



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

**“Producción y estandarización de la purificación del polipéptido F1 de *Rubulavirus porcino* en levadura”**

Tesis para obtener el título de  
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Xiadani Edén Susano Hernández

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Irma Herrera Camacho

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular

Centro de Química ICUAP



Noviembre 2025

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Química del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo la dirección de la Dra. Irma Herrera Camacho.

Agradezco profundamente a la Dra. Irma, por su guía generosa, su paciencia incansable y su compromiso constante durante cada etapa de este trabajo. Gracias por exigirme, por confiar en mis capacidades y por acompañarme con rigor y empatía en este proceso de formación académica y personal. Su ejemplo, tanto profesional como humano, ha dejado una huella significativa en mi camino.

A Dalia, mi compañera de laboratorio, por estar siempre dispuesta a compartir sus conocimientos, aclarar mis dudas y tender una mano en los momentos más desafiantes del trabajo experimental. Tu apoyo no solo facilitó mi aprendizaje, sino que hizo que el camino fuera más llevadero y enriquecedor. Gracias por tu paciencia y amistad sincera.

Este trabajo de tesis fue apoyado financieramente por:

- Fondo FONSEC-SAGARPA-CONACYT. PROYECTO FONSEC 2017-6-292826. Aprobado en agosto-2023 hasta 2023. Convenio INIFAP-SADER-BUAP.
- Instituto de Ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla, con fondos internos.

Becas para estudiantes:

Agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP (VIEP) por el apoyo otorgado a mi persona en el Programa “Haciendo Ciencia, primavera 2023”.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios, por ser mi refugio y mi guía en todo momento. Gracias por darme la sabiduría, la paciencia y la fortaleza necesaria para culminar este trabajo. En cada dificultad encontré consuelo, y en cada logro, motivos para agradecerte.

A mamá y papá, por enseñarme a volar con los pies en la tierra y el corazón en alto. Su amor, sacrificio y fe incondicional han sido el sustento de mis primeros sueños y hoy son el pilar sobre el que se alzan mis logros. Ningún logro me pertenece por completo, porque cada página de esta tesis está escrita con la paciencia, el esfuerzo y los valores que me inculcaron desde siempre. Este logro es tan suyo como mío.

A ti, hermana, que has sido testigo silenciosa y cómplice de este viaje. Que mi paso por esta meta sea solo señal de que todo es posible con entrega y pasión. Tu historia apenas comienza, y sé que escribirás capítulos aún más grandes. Sigamos celebrándonos, creciendo y sosteniéndonos como siempre lo hemos hecho.

A mi compañero de vida, por soportar mis crisis existenciales, mis charlas eternas sobre temas que no pediste y mis cambios de humor dignos de estudio científico. Gracias por ser el café emocional que necesitaba para no rendirme, por tu comprensión inagotable y por esos abrazos que curaban más que cualquier avance en la tesis. Tu forma de estar hizo de este proceso algo mucho más humano.

A esa persona que recorrió este mismo camino antes que yo, y que sin saberlo se convirtió en un referente para mí. Tus consejos, tu experiencia y tu generosidad me ayudaron a navegar por etapas complejas de este trabajo. Gracias por demostrarme que incluso en la academia también hay espacio para la empatía y el apoyo entre colegas.

Finalmente, a quienes compartieron conmigo no solo el camino, sino también el idioma de esta carrera. Gracias por sobrevivir conmigo cada semestre, por los apuntes de último minuto, las risas entre desvelos y el compañerismo genuino. Ustedes fueron espejo, impulso y sostén. Compartir el cansancio, las dudas y las pequeñas victorias lo cambió todo.

Simplemente gracias.

*A mis padres, por ser raíz firme y viento a favor.  
A mi hermana, cuya sola presencia aligera lo que pesa.  
Gracias por sostenerme siempre, sin pedir nada a cambio.*

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS . . . . .	7
ÍNDICE DE TABLAS . . . . .	8
ABREVIATURAS . . . . .	9
ABSTRACT . . . . .	10
RESUMEN . . . . .	11
1. INTRODUCCIÓN . . . . .	12
1.1. Enfermedad del ojo azul en cerdos . . . . .	12
1.2. Origen, incidencia y expansión de RVP en México . . . . .	12
1.3. Signología clínica . . . . .	13
1.4. Patogenia viral . . . . .	14
1.5. Histopatología . . . . .	15
1.6. Diagnóstico de la EOA . . . . .	16
1.7. Prevención y control de la EOA . . . . .	17
1.8. Agente etiológico de la EOA . . . . .	18
1.9. Proteínas de RVP . . . . .	20
1.9.1. Proteína NP . . . . .	20
1.9.2. Proteína L . . . . .	21
1.9.3. Proteína P . . . . .	21
1.9.4. Proteína M. . . . .	21
1.9.5. Proteína HN. . . . .	21
1.9.6. Proteína F . . . . .	22
1.10. Ciclo replicativo de RVP. . . . .	24
2. ANTECEDENTES . . . . .	27
2.1. Levadura <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión . . . . .	27
2.2. Expresión de la proteína F en un sistema heterólogo . . . . .	29
3. JUSTIFICACIÓN. . . . .	33
4. OBJETIVOS. . . . .	34
4.1. Objetivo general . . . . .	34
4.2. Objetivos específicos . . . . .	34
5. MATERIAL Y METODOLOGÍA. . . . .	35
5.1. Expresión del polipéptido F1 . . . . .	35
5.2. Precipitación con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . . . . .	35
5.3. Diálisis del solubilizado proteico. . . . .	36
5.4. Determinación de proteínas totales por el método de Sedmak y Grossberg [49]. . . . .	36
5.5. Concentración de proteínas para PAGE-SDS. . . . .	36

5.5.1. Precipitación de proteínas con acetona. . . . .	36
5.5.2. Liofilización . . . . .	37
5.6. Desnaturalización de proteínas para PAGE-SDS . . . . .	37
5.7. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS). . . . .	37
5.8. Tinción con azul de Coomassie R-250. . . . .	38
5.9. Western blot (Inmunotransferencia). . . . .	38
5.10. Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC-NTA-Ni) . . