *CTRBI*, se diseñó un par de primers dirigidos a una región de la secuencia codificante de 773 pb, con el objetivo de verificar la presencia del gen de interés en las construcciones obtenidas. De manera similar, se diseñaron primers específicos para la amplificación de regiones del vector pLB333 de 2763 pb con fines de confirmación de la correcta construcción recombinante.

Los primers diseñados fueron evaluados utilizando la herramienta OligoAnalyzer de Integrated DNA Technologies, considerando parámetros como la temperatura de fusión (T_m), el contenido de GC y la longitud de los oligonucleótidos, así como la ausencia de estructuras secundarias y formación de dímeros, con el fin de asegurar condiciones adecuadas para su uso en PCR.

Adicionalmente, como parte del diseño bioinformático, se realizó una planeación *in silico* de la estrategia completa de clonación del gen *CTRBI* en el vector de expresión pLB333. Para ello, se utilizaron las plataformas Benchling y SnapGene, en la cual se simuló las etapas de amplificación por PCR, digestión con enzimas de restricción, ligación y orientación del inserto en el vector. Estas simulaciones nos permitieron verificar los tamaños esperados de los fragmentos, la correcta orientación del gen de interés y la compatibilidad de los sitios de restricción, sirviendo como base para los procedimientos experimentales.

2.3.1.3 Análisis *in silico* de la estrategia de secreción y validación estructural

El sistema de expresión utilizado pLB333 contiene el péptido señal PSExp4 (de 27 aminoácidos), el cual forma parte del cassette de expresión del vector. Por esta razón, se realizó una verificación *in silico* para confirmar que el gen *CTRBI* se encontrara en marco con dicha secuencia, permitiendo la traducción continua de la proteína recombinante.

La secuencia fue traducida utilizando la herramienta ExPASy Translate Tool para comprobar la conservación el marco de lectura abierto (ORF) y descartar la presencia de codones de paro prematuros en la región de fusión.

Además, se empleó la herramienta bioinformática SignalP para evaluar el reconocimiento del péptido señal Exp4 y predecir el sitio de escisión correspondiente, considerando su funcionamiento dentro de la vía general de secreción (Sec) en *Lactococcus lactis*.

2.3.1.4 Validación bioinformática de la proteína recombinante

La secuencia de la proteína recombinante fue analizada mediante la herramienta FASTA36 contra la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot, con el objetivo de determinar el grado de similitud con la proteína CTRB1 humana de referencia. Este análisis permitió obtener el porcentaje de identidad y evaluar la significancia estadística mediante el valor E (E-value).

Posteriormente, se empleó la plataforma InterPro (EMBL-EBI) para identificar dominios funcionales y firmas conservadas dentro de la secuencia, incluyendo aquellas correspondientes a la familia de serin proteasas tipo tripsina y al dominio Peptidase S1.

2.3.1.5 Validación y Análisis estructural mediante UCSF ChimeraX

El modelo tridimensional de la proteína CTRB1 fue obtenido de la base de datos AlphaFold Protein Structure Database (UniProt: P17538) en formato PDB. El análisis estructural se realizó utilizando el software UCSF ChimeraX versión 1.7.1.

Inicialmente, se evaluó la calidad del modelo mediante la inspección de los valores de confianza predicted Local Distance Difference Test (pLDDT), contenidos en el campo *B-factor* del archivo PDB. Posteriormente, el modelo fue comparado con la estructura cristalográfica de la α -quimotripsina humana (PDB ID: 1GCT) empleando la herramienta MatchMaker, obteniéndose el puntaje de alineamiento de secuencia y el valor de la desviación cuadrática media (*Root Mean Square Deviation*, RMSD), como indicadores de la similitud estructural entre ambas proteínas.

Posteriormente, el modelo fue visualizado en representación *cartoon* para evaluar su organización tridimensional. Se identificaron los residuos que conforman la tríada

catalítica característica de las serinas proteasas (His75, Asp120 y Ser213, de acuerdo con la numeración del modelo de AlphaFold), los cuales fueron resaltados mediante representaciones *stick* y *ball-and-stick* con el propósito de visualizar la orientación de sus cadenas laterales (grupos R) dentro del sitio activo.

Finalmente, mediante la herramienta Distance, se determinaron las distancias entre los átomos implicados en las principales interacciones de la tríada catalítica para evaluar la geometría del sitio activo. Las figuras fueron generadas con fondo blanco y diferentes representaciones moleculares para facilitar el análisis estructural y su presentación.

2.4 Condiciones experimentales para la manipulación de *Lactococcus lactis*

2.4.1 Línea bacteriana, vector plasmídico, y agente de selección

Para la realización de los experimentos de clonación y transformación celular se emplearon dos cepas de *Lactococcus lactis* subsp, *cremoris* MG1363: una cepa silvestre, carente de elementos plasmídicos, y una cepa portadora del plásmido pLB333. Ambas fueron donadas por el Dr. Luis Bermúdez-Humarán, del Instituto Nacional Francés de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (INRAE).

El vector plasmídico pLB333 (figura 3) contiene un sitio de clonación múltiple (MCS) que permite la inserción de genes de interés mediante técnicas de clonación molecular. Como marcador de selección, el plásmido posee un gen de resistencia a cloranfenicol (cm), por lo que este antibiótico fue utilizado como agente selectivo durante el desarrollo experimental.

2.4.2 Reactivación de *L. lactis* y condiciones de cultivo.

La reactivación de las cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 se realizó a partir de crioviales almacenados a -80°C. Se efectuó un raspado con asa estéril y se sembró por estría en cuatro campos sobre placas de medio M17 suplementado con glucosa al 1% (G-M17A). Las placas se incubaron a 30°C durante toda la noche en condiciones anaerobias.

Una vez observado el crecimiento bacteriano, se seleccionó una colonia aislada para inocularla en 5 mL de medio fresco G-M17C en tubos falcon de 15 mL, incubando bajo las mismas condiciones.

Para la cepa portadora de pLB333, el procedimiento fue similar empleando placas de G-M17A suplementadas con cloranfenicol (20 µg/mL) para mantener la selección. Posteriormente, una colonia aislada fue inoculada en 5 mL de G-M17C suplementado con cloranfenicol para su propagación.

2.4.3 Preparación de células electrocompetentes

La preparación de células electrocompetentes de *L. lactis* se inició con la inoculación de 5 mL de medio G-M17C utilizando un inóculo proveniente de un criovial almacenado a -80°C. Este cultivo se incubó a 30°C durante la noche, sin agitación. Posteriormente, se realizó una segunda inoculación en 50 mL de medio M17C suplementado con sacarosa 0.5M y glicina al 2% (G-SGliM17C) a partir del pre-cultivo anterior, utilizando una dilución de 1:100. Dicho cultivo se incubó a 30°C durante 48 h en condiciones estáticas y sin aireación.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el cultivo se diluyó con 400 mL de medio G-SGliM17C fresco y se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.3-

0.4, lo cual ocurrió tras aproximadamente 5 h. A continuación, las células fueron recolectadas mediante centrifugación a 6000 x g durante 20 min a 4°C.

Las células se lavaron con 400 mL de una solución fría de sacarosa 0.5 M y glicerol al 10%, centrifugando nuevamente a 6000 x g a 4°C. Posteriormente, se resuspendieron en 200 mL de una solución de sacarosa 0.5 M, glicerol al 10% y EDTA 50 mM (4°C), manteniéndose en hielo durante 15 min antes de realizar una nueva centrifugación con las mismas condiciones. Luego, se efectuó un segundo lavado con 100 mL de sacarosa 0.5 M y glicerol al 10% (4°C) y se centrifugó nuevamente. Finalmente, las células fueron suspendidas en 4 mL de la misma solución de sacarosa 0.5 M y glicerol al 10%, manteniéndolas en frío. Y se almacenaron en alícuotas de 100 µL de células electrocompetentes en tubos eppendorf de 1.5 mL a -80°C para su uso posterior.

2.4.4 Conservación bacteriana

Para la preservación a largo plazo de las cepas de *L. lactis* subsp, *cremoris* MG1363 (tanto la cepa silvestre como la portadora del plásmido pLB333), se prepararon alícuotas criopreservadas a -80°C. Cada alícuota se elaboró utilizando 5 mL de cultivo en medio G-M17C en fase exponencial, a los cuales se adicionaron 1.6 mL de glicerol al 60% (v/v), obteniendo una concentración final de glicerol del 15% en el criovial.

Las mezclas se homogeneizaron suavemente para evitar daño celular y se distribuyeron en crioviales estériles de 1.5 mL, que posteriormente se almacenaron a -80°C hasta su uso. Para su reactivación, los crioviales se descongelaron directamente en hielo y el contenido fue manipulado de inmediato en condiciones estériles, evitando ciclos repetidos de congelación y descongelación.

2.5 Clonación molecular

2.5.1 Preparación de células químicamente competentes de *Escherichia coli*

La preparación de células químicamente competentes de *Escherichia coli* se llevó a cabo mediante el método de cloruro de calcio (CaCl_2), con modificaciones adaptadas a las condiciones del laboratorio.

Para ello, se partió de una colonia aislada previamente crecida en medio LB sin antibiótico. Esta fue inoculada en 5 mL de medio LB y se incubó a 37°C con agitación (220 rpm) durante 24 h.

Posteriormente, se realizó una dilución del cultivo en medio LB fresco y se incubó nuevamente bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica (OD_{600}) de aproximadamente 0.45-0.5, monitoreada mediante espectrofotometría utilizando una celda de cuarzo.

Una vez alcanzada la fase de crecimiento adecuada, el cultivo fue transferido a tubos estériles y mantenimiento en hielo durante aproximadamente 30 min. Las células fueron recolectadas mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 min a 4°C, descartando cuidadosamente el sobrenadante.

El pellet celular se resuspendió en una solución fría de CaCl_2 0.1M y se incubó en hielo, seguido de una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en una solución de CaCl_2 0.1M suplementada con glicerol al 15%, manteniéndose siempre en condiciones frías.

Finalmente, las células competentes fueron alicuotadas (200 μ L por tubo) y almacenadas a -80°C hasta su uso en experimentos de transformación.

2.5.2 Transformación de *Escherichia coli* con pUC57 CTRB1

La transformación de células químicamente competentes de *Escherichia coli* se llevó a cabo mediante el método de choque térmico, utilizando el plásmido pUC57 portador del gen *CTRB1* previamente sintetizado.

Las células competentes fueron retiradas del almacenamiento a -80°C y colocadas en hielo durante aproximadamente 30 min para su descongelación, evitando su manipulación directa durante este proceso.

Posteriormente, se mezclaron 30 μ L de células competentes con 1 μ L de ADN plasmídico (10-50 ng/ μ L), manteniendo la mezcla en hielo. La suspensión se incubó en hielo durante 20 min para favorecer la interacción entre el ADN y la membrana celular.

A continuación, se realizó un choque térmico incubando la mezcla a 42°C durante 45 s, seguido de una incubación inmediata en hielo durante 2 min con el fin de estabilizar las membranas celulares.

Posteriormente, se adicionaron 1000 μ L de medio LB sin antibiótico previamente templado y las células fueron incubadas a 37°C con agitación durante 1 h para permitir la recuperación celular y la expresión del gen de resistencia.

Tras este periodo, las células fueron centrifugadas a velocidad máxima durante 30 s, descartando parte del sobrenadante y resuspendiendo el pellet en aproximadamente 100 μ L del mismo medio.

Finalmente, se sembraron alícuotas de 25-50 μ L en placas de LB suplementadas con el antibiótico correspondiente, incubándose a 37°C durante 16 h para la selección de colonias transformadas.

2.5.3 Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó a partir de cultivos bacterianos de *Escherichia coli* y *Lactococcus lactis* utilizando un kit comercial de purificación (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante con adaptaciones para bacterias Gram positivas.

Para la obtención del plásmido pUC57 portador del gen CTRB1, se emplearon cultivos bacterianos de *Escherichia coli* previamente transformados de 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico Ampicilina (100 μ g/mL), incubados durante 16 h a 37°C con agitación (220 rpm).

En el caso de *Lactococcus lactis*, se utilizaron cultivos bacterianos de 5 mL en medio M17 suplementado con cloranfenicol (20 μ g/mL), incubados durante 16 h a 30°C en condiciones anaerobias y sin agitación.

Posteriormente, en ambos casos las células fueron recolectadas por centrifugación y procesadas de acuerdo con el protocolo del kit, el cual incluye etapas de lisis celular, neutralización y purificación mediante columnas de afinidad. El ADN plasmídico obtenido fue finalmente eluido en agua libre de nucleasas y almacenado a -20°C hasta su posterior uso.

2.5.4 Preparación y caracterización del inserto *CTRB1* y del vector pLB333

Una vez obtenido el ADN plasmídico, se procedió a la preparación tanto del inserto *CTRB1* como del vector pLB333 mediante digestión enzimática.

Para obtener el inserto, se utilizó el plásmido pUC57 portador del gen *CTRB1*, previamente propagado en *Escherichia coli*. Este plásmido fue sometido a una digestión doble con las enzimas de restricción NsiI y EcoRI, con el objetivo de liberar el fragmento correspondiente al gen de interés.

De manera paralela, el vector pLB333 se analizó inicialmente mediante una digestión con la enzima EcoRI bajo las condiciones descritas en la Tabla 3 con el fin de verificar su tamaño molecular en comparación con un marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific). La reacción se incubó durante 1 h, seguida de una inactivación térmica a 65°C durante 20 minutos. Posteriormente, las muestras se analizaron en un gel de agarosa al 1%. La electroforesis se realizó aplicando 75 V durante 5 min para permitir la entrada del ADN en los pocillos, seguida de 115 V durante 40 min para lograr una adecuada separación de los fragmentos. Los productos se visualizaron mediante transiluminación UV utilizando un sistema Bio-Rad.

Reactivo	Volumen
10X Buffer EcoRI	2 µL
DNA (0.5-1 µg/µL)	1 µL
EcoRI (20 U/µL)	0.5-1 µL
Agua libre de nucleasas	16 µL

Tabla 3. Condiciones experimentales para la digestión con EcoRI.

Posteriormente, el plásmido pLB333 fue sometido a una digestión doble con las enzimas NsiI y EcoRI, bajo condiciones indicadas en la Tabla 4. La incubación se realizó durante 1 h y 30 min a 37°C, con el fin de generar extremos cohesivos compatibles para la posterior ligación con el inserto *CTRB1*.

Finalizadas las digestiones fueron cargados en un gel de agarosa al 1% junto con un marcador de peso molecular. La corrida se realizó bajo las mismas condiciones previamente descritas. Finalmente, se identificaron las bandas correspondientes al inserto *CTRB1* (773 pb) y al vector linealizado (2763 pb), las cuales fueron recortadas y purificadas utilizando el kit Monarch DNA Gel Extraction, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Reactivo	Volumen
NEBuffer r3.1	2 µL
DNA (0.5-1 µg/µL)	1 µL
EcoRI (20 U/µL)	0.5-1 µL
NsiI (10 U/µL)	0.5-1 µL
Agua libre de nucleasas	15 µL

Tabla 4. Condiciones experimentales para doble digestión con EcoRI y NsiI.

2.5.5 Ligación del inserto *CTRB1* al vector pLB333

La ligación del inserto *CTRB1* al vector pLB33 se realizó utilizando la enzima T4 DNA ligasa, con el objetivo de generar el plásmido recombinante.

Para ello, se empleó una relación molecular inserto:vector de 5:1, la cual fue calculada utilizando una herramienta en línea de cálculo de ligación, tomando como base una cantidad de 1000 ng de ADN vector. A partir de este valor, se determinó la cantidad correspondiente de inserto necesaria para la reacción.

La mezcla de ligación se preparó utilizando el buffer de ligasa 10X, la enzima T4 DNA ligasa, el ADN del vector previamente digerido y el inserto *CTRB1* purificado. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Finalmente, el producto de ligación fue utilizado directamente para la transformación de células electrocompetentes de *Lactococcus lactis*.

2.5.6 Transformación bacteriana de *L. lactis* electrocompetentes con pLB333CTRB1 recombinante

La transformación de células electrocompetentes de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 libre de plásmido, se realizó manteniendo las muestras a 0°-4°C. Para ello, se mezclaron 100 µL de células electrocompetentes con 1 µL del plásmido pLB333/*CTRB1* (aproximadamente 100 ng de ADN) y la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.2 cm (Bio-Rad). La electroporación se efectuó aplicando un pulso eléctrico de 2000 V, 25 µF y 200 Ω durante 5 ms, utilizando un equipo Eppendor Eporator.

Inmediatamente después del pulso, se adicionó 1 mL de medio G-M17C suplementado con 20 mM de MgCl₂ y 2 mM de CaCl₂ (G-M17C/MgCl₂/CaCl₂) directamente en la

cubeta, y la suspensión se incubó durante 3 h a 30°C sin agitación, para permitir la recuperación celular y la expresión del gen de resistencia.

Posteriormente, se procedió a sembrar las células recuperadas sobre placas de petri con medio G-CIM17C utilizando la técnica de extensión en placa. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 h en condiciones anaerobias. Como control negativo, se llevó a cabo el mismo procedimiento utilizando células electrocompetentes sin añadir el ADN plasmídico.

Tras el periodo de incubación, se seleccionaron las colonias transformadas, las cuales fueron denominadas *L. lactis* pLB333/CTRB1. Estas colonias se inocularon en caldo G-CIM17 y se incubaron a 30°C durante 12 h sin agitación. Finalmente, se prepararon alícuotas para su conservación a -80°C, con el propósito de realizar análisis de confirmación en etapas posteriores.

2.5.7 Confirmación del plásmido recombinante pLB333CTRB1

La confirmación del plásmido recombinante pLB333CTRB1 se realizó mediante análisis por PCR y secuenciación. Para ello, se partió de un stock de conservación bacteriana de la cepa transformada posterior a la ligación, el cual fue reactivado mediante siembra en placa. A partir de una colonia aislada, se inocularon 5 mL de medio G-M17C suplementado con cloranfenicol, incubando bajo las condiciones previamente descritas.

Posteriormente, se realizó la extracción de ADN plasmídico siguiendo la metodología descrita anteriormente. El ADN obtenido fue utilizado como molde para diferentes reacciones de PCR con el objetivo de confirmar la presencia e integración correcta del inserto *CTRB1* en el vector pLB333. En primer lugar, se emplearon primers específicos

para el gen *CTRB1*, con los cuales se amplificó el fragmento correspondiente al inserto (773 pb). Adicionalmente, se realizaron PCR utilizando primers específicos del vector pLB333 (2763 pb), con el fin de confirmar la presencia del plásmido. Finalmente, se llevó a cabo una PCR utilizando un primer dirigido al gen *CTRB1* y el otro al vector pLB333, lo que permitió amplificar la región correspondiente al constructo recombinante.

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando un Máster Mix comercial 2X el cual contiene Taq DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y buffer de reacción. Las condiciones de amplificación (Tabla 5) incluyeron una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento a 63 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1 min, con una extensión final a 72 °C por 5 min.

Reactivo	Volumen
Máster Mix 2X	12.5 µL
Primer Forward (10mM)	0.5-1 µL
Primer Reverse (10mM)	0.5-1 µL
ADN molde (1-10 ng)	0.5-1 µL
Agua libre de nucleasas	Completar volumen final 25 µL

Tabla 5. Condiciones de reacción para PCR utilizando Master Mix.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa para verificar los tamaños esperados de amplificación. Finalmente, las muestras de ADN plasmídico extraído fueron enviadas al laboratorio Core Lab Genomics (Tecnológico de Monterrey) para su análisis mediante secuenciación Sanger en una plataforma SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems). La reacción de ciclosecuenciación se realizó

utilizando los iniciadores específicos de la construcción (Primer Fw y Primer Rev). Posterior a la obtención de los electroferogramas, las secuencias generadas se alinearon e inspeccionaron en la plataforma bioinformática Benchling, confirmando el alineamiento de identidad con la secuencia teórica del gen *CTRBI*, la ausencia de mutaciones o indels, y el mantenimiento del marco de lectura abierto (ORF).

2.6 Expresión de CTRB1 en *Lactococcus lactis*

La expresión de la proteína recombinante CTRB1 se realizó en la cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 portadora del plásmido recombinante pLB333CTRB1. Como control, se empleó la cepa portadora del plásmido pLB333 sin el inserto.

A partir de un stock conservado en glicerol, se realizó un preinóculo en 5 mL de medio G-M17C, incubando a 30°C en condiciones estáticas durante la noche. Posteriormente, el cultivo fue inoculado en 10 mL de medio fresco G-M17C suplementado con cloranfenicol. Los cultivos se incubaron a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica (OD600) de 0.5-0.6. Una vez alcanzada esta fase, se indujo la expresión mediante el cambio de temperatura a 37°C, para activar el promotor pGroESL previamente descrito. Los cultivos se mantuvieron durante 4 h en condiciones estáticas.

Posteriormente, se procedió al análisis de la expresión de la proteína recombinante CTRB1 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), con el objetivo de evaluar la presencia, tamaño esperado y patrón de expresión de la proteína recombinante en comparación con el control.

2.6.1 Preparación de las muestras proteicas

Con el objetivo de evaluar el efecto del método de preparación de muestras sobre la actividad proteolítica del CTRB1 recombinante, se emplearon dos estrategias: 1) precipitación proteica mediante ácido tricloroacético (TCA) también para el análisis electroforético y 2) recuperación directa del sobrenadante del medio de cultivo con concentración por ultrafiltración.

2.6.2 Precipitación de muestras para análisis por SDS-PAGE y evaluación de actividad enzimática

Finalizado el periodo de expresión, las proteínas fueron precipitadas a partir del cultivo utilizando ácido tricloroacético (TCA) al 10%, incubando las muestras en hielo a 4°C durante 1 h y 30 min. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 20,000 xg durante 30 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet obtenido fue lavado con acetona fría, agregando aproximadamente 500 µL por cada 1 mL de muestra inicial. Se realizó una nueva centrifugación bajo las mismas condiciones, eliminando nuevamente el sobrenadante.

El pellet proteico fue resuspendido en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7. Posteriormente, las muestras fueron concentradas utilizando dispositivos centrífugos con un corte de 10kDa.

2.6.3 Preparación de muestras para evaluación de actividad enzimática

De manera paralela, una fracción de 50 mL del cultivo fue centrifugada a 10,000 x g durante 5 minutos recuperando el sobrenadante como fuente de proteína secretada. El sobrenadante fue filtrado mediante un filtro de 0.45 µm para eliminar residuos celulares. Posteriormente, se tomaron aproximadamente 10-15 mL del sobrenadante filtrado, los cuales fueron concentrados utilizando dispositivos de ultrafiltración tipo centrífugos con un corte de 10 kDa. Durante este proceso, se realizaron lavados con 3 buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.8, empleando un volumen de 500 µL por lavado, y recuperando finalmente un volumen aproximado de 200-500 µL de muestra concentrada.

Esta estrategia se empleó con el fin de conservar la conformación nativa de la proteína recombinante y evitar posibles efectos desnaturalizantes asociados a la precipitación con TCA, los cuales podrían afectar la actividad enzimática.

2.6.4 Cuantificación de proteínas mediante el método BCA

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de ácido bicinconínico (BCA), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) (2 mg/mL), mediante diluciones seriadas en un rango de concentraciones de 25 a 250 $\mu\text{g/mL}$. El reactivo de trabajo se preparó inmediatamente antes de su uso, mezclando el reactivo de BCA con una solución de sulfato de cobre al 4% en una proporción 50:1. Para cada muestra se mezclaron 20 μL de proteína con 200 μL del reactivo de trabajo. Las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se midió la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro.

Se elaboró una curva de calibración a partir de una solución stock de BSA mediante diluciones seriadas en un rango adecuado de concentraciones. Cada punto de la curva se preparó por triplicado. Como blanco se utilizó el mismo buffer de resuspensión de las muestras (Tris-HCl 50 mM, pH 7), con el fin de evitar interferencias en la medición.

Las concentraciones de proteína en las muestras se determinaron a partir de la curva de calibración obtenida.

2.6.5 Análisis por SDS-PAGE

El análisis de la expresión proteica se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Se prepararon geles con un sistema discontinuo compuesto por un gel separador (resolving gel) al 12% de acrilamida/bisacrilamida (30:0.8) y un gel concentrador (stacking gel) al 4%. La polimerización se indujo mediante la adición de persulfato de amonio (APS) al 0.05% (p/v) y TEMED al 0.05% (v/v).

El gel separador se preparó en buffer Tris-HCl 1.5 M pH8.8, mientras que el gel concentrador se preparó en buffer Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, ambos conteniendo SDS al 0.1% (p/v).

Las muestras desnaturalizadas, junto con un marcador de peso molecular, fueron cargadas en el gel y separadas mediante electroforesis en un sistema vertical utilizando buffer de corrida Tris-Glicina-SDS (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS).

La corrida electroforética se llevó a cabo inicialmente a 80 V durante el paso por el gel concentrador, incrementándose posteriormente a 120 V para la separación en gel resolvente, con una duración total aproximada de 3 a 4 h, hasta lograr una adecuada resolución de las bandas proteicas.

Finalmente, los geles fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250 y sometidos a un proceso de desteñido utilizando una solución de metanol/ácido acético para la visualización de las bandas.

2.7 Análisis de expresión e inmunodetección mediante Western Blot

Para confirmar la presencia e identidad de la proteína recombinante CTRB1 expresada, se realizó un análisis de Western Blot. Inicialmente, se llevó a cabo un gel SDS-PAGE al 12% independiente, en el cual se cargaron muestras del sobrenadante concentrado a concentraciones crecientes de proteína total (10 μ g, 15 μ g y 20 μ g), flanqueadas por marcadores de peso molecular. El control de expresión Exp4 se omitió en esta determinación debido a la especificidad del inmunoensayo hacia CTRB1.

Tras la separación de las proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE, se retiró el gel concentrador (*stacking gel*) y el gel separador se equilibró en buffer de transferencia durante 10-15 min para remover el exceso de SDS. Paralelamente, se activó una membrana precortada de PVDF con papel filtro (PowerBlotter Pre-cut Membrane/Filter Paper Stacks, PVDF Mini, Thermo Scientific™) mediante incubación en metanol absoluto durante 50 s, seguida de un enjuague en agua destilada (1-2 min) y posterior equilibrio en buffer de transferencia por 5 min.

Se ensambló el sándwich de transferencia evitando la formación de burbujas de aire. La electrotransferencia se llevó a cabo en húmedo manteniendo la cámara de transferencia en un baño de hielo a 4 °C; se aplicó una corrida inicial a 24 V durante toda la noche (*overnight*), seguida por una fase a 50 V por 30 min y, finalmente, 75 V por 30 min. La eficiencia de la transferencia se verificó mediante tinción reversible con Rojo Ponceau, el cual fue retirado con tres lavados de 60 s empleando TBST 1X.

Posteriormente, la membrana se incubó en solución de bloqueo (5% p/v de leche descremada en TBST 1X) durante 1 h a temperatura ambiente bajo agitación suave a 100 rpm. A continuación, la membrana se incubó durante toda la noche a 4 °C con el

anticuerpo primario anti-CTRB1 (Abcam, ab235053) a una dilución 1:2,500 preparada en solución de bloqueo al 5%.

Concluida la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se sometió a tres lavados de 10 min cada uno con TBST 1X a 100 rpm. Luego, se incubó con el anticuerpo secundario Goat anti-Rabbit IgG-HRP (Abcam, ab97051) a una dilución 1:5,000 en solución de bloqueo al 5%, durante 1 h a temperatura ambiente y agitación a 100 rpm. Posterior a la incubación secundaria, se realizaron entre 3 y 5 lavados de 10 min con TBST 1X.

La inmunodetección se llevó a cabo por colorimetría empleando como sustrato 3,3'-diaminobencidina (DAB). Se preparó una solución de 10 mg de DAB en 10 mL de Tris-HCl 50 mM (pH 7.2) y, justo antes de la revelación, se mezcló en proporción 1:1 con el Stable Peroxide Substrate Buffer. La membrana se sumergió en la mezcla reactiva hasta la aparición de las bandas específicas de CTRB1, deteniendo la reacción sumergiendo la membrana en agua destilada.

2.8 Evaluación de la actividad proteolítica del quimiotripsinógeno B1 recombinante

Con el objetivo de determinar la funcionalidad del CTRB1 expresado en *Lactococcus lactis*, se evaluó su capacidad proteolítica mediante un ensayo espectrofotométrico basado en la hidrólisis del sustrato sintético N-benzoill-L-tirosina etil éster (BTEE).

El sustrato BTEE fue preparado a una concentración de 3.4 mg/mL en metanol, distribuyéndose en alícuotas de 100 µL y almacenándose a -20 °C hasta su uso. La tripsina utilizada para la activación del zimógeno se preparó a una concentración final de Tris-HCl 50 mM pH 7.8 suplementado con cloruro de calcio 20 mM.

Las muestras obtenidas de la expresión fueron sometidas a un proceso de activación mediante ambas estrategias de preparación (precipitación con TCA y sobrenadante concentrado) fueron centrifugadas a 10,000 xg durante 5 min. Se recuperaron aproximadamente 200-500 µL de cada muestra, los cuales fueron empleados para el ensayo enzimático.

Posteriormente, las muestras fueron diluidas en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.8 utilizando una proporción aproximada de 1:10 (muestra:buffer) para asegurar condiciones adecuadas de reacción.

La activación del zimógeno se llevó a cabo mediante incubación con tripsina (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1 mg/mL, preparada en buffer Tris-HCl 50 mM. Para la activación, se empleó una proporción aproximada de 1:100 (tripsina:volumen total de muestra), incubando durante 30 min a 37°C, lo que permitió la conversión del quimiotripsinogeno a su forma activa (quimiotripsina).

Para la determinación de la actividad enzimática se preparó una mezcla de reacción con un volumen final de 1 mL, compuesta por aproximadamente 800 μ L buffer Tris-HCl 80 mM pH 7.8 suplementado con Cloruro de calcio 20 mM, 150 μ L de sustrato BTEE previamente disuelto en metanol y 50 μ L de muestra activada. La reacción se inició mediante la adición de la muestra, mezclando suavemente y procediendo de inmediato a la medición.

El incremento en la absorbancia fue monitoreado a 256 nm durante un periodo de 5 minutos, registrando lecturas a intervalos regulares. Esta longitud de onda corresponde a la liberación de productos aromáticos derivados de la hidrolisis del BTEE, lo cual permite evaluarla actividad de proteasas tipo quimiotripsina.

Se evaluaron tres condiciones experimentales:

- i. CTRB1 recombinante activada, correspondiente a la proteína recombinante tratada con tripsina;
- ii. CTRB1 recombinante inactiva, correspondiente a la misma muestra en ausencia de tratamiento con tripsina; y
- iii. Control, correspondiente a la cepa portadora del plásmido pLB333 sin el inserto CTRB1, la cual contiene la nucleasa Exp4, proteína presente en el vector original. Esta condición fue sometida al mismo tratamiento de activación con tripsina, con el fin de mantener condiciones experimentales equivalentes y descartar actividad proteolítica inespecífica asociada al sistema de expresión o a componentes del medio.

La actividad enzimática se determinó a partir de la pendiente de la curva de absorbancia en función del tiempo ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Bioinformática

3.1.1 Secuencias finales para la UTS *CTRB1*

Como resultado del diseño bioinformático, se obtuvo la secuencia final del gen *CTRB1* optimizado para su expresión en *Lactococcus lactis*. La secuencia diseñada presenta una longitud de 738 pb, y corresponde a la región codificante de *CTRB1* sin su péptido señal nativo. En esta secuencia se incorporaron sitios de restricción en ambos extremos para facilitar su clonación en el vector pLB333. En el extremo 5' se incluyó el sitio de corte para la enzima *NsiI*, mientras que en el extremo 3' se añadió el sitio correspondiente a *EcoRI*.

Además, se agregaron nucleótidos adicionales con el fin de preservar el marco de lectura abierto. La secuencia final diseñada se muestra en la Figura 4.



Figura 4. Secuencia del gen CTRB1 optimizado con sitios de restricción. Secuencia nucleotídica del gen *CTRB1* optimizado para su expresión en *Lactococcus lactis*. Se indican los sitios de restricción NsiI (verde) y EcoRI (azul), así como los nucleótidos adicionales.

3.1.2 Verificación *in silico* de la secuencia *CTRB1*

Como resultado del análisis bioinformático, la secuencia diseñada del gen *CTRB1* presentó una traducción correcta, manteniendo un marco de lectura abierta continuo y sin la presencia de codones de paro prematuros. La proteína obtenida corresponde a la fusión del péptido señal Exp4 con la región codificante de *CTRB1*, excluyendo su péptido señal nativa (Figura 5-A).

El análisis de homología mediante alineamiento contra bases de datos (Figura 5-B) mostró una alta identidad con la proteína humana CTRB1, alcanzando valores cercanos al 100%, lo que indica que la secuencia diseñada conserva las características estructurales de la proteína nativa.

Finalmente, el análisis de dominios funcionales mediante InterPro (Figura 5-C) identificó la presencia del dominio característico de proteasas tipo tripsina (Peptidase S1), confirmando que la proteína recombinante pertenece a la familia de serin-proteasas y conserva su arquitectura funcional.

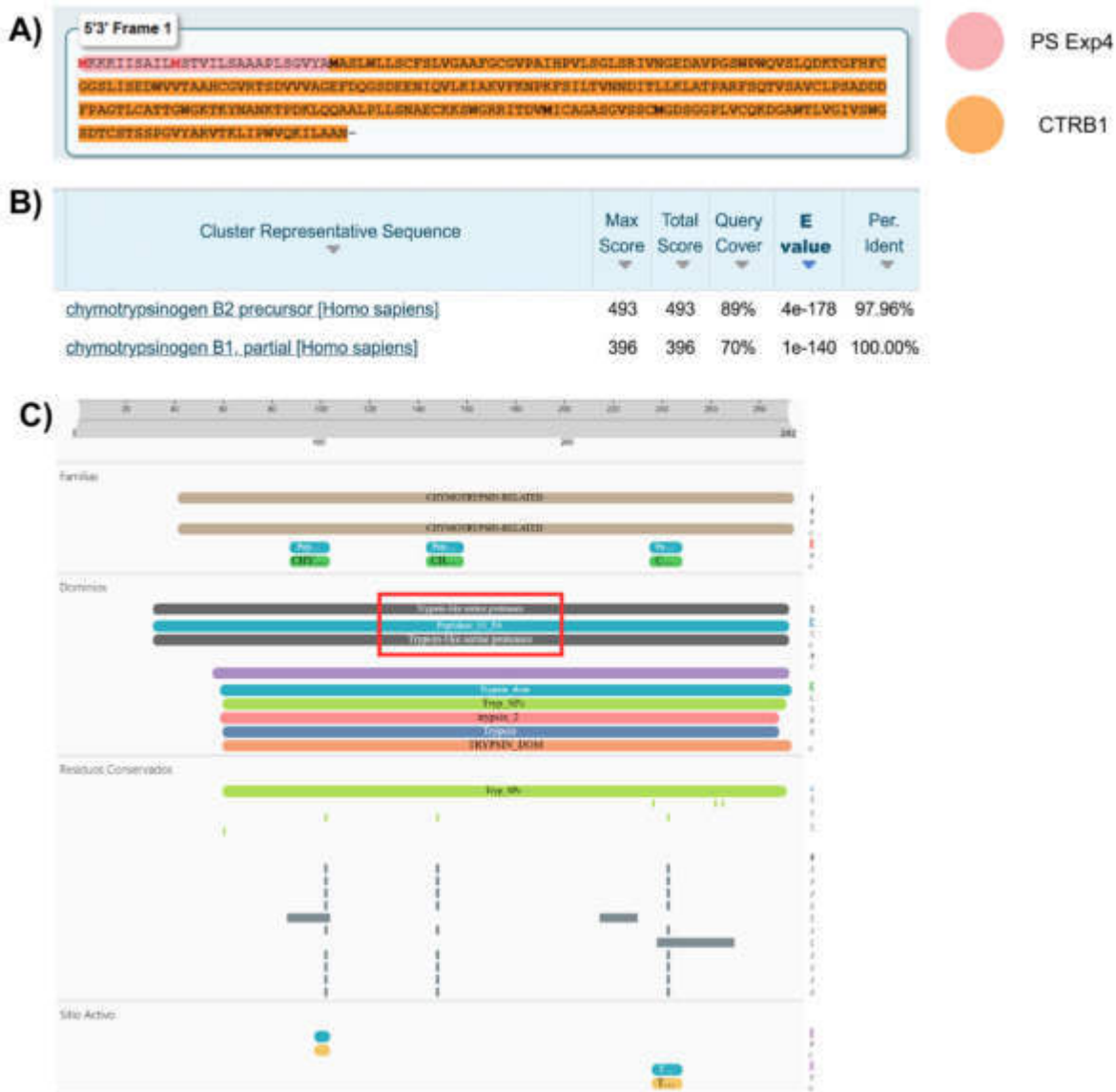


Figura 5. Validación bioinformática de la secuencia CTRB1. A) Traducción de la secuencia nucleotídica mediante ExPASy, mostrando la fusión en marco de lectura del péptido señal Exp4 (rosa) con la proteína CTRB1 (naranja). B) Análisis de homología mediante alineamiento de bases de datos (NCBI/UniProt), donde se observa una alta identidad con quimiotripsinógeno humano (CTRB1). C) Identificación de dominios funcionales mediante InterPro, evidenciando la presencia del dominio característico de proteasas tipo tripsina (Peptidase S1), propio de la familia de serin-proteasas.

Con el objetivo de validar la conservación funcional de la proteína recombinante, se realizó un análisis de dominios y firmas funcionales mediante la herramienta FASTA36, integrando múltiples bases de datos como PROSITE, Pfam y otras plataformas incluidas en InterPro.

El análisis de dominios (Figura 6-A) permitió identificar la presencia del sitio activo característico de las proteasas de serina pertenecientes a la familia tipo tripsina, correspondiente al identificador OP2033116. Este motivo funcional se localizó en la región comprendida entre los aminoácidos 207-218, lo cual es consistente con la arquitectura funcional de esta familia enzimática.

Adicionalmente, el alineamiento de la secuencia (Figura 6-B) mostró una identidad del 99.6% con la proteína CTRB1 humana (Chymotrypsinogen B) con un valor de E-value de 1.60×10^{-116} , confirmando una alta significancia estadística y la conservación de la identidad estructural de la proteína diseñada.

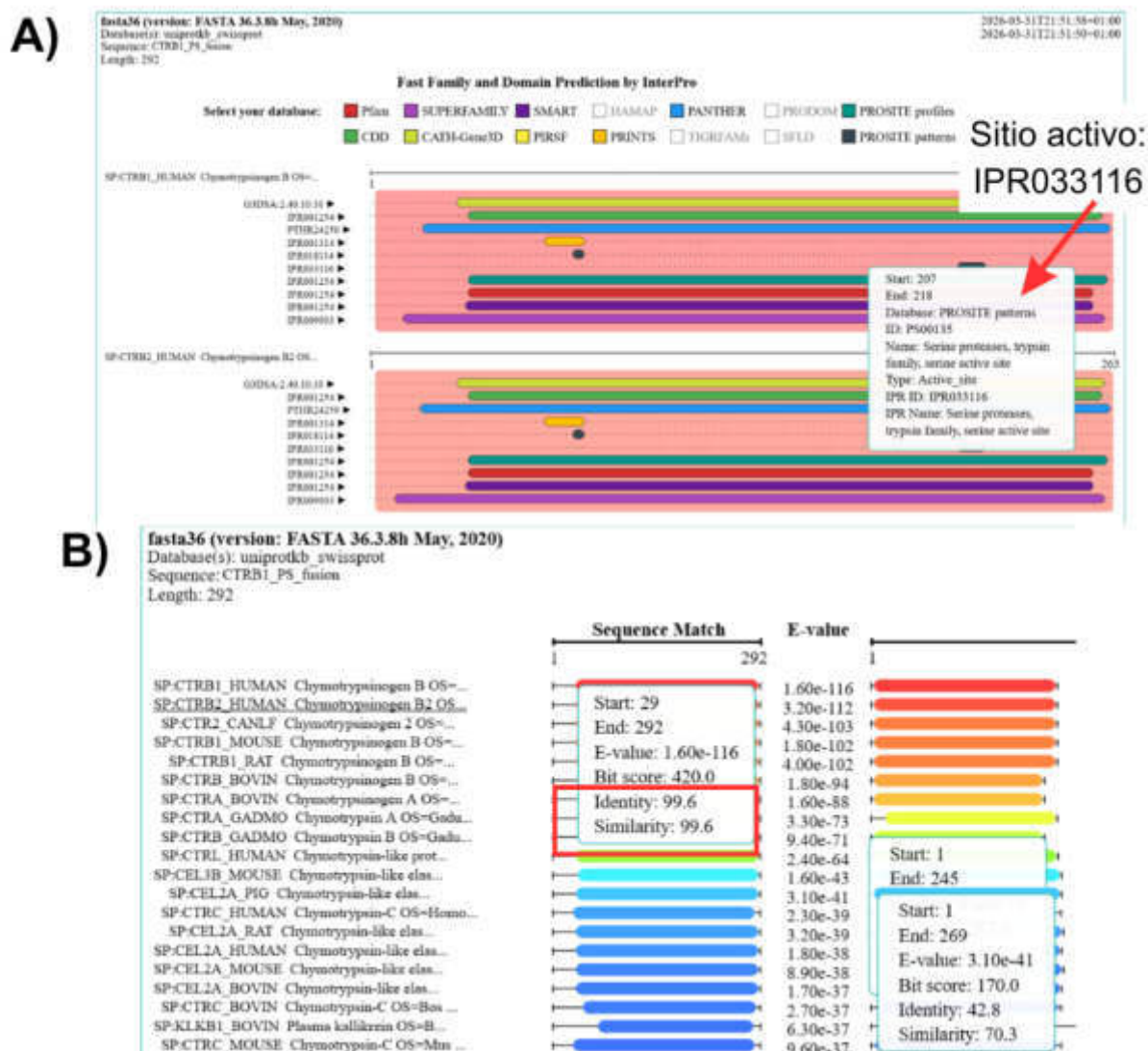


Figura 6. Validación funcional y de homología de la proteína CTRB1 recombinante. A) Predicción de dominios y firmas funcionales mediante FASTA36, integrando bases de datos como PROSITE, Pfam y otras plataformas incluidas en InterPro, donde se identifica el sitio activo característico de proteasas de serina tipo tripsina (IPR033116) localizado en la región caralítica de la proteína. B) Resultado del alineamiento de secuencia utilizando FASTA36 contra la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot mostrando una identidad del 99.6% con la proteína CTRB1 humana y en E-value altamente significativa.

3.1.3 Validación y Análisis estructural de la proteína CTRB1

Con el propósito de evaluar la confiabilidad estructural del modelo tridimensional de CTRB1 obtenido mediante AlphaFold, se realizó un análisis comparativo utilizando UCSF ChimeraX versión 1.7.1. El modelo fue alineado con la estructura cristalográfica de la α -quimotripsina humana (PDB ID: 1GCT) mediante la herramienta MatchMaker, obteniéndose un puntaje de alineamiento de secuencia de 584.2 y un valor de RMSD de 0.443 Å para 129 pares de átomos refinados (1.119 Å considerando los 131 pares de átomos), lo que indica una elevada similitud estructural entre ambas proteínas y respalda la confiabilidad del modelo predicho, (Figura 7 A).

Posteriormente, se analizó la organización del sitio activo del modelo (Tabla 6). Se identificó la tríada catalítica característica de las serinas proteasas, conformada por los residuos His75, Asp120 y Ser213, los cuales adoptan una disposición espacial compatible con el mecanismo catalítico descrito para esta familia enzimática. La representación tridimensional (Figura 7 B) permitió observar la aproximación de las cadenas laterales (grupos R) de estos residuos dentro del sitio activo, a pesar de encontrarse separados en la secuencia primaria de la proteína.

Finalmente, se determinaron las distancias entre los residuos catalíticos, obteniéndose valores de 2.716 Å entre His75 (ND1) y Asp120 (OD2), y 2.817 Å entre His75 (NE2) y Ser213 (OG). Estas distancias son consistentes con la geometría característica de la red de interacciones que estabiliza la tríada catalítica de las serinas proteasas, apoyando la conservación estructural del sitio activo en el modelo de CTRB1.

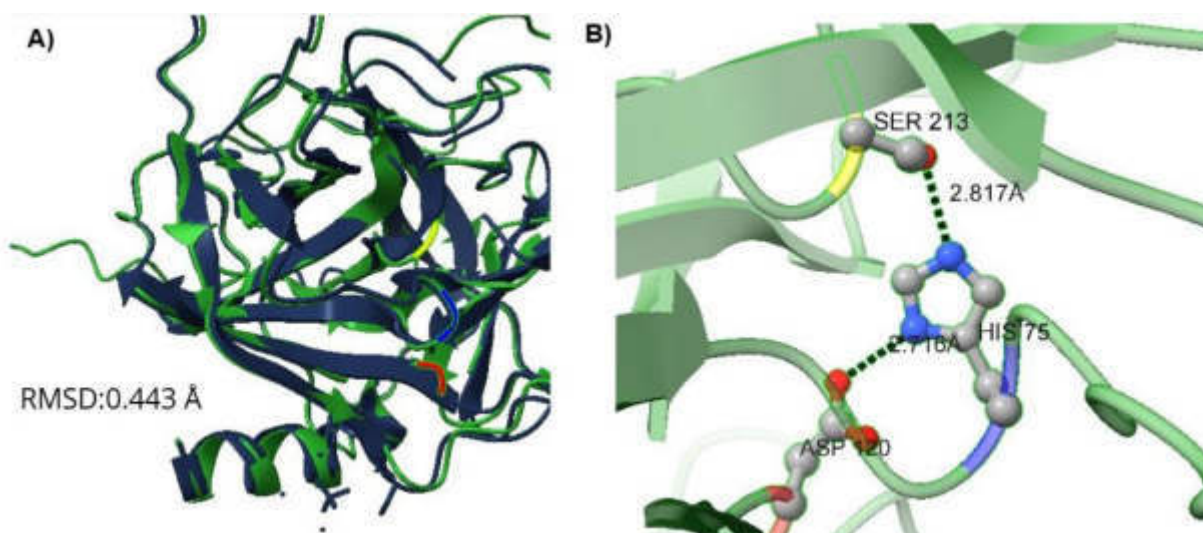


Figura 7. Validación estructural del modelo tridimensional de CTRB1 obtenido mediante AlphaFold. **A)** Superposición estructural entre el modelo de CTRB1 predicho por AlphaFold (verde) y la estructura cristalográfica de la α -quimotripsina humana (PDB: 1GCT, azul), obtenida mediante la herramienta MatchMaker de UCSF ChimeraX. **B)** Acercamiento al sitio activo del modelo de CTRB1 mostrando la tríada catalítica conformada por His75, Asp120 y Ser213. Los residuos se representan en ball-and-stick coloreados por elemento químico y las líneas punteadas indican las distancias entre His75 ND1–Asp120 OD2 (2.716 Å) y His75 NE2–Ser213 OG (2.817 Å).

Parámetro	Resultado
Modelo estructural	AlphaFold (UniProt P17538)
Estructura de referencia	PDB 1GCT
Sequence alignment score	584.2
RMSD (129 pares refinados)	0.443 Å
RMSD (131 pares)	1.119 Å
Tríada catalítica	His75–Asp120–Ser213
Distancia His75–Asp120	2.716 Å
Distancia His75–Ser213	2.817 Å
Longitud	263 aminoácidos
Cadenas	1
Átomos	1,944
pLDDT mínimo	41.0
pLDDT máximo	98.94
pLDDT promedio	91.75
Residuos >90	216 (82.13%)
Residuos 70-90	22 (8.37%)
Residuos 50-70	10 (3.80%)
Residuos ≤50	15 (5.70%)

Tabla 6. Parámetros estructurales de la proteína CTRB1 en UCSF ChimeraX versión 1.7.1.

3.1.4 Análisis *in silico* de la señal de secreción mediante SignalP

El análisis mediante SignalP 5.0 permitió evaluar el péptido señal Exp4 presente en la secuencia CTRB1 recombinante. Se observaron probabilidades (figura 8) correspondientes a diferentes rutas de secreción, incluyendo Sec/SPI (0.329), Tat/SPI (0.397) y lipoproteína (0.251).

Aunque los valores obtenidos no permiten asignar de forma clara un único tipo de señal, la presencia de una región N-terminal con características hidrofóbicas y el patrón de transición hacia la proteína madura son consistentes con la presencia de un péptido señal funcional.

Esto sugiere que la proteína recombinante puede ser reconocida por el sistema de secreción bacteriano, particularmente en organismos Gram positivos como *L. lactis*⁵⁹.

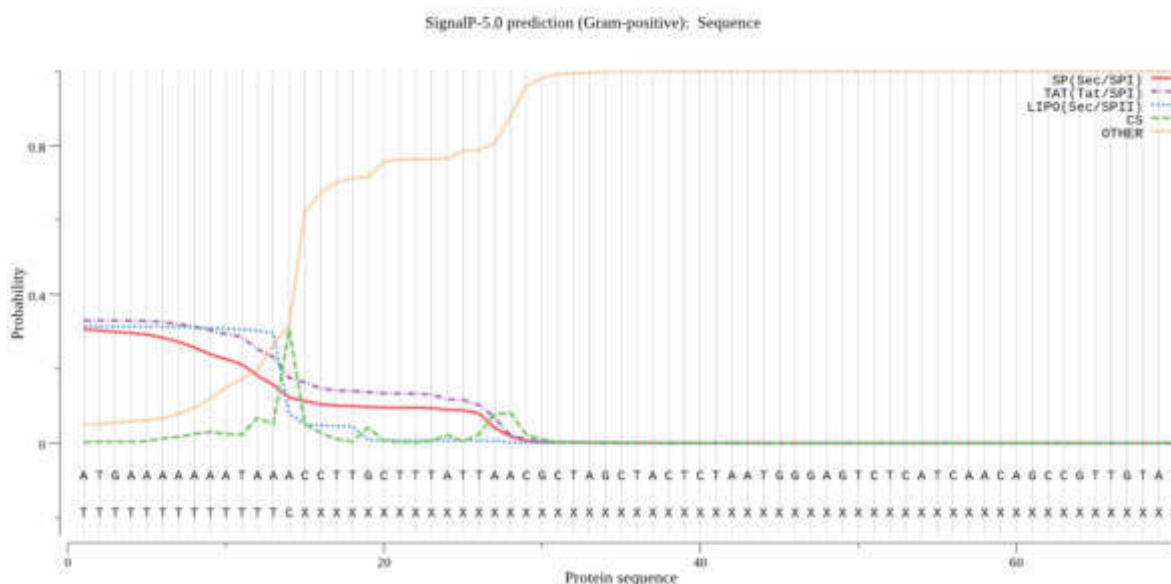


Figura 8. Predicción del péptido señal Exp4 de la proteína CTRB1 mediante SignalP 5.0

3.1.5 Diseño y evaluación *in silico* de los oligonucleótidos

Los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *CTRB1* (Tabla 6) presentaron longitudes de 23 nt para el primer forward y 28 nt para el primer reverse. El contenido de GC fue de 53.6% en el oligonucleótido forward y de 39.4% en el reverse. En términos generales, para el diseño de primers de PCR se recomiendan contenidos de GC cercanos a 40-60%, ya que ello favorece una hibridación más uniforme durante la etapa de alineamiento.

Primer	Secuencia (5'→3')	Longitud (nt)	%GC	T _m (C°)	ΔG Hairpin (kcal/mol)	ΔG Self dimer (kcal/mol)	ΔG Hetero-dimer (kcal/mol)
Forward	AAAACAGCAT	23	53.6	64.1	-4.78	-3.14	-5.09
CTRB1 (pFCTRB1)	CATGCGGAGTCCC						
Reverse	AAAACAATTCC	28	39.4	61.7	-0.44	-5.36	-5.09
CTRB1 (pRCTRB1)	ATCAGTTAGCAGCAAGA						

Tabla 7. Secuencias y características fisicoquímicas de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *CTRB1*.

En este contexto, el primer forward se encontró dentro del rango esperado, mientras que el reverse se presentó ligeramente inferior al valor de referencia, el cual se vio compensado por una mayor longitud total del oligonucleótido.

Las temperaturas de fusión calculadas en Benchling fueron de 64.1°C para el primer forward y de 61.7°C para el reverse, con una diferencia de 2.4°C entre ambos.

Esta proximidad térmica es compatible con un diseño adecuado del par de primers, ya que la literatura recomienda evitar diferencias amplias de T_m entre los oligonucleótidos

que participan en una misma reacción. Además, la temperatura de alineamiento empleada experimentalmente (61°C) fue empleada con el T_m menor al diseño, en concordancia con las recomendaciones metodológicas que sugieren iniciar la optimización de la PCR a una temperatura cercana pero ligeramente inferior al T_m del primer con menor valor.

El análisis de estructuras secundarias mostró que ambos oligonucleótidos presentan interacciones de baja estabilidad, con valores de ΔG que corresponden a hairpins y dímeros débiles. Aunque se detectaron posibles estructuras, no se observaron complementariedades relevantes en el extremo 3' que es el principal factor asociado a la formación de productos inespecíficos en PCR. Por ello, no se espera que estas interacciones afecten de manera significativa la amplificación bajo las condiciones empleadas.

En conjunto, los parámetros evaluados indican que el diseño del par de primers es adecuado para la amplificación de CTRB1. Si bien el primer reverse presenta un contenido de GC ligeramente menor al recomendado, la similitud en las temperaturas de fusión y su concordancia con la temperatura de alineamiento utilizada respaldan su correcto desempeño en el sistema experimental.

Los oligonucleótidos empleados para la confirmación del vector pLB333 fueron diseñados previamente en el laboratorio en el contexto de un proyecto paralelo, y fueron proporcionados para su uso en este estudio (Tabla 7).

Primer	Secuencia	Uso
Forward pLB333 (pFpLB333)	AAAACAGAATT CGCGGCCCGCC	Confirmación de vector
Reverse pLB333 (pRpLB333)	AAAAAATGCATCATCAG CAAATACAACGG	Confirmación de vector

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados para la confirmación del vector pLB333.

3.1.6 Construcción *in silico* del plásmido recombinante pLB333-CTRB1

Se realizó la construcción *in silico* del plásmido recombinante pLB333-CTRB1 mediante la plataforma Benchling, obteniendo una secuencia final de 3482 pb (Figura 9). El mapa plasmídico muestra la correcta inserción del gen *CTRB1* bajo el control del promotor pGroESL, así como la presencia de los elementos característicos del vector, incluyendo el gen de resistencia a cloranfenicol y las regiones de replicación.

Este análisis permitió verificar la orientación del inserto y la integridad de los elementos funcionales, confirmando la viabilidad del diseño previo a su ensamblaje experimental.

3.2 Clonación Molecular

3.2.1 Transformación de *Escherichia coli* DH5a con pUC57-CTRB1

El plásmido pUC57-CTRB1 fue recibido en forma liofilizada con una cantidad total de 4 µg. Tras su resuspensión en 40 µL de agua libre de nucleasas, se obtuvo una concentración final de 100 ng/µL.

A partir de esta preparación, se empleó una alícuota para la transformación en células *Escherichia coli* DH5a, obteniéndose colonias aisladas en medio selectivo, lo que indica una transformación exitosa (Figura 10).

Posteriormente, se seleccionó una colonia para su propagación y extracción de plásmido, obteniéndose ADN plasmídico con una concentración de 497 ng/µL.

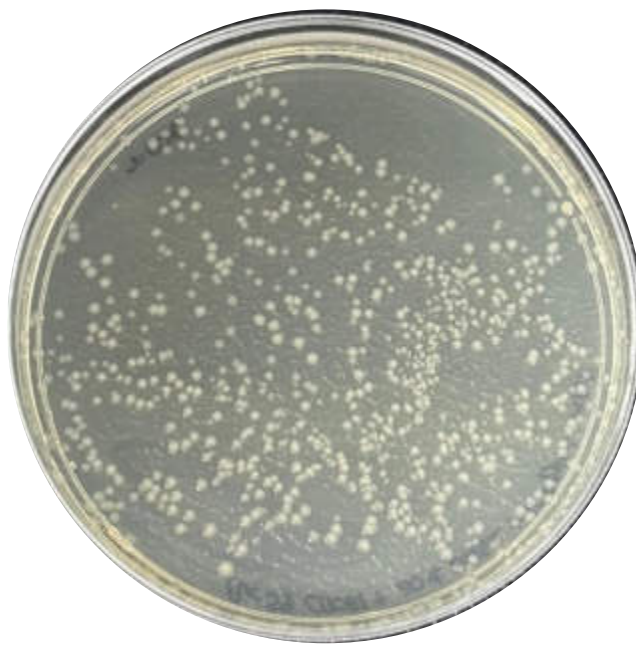


Figura 10. Colonias obtenidas tras la transformación de *E. coli DH5a* con el plásmido pUC57-CTRB1 en agar LB con ampicilina.

Con el objetivo de obtener el inserto correspondiente al gen *CTRB1*, se realizó una doble digestión enzimática del plásmido pUC57-CTRB1 con enzimas NsiI y EcoRI. El producto fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se procedió a la recuperación de la banda correspondiente al inserto.

Debido a la naturaleza del ADN y con el fin de evitar su degradación, la visualización del gel bajo luz UV se realizó de manera mínima y no se documentó mediante imagen, priorizando la integridad del material genético para su posterior uso experimental.

Como confirmación de la presencia del gen *CTRB1* en las colonias transformadas, se realizaron PCR utilizando cebadores específicos para el inserto previamente descritos. El producto amplificado mostró el tamaño esperado, confirmando la transformación de células *E. coli* portadoras de pUC57-CTRB1 (Figura 11).

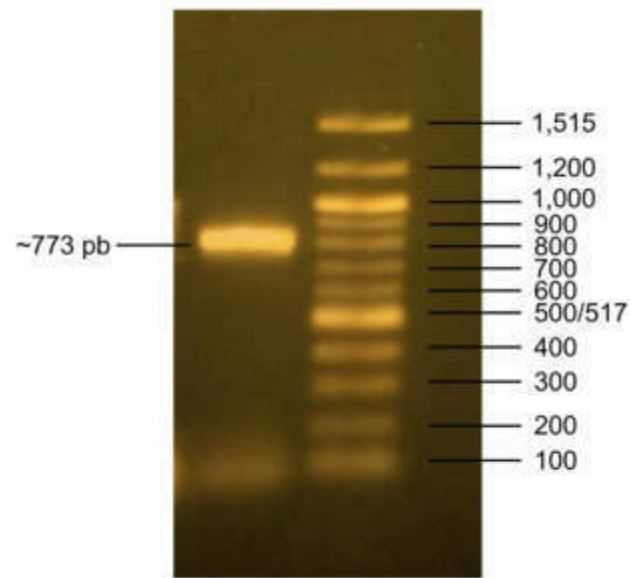


Figura 11. Amplificación del gen CTRB1 mediante PCR en gel agarosa 1%. Se observa una banda correspondiente al tamaño esperado del inserto de ~773 pb.

3.2.2 Construcción del plásmido recombinante pLB333-CTRB1

Una vez realizada la reactivación de la cepa *L. lactis* portadora del vector pLB333 y su posterior extracción de ADN plasmídico, el vector pLB333 fue sometido a doble digestión enzimática con NsiI y EcoRI previamente descrita, permitiendo la obtención de la banda correspondiente al vector linealizado, la cual fue recuperada mediante extracción de gel de agarosa. La concentración obtenida tras la purificación fue de aproximadamente 9 ng/ μ L, lo cual, aunque se obtuvo una concentración baja, se permitió continuar con la etapa de ligación.

Posteriormente, se llevó a cabo la ligación del inserto *CTRB1* con el vector pLB333, generando el constructo recombinante pLB333-*CTRB1*.

El producto de ligación fue introducido en células electrocompetentes mediante electroporación, obteniéndose colonias tras el periodo de incubación en medio selectivo, lo que sugiere la incorporación del pLB333 CTRB1 recombinante (Figura 12).



Figura 12. Colonias bacterianas obtenidas tras la transformación del constructo pLB333-CTRB1 recombinante en células electrocompetentes. La presencia de colonias en medio selectivo indica la incorporación exitosa del plásmido recombinante.

3.2.3 Confirmación del constructo pLB333-CTRB1 mediante PCR

A partir de colonias individuales, se realizó la propagación bacteriana y su conservación descrita previamente para realizar la extracción de ADN plasmídico.

La presencia del inserto fue evaluada mediante PCR utilizando cebadores específicos tanto para el gen *CTRB1* como para las regiones del vector, observándose productos de amplificación correspondientes a los tamaños esperados (figura 13 A) y B)).

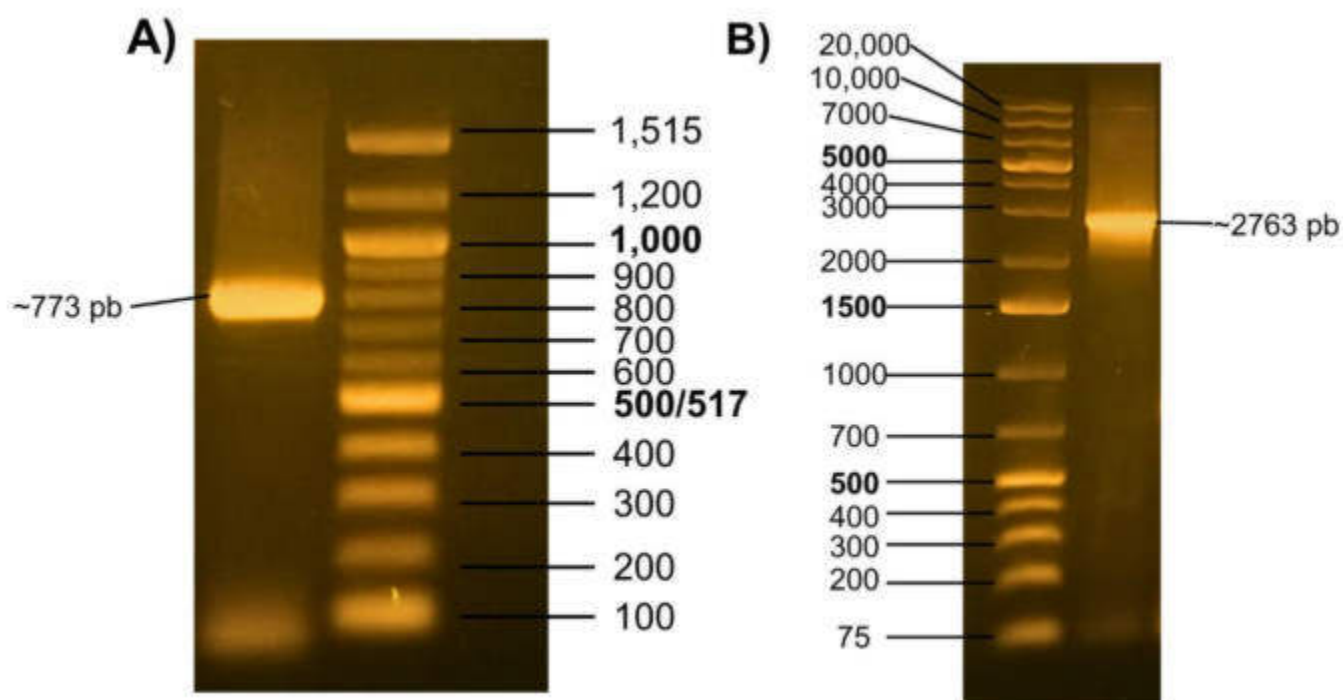


Figura 13. Verificación del inserto CTRB1 y del vector pLB333 mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. A) Producto de PCR del gen CTRB1 (~773 pb). B) Banda correspondiente al vector pLB333 (~2763 pb).

Posteriormente, con el fin de confirmar la correcta integración del inserto *CTRB1* dentro del vector pLB333, se realizó una PCR utilizando un cebador específico del gen *CTRB1* (primer FCTRB1) y un cebador complementario dirigido al vector (primer RpLB333).

Esta estrategia permitió amplificar un fragmento que abarca la unión inserto-vector, generando un producto correspondiente al tamaño total esperado del constructo recombinante (~3482 pb).

Debido a que el producto esperado correspondía a un fragmento de gran tamaño, fue necesario ajustar las condiciones de amplificación. En particular, se empleó una menor cantidad de ADN molde en comparación con PCR convencionales (aproximadamente 5–10 ng por reacción), lo cual favoreció la obtención de una banda específica. Asimismo, la temperatura de alineamiento se estableció en 64.5 °C, correspondiente a un valor intermedio entre las temperaturas de fusión (T_m) de los cebadores utilizados, permitiendo una adecuada hibridación de ambos oligonucleótidos.

Bajo estas condiciones, se obtuvo una banda única del tamaño esperado (~3482 pb), confirmando la correcta construcción del plásmido recombinante (Figura 14)

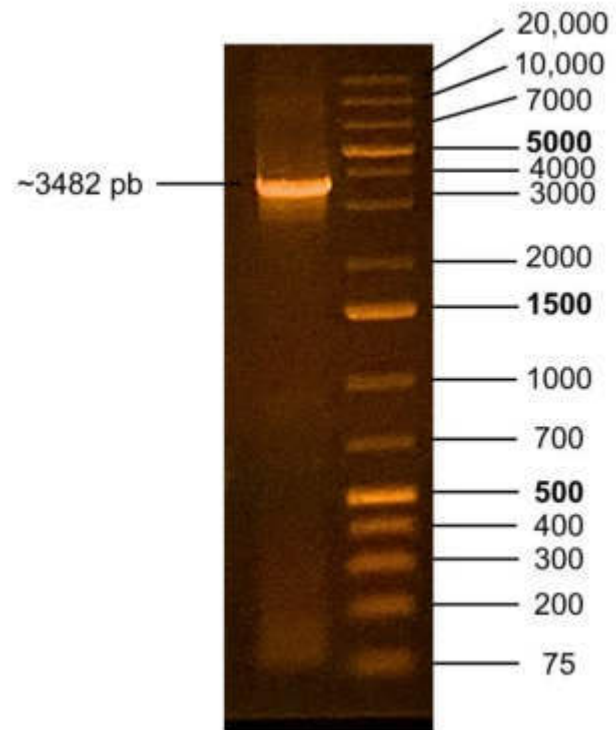


Figura 14. Verificación de la integración del gen CTRB1 en el vector pLB333 mediante PCR, en gel agarosa 1% (~3482 pb)

3.2.4 Confirmación del constructo pLB333-CTRB1 mediante secuenciación de Sanger

Para corroborar la identidad del constructo recombinante, la muestra enviada a secuenciar mediante la técnica de Sanger según el electroferograma obtenido presentó buena calidad de lectura y mostró concordancia con la secuencia esperada tanto del gen *CTRB1* como de la región de unión entre inserto y el vector, lo que respalda la correcta obtención del constructo en las regiones analizadas.

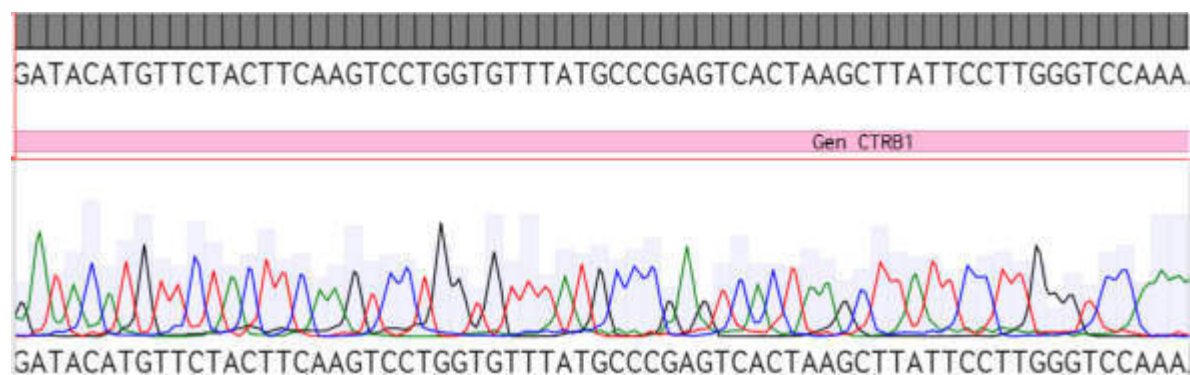


Figura 15. Electroferograma representativo de la secuenciación de Sanger del constructo pLB333-CTRB1 visualizado en la plataforma Benchling.

3.3 Expresión y análisis del quimiotripsinógeno recombinante

3.3.1 Análisis de la proteína CTRB1 recombinante mediante SDS PAGE

Se evaluó la expresión de las proteínas mediante SDS-PAGE. En el carril 1, correspondiente a la muestra de proteína recombinante CTRB1, se observó una banda en un rango aproximado de 25 kDa, consistente con el peso molecular esperado del CTRB1 recombinante (~26 kDa). Para este análisis se cargaron aproximadamente 20 µg de proteína total, determinada previamente mediante el ensayo BCA, a partir de cultivos inducidos durante 4 h a 37 °C.

En el carril 2 se incluyó como control positivo la proteína Exp4 correspondiente a la nucleasa presente originalmente en el vector, la cual presenta un peso molecular aproximado de 20 kDa, observándose una banda en la región esperada (Figura 16). En este caso, se cargó una cantidad equivalente de proteína total (22 µg) para permitir la comparación entre muestras.

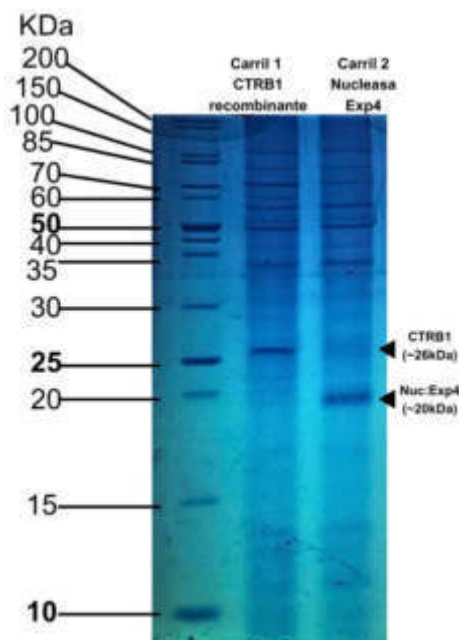


Figura 16. Análisis de la expresión de la proteína recombinante CTRB1 mediante SDS-PAGE al 12%. En el carril 1 se observa la proteína CTRB1 con un peso molecular aproximado de ~26kDa. En el carril 2 se muestra el control positivo correspondiente a la proteína Exp4.

3.4 Análisis de expresión e inmunodetección mediante Western Blot

Con el objetivo de verificar de manera específica la identidad del quimiotripsinógeno B1 (CTRB1) recombinante expresado en *L. lactis*, las muestras del sobrenadante concentradas mediante precipitación con TCA se analizaron mediante inmunodetección por Western Blot empleando un anticuerpo primario anti-CTRB1.

Tal como se muestra en la Figura 17 el inmunoensayo reveló una única banda definida en los tres carriles analizados, la cual migra a un peso molecular aproximado de 26 kDa, coincidente con el valor teórico de CTRB1. La ausencia de bandas inespecíficas o fragmentos de degradación demuestra la elevada especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo y la integridad de la proteína secretada.

Adicionalmente, la evaluación de un gradiente de proteína total (10 μ g, 15 μ g y 20 μ g) evidenció un incremento progresivo en la intensidad de la señal inmunorreactiva. Este comportamiento proporcional a la concentración confirma la detección específica de CTRB1 y respalda la calidad de la muestra obtenida.

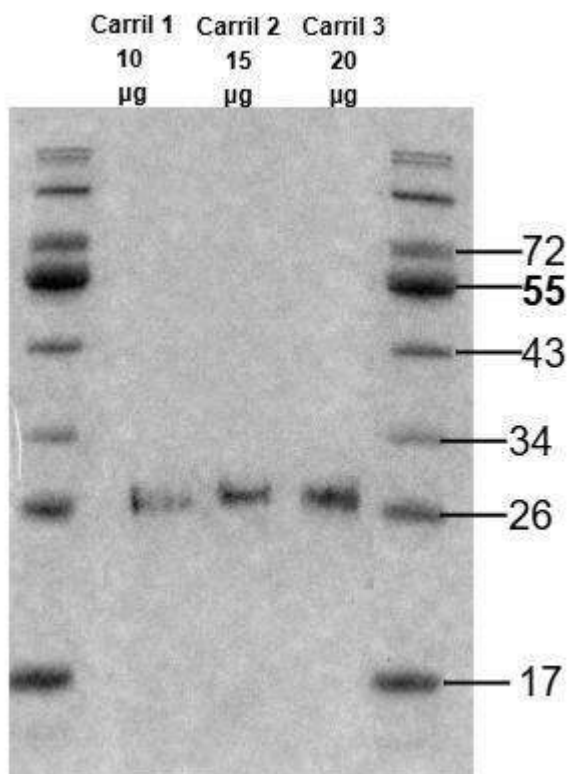


Figura 17. Inmunodetección de la proteína recombinante CTRB1 mediante Western Blot. Análisis de muestras del sobrenadante de cultivo de *Lactococcus lactis* concentradas con TCA a diferentes cantidades de proteína total. Carril 1: 10 µg; Carril 2: 15 µg; Carril 3: 20 µg. Las bandas observadas corresponden a una única señal inmunorreactiva específica alineada al peso molecular teórico de CTRB1 (~ 26 kDa). A los extremos se muestran los marcadores de peso molecular (kDa).

3.5 Evaluación de CTRB1 recombinante *in vitro* mediante ensayo enzimático

3.4.1 Ensayo enzimático de la proteína recombinante CTRB1

La actividad proteolítica de la proteína recombinante CTRB1 fue evaluada mediante un ensayo enzimático utilizando el sustrato BTEE, monitoreando el cambio en absorbancia a 256 nm a lo largo del tiempo.

Como se muestra en la Figura 17, correspondiente a las muestras tratadas mediante precipitación con ácido tricloroacético (TCA), la condición de CTRB1 activada presentó un incremento progresivo en la absorbancia conforme avanzó el tiempo de reacción, lo que indica la hidrólisis del sustrato y, por lo tanto, actividad enzimática funcional. En contraste, las condiciones correspondientes a CTRB1 inactiva y al control se mantuvieron prácticamente constantes durante todo el ensayo.

De manera similar, en la Figura 18, correspondiente al análisis del sobrenadante del cultivo bacteriano en medio M17, se observó la misma tendencia general. La muestra de CTRB1 activada mostró un incremento dependiente del tiempo, mientras que las condiciones inactiva y control no presentaron variaciones apreciables.

En este estudio, el control corresponde a la cepa de *L. lactis* portadora del plásmido pLB333 sin el inserto CTRB1, la cual expresa la proteína Exp4 (nucleasa) presente en el vector original. Esta condición fue sometida al mismo tratamiento de activación con tripsina que las muestras recombinantes, con el fin de descartar actividad proteolítica

inespecífica derivada del sistema de expresión, del medio de cultivo o del proceso de activación enzimática.

Es importante destacar que la diferencia entre ambas figuras radica en el método de preparación de las muestras. En la Figura 17 se utilizaron muestras sometidas a precipitación con TCA, lo que permite concentrar las proteínas y reducir la interferencia de componentes solubles del medio. Por otro lado, en la Figura 18 se empleó directamente el sobrenadante del cultivo en medio M17, el cual contiene tanto la proteína recombinante como otros componentes del medio de cultivo.

Esta diferencia metodológica se refleja en los valores de absorbancia obtenidos, siendo mayores en el sobrenadante en comparación con las muestras tratadas con TCA. No obstante, en ambos casos se conserva la misma tendencia, donde únicamente la condición de CTRB1 activada presenta un incremento dependiente del tiempo, lo que confirma que la actividad observada es consistente y atribuible a la proteína recombinante.

El análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores (adjunto en anexos B) reveló diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($p < 0.05$), así como una interacción significativa entre el tratamiento y el tiempo ($p < 0.05$), lo que indica que el incremento en la actividad enzimática depende tanto del estado de la proteína como del tiempo de reacción.

En conjunto, estos resultados confirman que la proteína recombinante CTRB1 expresada es funcional y capaz de llevar a cabo actividad proteolítica bajo las condiciones

evaluadas, tanto en muestras tratadas con TCA como en el sobrenadante del cultivo.

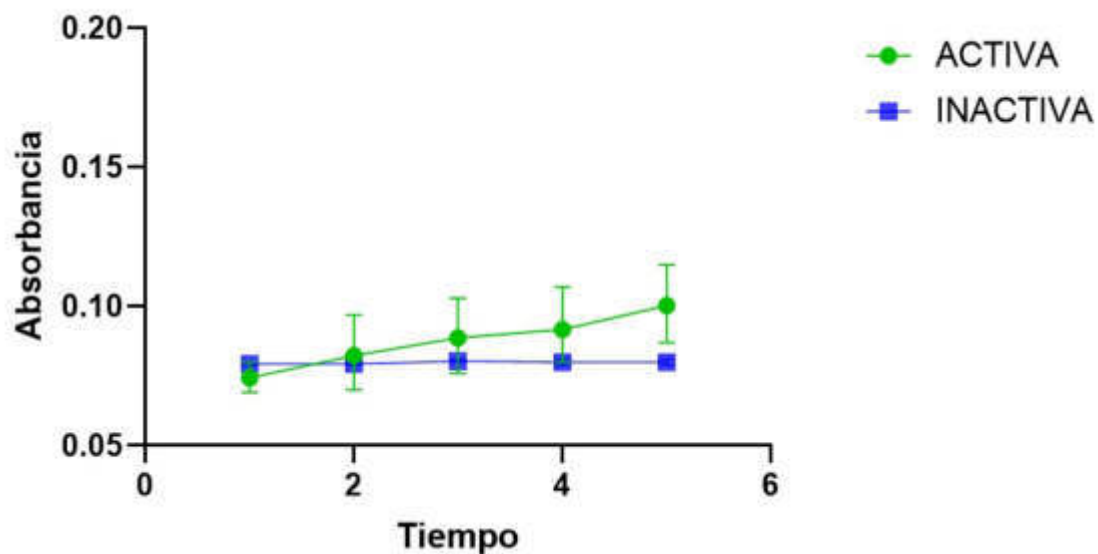


Figura 17. Evaluación de la actividad enzimática de CTRB1 recombinante mediante ensayo con BTEE en muestras tratadas con TCA. os valores representan el promedio de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar

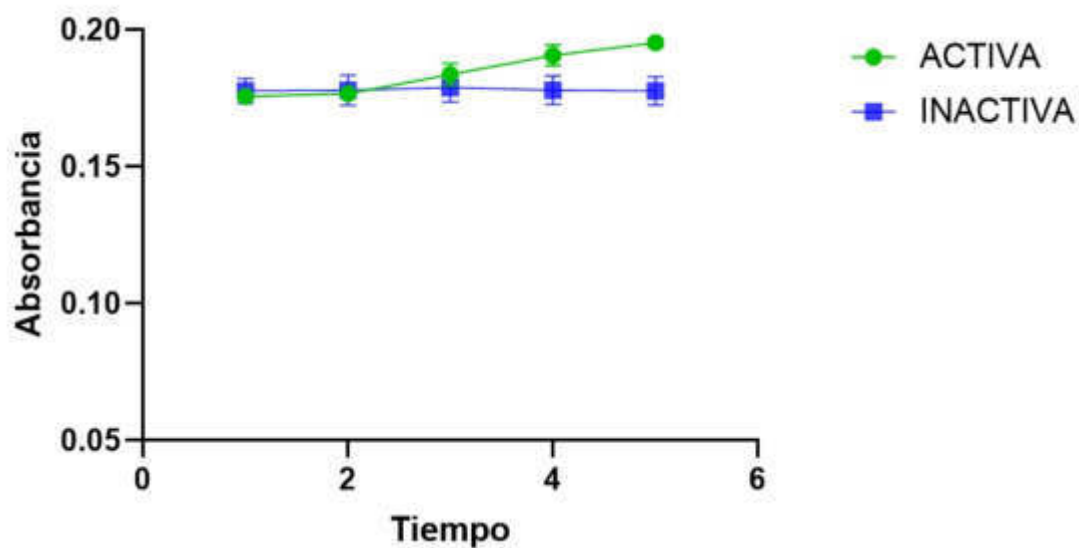


Figura 18. Evaluación de la actividad enzimática de CTRB1 en el sobrenadante del cultivo bacteriano mediante ensayo con BTEE. os valores representan el promedio de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar

CAPÍTULO 4

4 DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue expresar de forma heteróloga el quimiotripsinógeno humano CTRB1 en *L. lactis* y evaluar su funcionalidad mediante un enfoque integrado que combinó herramientas bioinformáticas, validación molecular y análisis experimental.

En el diseño *in silico*, las herramientas InterPro, FASTA36 y UCSF Chimera confirmaron que la secuencia conserva la estructura y los sitios clave de las serin proteasas. La identificación de la tríada catalítica (His58, Asp103 y Ser196) y su correcta disposición espacial indican que la proteína recombinante mantiene el potencial catalítico. Este hallazgo coincide con la caracterización de quimiotripsinas pancreáticas descrita por Wang et al. (2011), donde la conservación de la geometría de la tríada y del bolsillo de especificidad S1 se relaciona directamente con la actividad enzimática y la estabilización del estado de transición.

Por otro lado, el análisis con SignalP identificó una región N-terminal compatible con un péptido señal. La variabilidad observada en la predicción entre distintos tipos de señal es habitual en bacterias Grampositivas. En este contexto, el uso del vector pLB333 con el

péptido señal Exp4 sistema desarrollado por el Dr. Luis Bermúdez-Humarán resultó efectivo para dirigir la secreción de proteínas heterólogas en *L. lactis*. Como han documentado Bermúdez-Humarán y colaboradores en bacterias ácido-lácticas (BAL), los péptidos señal optimizados facilitan la translocación y el procesamiento de proteínas complejas hacia el medio extracelular, lo que evita su acumulación o degradación dentro de la célula.

En la fase experimental, la construcción del plásmido recombinante pLB333-CTRB1 se verificó mediante PCR, electroforesis en gel de agarosa y secuenciación Sanger. La coincidencia entre los tamaños teóricos y los obtenidos en gel, junto con la calidad de los cromatogramas, confirma la correcta clonación del gen en el vector. Esta validación es fundamental, ya que, como señalan Wang et al. (2011), la precisión de la secuencia recombinante es determinante para evitar alteraciones en la traducción o en el plegamiento proteico.

La expresión de CTRB1 se analizó inicialmente por SDS-PAGE, detectando una banda de aprox. 26 kDa, correspondiente al peso molecular teórico del precursor inactivo de CTRB1 humano. Para confirmar la identidad de la proteína y descartar interferencias con el perfil proteico nativo de *L. lactis*, se realizó un Western Blot con un anticuerpo primario específico anti-CTRB1. Se obtuvo una única banda específica a ~26 kDa, con un patrón de reconocimiento similar al reportado por Wang et al. (2011) para quimiotripsinas recombinantes. Además, la evaluación de un gradiente de proteína total (10 µg, 15 µg y 20 µg) mostró un incremento proporcional en la intensidad de la señal, lo que confirma la especificidad del ensayo y la integridad de la proteína secretada sin degradación proteolítica previa.

La funcionalidad de la enzima se evaluó mediante un ensayo catalítico con BTEE como sustrato sintético específico. Se observó un incremento progresivo en la absorbancia únicamente cuando CTRB1 fue activada con tripsina, mientras que la forma inactiva y los controles no mostraron cambios. Este resultado refleja la cascada de activación característica de las proteasas pancreáticas (Wang et al., 2011), donde el corte proteolítico N-terminal genera el cambio conformacional necesario para estructurar el sitio activo. Por tanto, la actividad detectada demuestra que la proteína producida en el sistema *L. lactis* / pLB333 no solo se secretó correctamente, sino que conservó la capacidad de activarse de forma funcional.

El análisis estadístico (ANOVA de dos factores con repeticiones) mostró diferencias significativas entre tratamientos y una interacción significativa entre el tiempo de incubación y el estado de activación ($p < 0.05$). Este comportamiento es coherente con una cinética de hidrólisis enzimática, donde la conversión de sustrato avanza proporcionalmente en los primeros minutos de la reacción.

Dado que la evaluación enzimática se realizó a una sola concentración de sustrato, el ensayo tiene un carácter cualitativo/semicuantitativo y no permite determinar parámetros cinéticos de estado estacionario (K_m o V_{max}). Sin embargo, al igual que en estudios previos de expresión de proteasas pancreáticas (Wang et al., 2011), estos datos son suficientes para confirmar la capacidad catalítica de la enzima recombinante.

En conjunto, este trabajo valida a *Lactococcus lactis* y al sistema pLB333 de Bermúdez-Humarán como una plataforma viable, segura (GRAS) y eficiente para la producción de proteasas humanas funcionales.

CAPÍTULO 5

5 CONCLUSIONES

- Se diseñó y validó *in silico* del gen *CTRB1*, confirmando la conservación de los elementos estructurales y funcionales característicos de las serin proteasas.
- Se construyó exitosamente el plásmido recombinante pLB333-CTRB1, verificando la correcta integración del inserto mediante PCR, electroforesis y secuenciación Sanger.
- Se demostró la expresión de la proteína recombinante en *Lactococcus lactis*, observándose una banda con el peso molecular esperado (~26 kDa) mediante SDS-PAGE.
- Se confirmó la identidad y especificidad de CTRB1 mediante inmunodetección por Western Blot, observándose una señal única a ~26 kDa cuya intensidad aumentó de forma proporcional a la cantidad de proteína cargada.
- La proteína recombinante CTRB1 mostró actividad enzimática tras su activación, evidenciada mediante el ensayo con BTEE.

- El análisis estadístico confirmó diferencias significativas entre las condiciones evaluadas, validando la funcionalidad de la proteína producida.
- El uso del péptido señal Exp4 permitió la expresión de la proteína recombinante en *Lactococcus lactis*, evidenciando su utilidad como alternativa para sistemas de secreción en este organismo.
- En conjunto, los resultados demuestran la viabilidad de expresar quimiotripsinógeno humano recombinante en *Lactococcus lactis* mediante el sistema propuesta.

CAPÍTULO 6

6 PERSPECTIVAS

El presente estudio establece una base sólida para la producción de quimiotripsinógeno recombinante en *Lactococcus lactis*, lo que abre diversas líneas de investigación futuras.

Como siguiente etapa, se propone la purificación a homogeneidad de la proteína recombinante para realizar análisis detallados de su estructura y estado de plegamiento.

Asimismo, se plantea llevar a cabo ensayos cinéticos a distintas concentraciones de sustrato para determinar los parámetros K_m y V_{max} , permitiendo caracterizar con precisión la eficiencia catalítica de la enzima frente a la variante nativa.

Otra línea prioritaria consiste en evaluar y cuantificar la eficiencia de secreción del sistema, así como comparar el desempeño del péptido señal Exp4 con otros ampliamente utilizados en bacterias lácticas, como Usp45, para optimizar los rendimientos de producción.

Finalmente, explorar el potencial biotecnológico y terapéutico del quimiotripsinógeno recombinante en modelos relacionados con insuficiencia pancreática, lo que podría contribuir al desarrollo de estrategias para el tratamiento de enfermedades como la fibrosis quística.

REFERENCIAS

1. Fox, S. I. *Fisiología Humana*. (McGraw-Hill Interamericana, 2014).
2. Clemente-Suárez, V. J. *et al.* Epithelial Transport in Disease: An Overview of Pathophysiology and Treatment. *Cells* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cells12202455> (2023).
3. Alam, S., Doherty, E., Ortega-Prieto, P., Arizanova, J. & Fets, L. Membrane transporters in cell physiology, cancer metabolism and drug response. *DMM Disease Models and Mechanisms* vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.1242/dmm.050404> (2023).
4. Sauliusssatkauskas, J. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology Transport Across Natural and Modii Ed Biological Membranes and Its Implications in Physiology and Therapy*. <http://www.springer.com/series/102>.
5. De Boeck, K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics* vol. 109 893–899 Preprint at <https://doi.org/10.1111/apa.15155> (2020).
6. Imperlini, E. & Papa, R. Clinical Advances in Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Medicine* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/jcm11216306> (2022).
7. Alam, A. & Locher, K. P. Structure and Mechanism of Human ABC Transporters. *Annual Review of Biophysics* Downloaded from www.annualreviews.org. Guest <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-111622> (2025) doi:10.1146/annurev-biophys-111622.

8. Tarling, E. J., Vallim, T. Q. de A. & Edwards, P. A. Role of ABC transporters in lipid transport and human disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism* vol. 24 342–350 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.01.006> (2013).
9. Wong-Jaén, M. *et al.* Trasplante pulmonar en México en tiempo de pandemia por COVID-19. *Revista Mexicana de Cirugía Torácica General* **1**, 67–72 (2020).
10. Thavamani, A., Salem, I., Sferra, T. J. & Sankararaman, S. Impact of altered gut microbiota and its metabolites in cystic fibrosis. *Metabolites* vol. 11 1–22 Preprint at <https://doi.org/10.3390/metabo11020123> (2021).
11. *INFERTILIDAD MASCULINA MALE INFERTILITY.*
12. Wilkens, S. Structure and mechanism of ABC transporters. *Fl000Prime Rep.* **7**, (2015).
13. Theodoulou, F. L. & Kerr, I. D. ABC transporter research: Going strong 40 years on. *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 1033–1040 (2015).
14. Wilkens, S. Structure and mechanism of ABC transporters. *Fl000Prime Rep.* **7**, (2015).
15. Hernandez-Valdes, J. A., Huang, C., Kok, J. & Kuipers, O. P. Another Breaker of the Wall: the Biological Function of the Usp45 Protein of *Lactococcus lactis*. <https://doi.org/10.1128/AEM> (2020) doi:10.1128/AEM.
16. Cantú-Reyna, C., Galindo-Ramírez, R., Vázquez-Cantú, M., Haddad-Talancón, L. & García-Muñoz, W. Frequency of allele variations in the CFTR gene in a Mexican population. *BMC Med. Genomics* **14**, (2021).
17. Luis Lezana Fernández Dra Adriana Bustamante Sáenz Jesús Elías Ovando Fonseca Rodolfo Boites Velarde Héctor Hernán Ruiz Gutiérrez, J. *Fibrosis Quística*.

18. Bousoño García, C. *et al.* Fibrosis quística. Aspectos digestivos y nutricionales. www.aeped.es/protocolos/.
19. Luis Lezana Fernández Dra Adriana Bustamante Sáenz Jesús Elías Ovando Fonseca Rodolfo Boites Velarde Héctor Hernán Ruiz Gutiérrez, J. *Fibrosis Quística*.
20. Bhattacharya, R., Blankenheim, Z., Scott, P. M. & Cormier, R. T. CFTR and Gastrointestinal Cancers: An Update. *Journal of Personalized Medicine* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/jpm12060868> (2022).
21. Somaraju, U. R. R. & Solis-Moya, A. Pancreatic enzyme replacement therapy for people with cystic fibrosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* vol. 2020 Preprint at <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008227.pub4> (2020).
22. Óscar Fielbaum, D. R. *MANEJO ACTUAL DE LA FIBROSIS QUÍSTICA UPDATED TREATMENT OF CYSTIC FIBROSIS*.
23. Naehrlich, L. The changing face of cystic fibrosis and its implications for screening. *International Journal of Neonatal Screening* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.3390/IJNS6030054> (2020).
24. Vargas-Roldán, S. Y. *et al.* Cystic fibrosis: bacterial pathogenesis and CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) modulators. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **79**, 215–221 (2022).
25. Jennerich, A. L. *et al.* Low body mass index as a barrier to lung transplant in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* **21**, 475–481 (2022).
26. Alam, S., Doherty, E., Ortega-Prieto, P., Arizanova, J. & Fets, L. Membrane transporters in cell physiology, cancer metabolism and drug response. *DMM*

Disease Models and Mechanisms vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.1242/dmm.050404> (2023).

27. Noël, S. & Sermet-Gaudelus, I. Mucoviscidosis: fisiopatología, genética, aspectos clínicos y terapéuticos. *EMC Pediatr.* **55**, 1–23 (2020).
28. Feldman, M., Friedman, L. S. (Lawrence S. & Brandt, L. J. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease : Pathophysiology/Diagnosis/Management.*
29. Myerburg, M. M. *et al.* Airway surface liquid volume regulates ENaC by altering the serine protease-protease inhibitor balance: A mechanism for sodium hyperabsorption in cystic fibrosis. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 27942–27949 (2006).
30. Angyal, D., Bijvelds, M. J. C., Bruno, M. J., Peppelenbosch, M. P. & de Jonge, H. R. Bicarbonate transport in cystic fibrosis and pancreatitis. *Cells* **11**, (2022).
31. Claudia Defilippi, D. G., Valentina Salvador, D. U. & Andrés Larach, D. K. *DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA CONSTIPACIÓN CRÓNICA DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CHRONIC CONSTIPATION.*
32. 1-s2.0-S0716864015000620-main.
33. Bustamante, A. E., Fernández, L. T., Rivas, L. C. & Mercado-Longoria, R. Disparities in cystic fibrosis survival in Mexico: Impact of socioeconomic status. *Pediatr. Pulmonol.* **56**, 1566–1572 (2021).
34. Costaguta, G., Patey, N. & Álvarez, F. Cystic fibrosis liver disease in children – A review of our current understanding. *Arch. Argent. Pediatr.* **121**, (2023).

35. Gartner, S., Mondéjar-López, P. & Asensio de la Cruz, Ó. Follow-up protocol of patients with cystic fibrosis diagnosed by newborn screening. *An. Pediatr. (Engl. Ed)*. **90**, 251.e1-251.e10 (2019).
36. Noël, S. & Sermet-Gaudelus, I. Mucoviscidosis: fisiopatología, genética, aspectos clínicos y terapéuticos. *EMC Pediatr*. **55**, 1–23 (2020).
37. Kunji, E. R. S., Slotboom, D. J. & Poolman, B. Lactococcus lactis as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* vol. 1610 97–108 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00712-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00712-5) (2003).
38. van Gijtenbeek, L. A., Robinson, A., van Oijen, A. M., Poolman, B. & Kok, J. On the Spatial Organization of mRNA, Plasmids, and Ribosomes in a Bacterial Host Overexpressing Membrane Proteins. *PLoS Genet*. **12**, (2016).
39. Song, A. A. L., In, L. L. A., Lim, S. H. E. & Rahim, R. A. A review on Lactococcus lactis: From food to factory. *Microbial Cell Factories* vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0669-x> (2017).
40. Frelet-Barrand, A. Lactococcus lactis, an Attractive Cell Factory for the Expression of Functional Membrane Proteins. *Biomolecules* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biom12020180> (2022).
41. Baeshen, M. N. *et al*. Production of biopharmaceuticals in E. Coli: Current scenario and future perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology* vol. 25 953–962 Preprint at <https://doi.org/10.4014/jmb.1412.12079> (2015).

42. Desmond, C., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. & Ross, R. P. Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5929–5936 (2004).
43. van den Berg, B. ; C. W. M. ; C. I. ; M. Y. ; H. E. ; H. S. C. ; R. T. A. Structure and function of the bacterial Sec translocon. *Mol. Membr. Biol.* **23**, 387–394 (2006).
44. Bode, W. ; M. I. ; B. U. ; H. R. ; S. S. R. ; H. J. The refined 1.9-Å crystal structure of human α -thrombin: Interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 16647–16657 (1998).
45. Breyton, C. ; H. W. ; R. T. A. ; K. W. ; C. I. Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* **418**, 334–341 (2002).
46. *S371 (c)(1)*. (2012).
47. *S371 (c)(1)*. (2012).
48. Luis Lezana Fernández Dra Adriana Bustamante Sáenz Jesús Elías Ovando Fonseca Rodolfo Boites Velarde Héctor Hernán Ruiz Gutiérrez, J. *Fibrosis Quística*.
49. Jennerich, A. L. *et al.* Low body mass index as a barrier to lung transplant in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* **21**, 475–481 (2022).
50. Luis Lezana Fernández Dra Adriana Bustamante Sáenz Jesús Elías Ovando Fonseca Rodolfo Boites Velarde Héctor Hernán Ruiz Gutiérrez, J. *Fibrosis Quística*.
51. Méndez López, I. & Etxeberria Lekuona, D. Organización del trabajo de las interconsultas recibidas desde servicios quirúrgicos en los servicios de medicina interna. *Revista Clinica Espanola* vol. 211 61–63 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.rce.2010.05.021> (2011).

52. Betiku, E. Molecular Chaperones involved in Heterologous Protein Folding in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Molecular Biology Review* **1**, 66–75 (2006).
53. Wang, H., Yuan, D., Xu, R. & Chi, C. W. Purification, cDNA cloning, and recombinant expression of chymotrypsin C from porcine pancreas. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **43**, 568–575 (2011).
54. Singh, S. K. *et al.* Lactococcus lactis provides an efficient platform for production of disulfide-rich recombinant proteins from Plasmodium falciparum. *Microb. Cell Fact.* **17**, (2018).
55. van Gijtenbeek, L. A., Robinson, A., van Oijen, A. M., Poolman, B. & Kok, J. On the Spatial Organization of mRNA, Plasmids, and Ribosomes in a Bacterial Host Overexpressing Membrane Proteins. *PLoS Genet.* **12**, (2016).
56. Jacouton, E. *et al.* Anti-tumoral effects of recombinant lactococcus lactis strain secreting IL-17A cytokine. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
57. Duarte, S. O. D. & Monteiro, G. A. Plasmid replicons for the production of pharmaceutical-grade pDNA, proteins and antigens by lactococcus lactis cell factories. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22 1–30 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms22031379> (2021).
58. Singh, S. K. *et al.* The Plasmodium falciparum circumsporozoite protein produced in Lactococcus lactis is pure and stable. *Journal of Biological Chemistry* **295**, 403–414 (2020).
59. Le Loir, Y. *et al.* Protein secretion in Lactococcus lactis: An efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microbial Cell Factories* vol. 4 Preprint at <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-2> (2005).

Anexos A

Preparación de soluciones y buffers

1. Preparación de buffer TAE 50X

Composición para 1 L de solución 50X:

Tris base: 242 g

Ácido acético glacial: 57.1 mL

EDTA 0.5 M (pH 8.0): 100 mL

Agua destilada: ajustar a 1 L

Preparación:

Disolver el Tris base en aproximadamente 700 mL de agua destilada.

Añadir el ácido acético glacial bajo agitación.

Incorporar el EDTA 0.5 M (pH 8.0).

Ajustar el volumen final a 1 L con agua destilada.

Mezclar completamente y almacenar a temperatura ambiente.

Uso:

Diluir a 1X para electroforesis de ADN.

2. Preparación de gel de agarosa (1%)

Para 30 mL:

Agarosa: 0.3 g

Buffer TAE 1X: 100 mL

Preparación:

Mezclar la agarosa con el buffer TAE 1X.

Calentar en microondas hasta completa disolución.

Dejar enfriar ligeramente y añadir el colorante intercalante.

Verter en el molde con el peine y dejar solidificar.

3. Preparación de buffer de corrida SDS-PAGE (1X)

Para 1 L:

Tris base: 3.03 g (25 mM)

Glicina: 14.4 g (192 mM)

SDS: 1 g (0.1%)

Agua destilada: ajustar a 1 L

Preparación:

Disolver todos los componentes en agua destilada.

Mezclar hasta completa disolución.

No es necesario ajustar pH.

Anexos B

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
Activo T1	0.069	0.074	0.08
Inactivo T1	0.08	0.079	0.079
Activo T2	0.07	0.08	0.097
Inactivo T2	0.08	0.079	0.079
Activo T3	0.076	0.087	0.103
Inactivo T3	0.081	0.08	0.08
Activo T4	0.08	0.088	0.107
Inactivo T4	0.081	0.08	0.079
Activo T5	0.087	0.099	0.115
Inactivo T5	0.081	0.08	0.079

Tabla Anexo B1. Valores de absorbancia obtenidos durante el ensayo enzimático con BTEE en muestras tratadas mediante precipitación con TCA. Se presentan tres repeticiones experimentales (Prueba 1-3) para cada condición evaluada: CTRB1 activa e inactiva en distintos tiempos de reacción (T1-T5). Los datos corresponden a mediciones directas de absorbancia sin corrección por blanco.

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
Activo T1	0.176	0.175	0.176
Inactivo T1	0.182	0.173	0.178
Activo T2	0.177	0.176	0.177
Inactivo T2	0.183	0.172	0.179
Activo T3	0.183	0.188	0.18
Inactivo T3	0.183	0.173	0.181
Activo T4	0.188	0.195	0.189
Inactivo T4	0.182	0.172	0.18
Activo T5	0.194	0.197	0.195
Inactivo T5	0.182	0.172	0.179

Tabla Anexo B2. Valores de absorbancia obtenidos durante el ensayo enzimático con BTEE en el sobrenadante del cultivo bacteriano. Se muestran tres repeticiones experimentales (Prueba 1-3) para cada condición evaluada: CTRB1 activa e inactiva en diferentes tiempos de reacción (T1-T5). Los datos corresponden a mediciones directas de absorbancia sin corrección por blanco.

Análisis de varianza de dos factores del ensayo enzimático

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo						
RESUMEN	Activo	Inactivo	Control	Total		
<i>Prueba 1</i>						
Cuenta	5	5	5	15		
Suma	0.382	0.403	0.38	1.165		
Promedio	0.0764	0.0806	0.076	0.07766667		
Varianza	5.53E-05	3E-07	0	2.0524E-05		
<i>Prueba 2</i>						
Cuenta	5	5	5	15		
Suma	0.428	0.398	0.375	1.201		
Promedio	0.0856	0.0796	0.075	0.08006667		
Varianza	0.0000883	3E-07	0	4.5495E-05		
<i>Prueba 3</i>						
Cuenta	5	5	5	15		
Suma	0.502	0.396	0.38	1.278		
Promedio	0.1004	0.0792	0.076	0.0852		
Varianza	0.0001728	0.0000002	0	0.00017503		
<i>Total</i>						
Cuenta	15	15	15			
Suma	1.312	1.197	1.135			
Promedio	0.08746667	0.0798	0.07566667			
Varianza	0.00019512	6E-07	2.38095E-07			
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Medio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	0.00044431	2	0.000222156	6.30327869	0.004497151	3.259446306
Columnas	0.00107551	2	0.000537756	15.2578815	1.58782E-05	3.259446306
Interacción	0.00103036	4	0.000257589	7.30863808	0.000204311	2.633532094
Dentro del grupo	0.0012688	36	3.52444E-05			
Total	0.00381898	44				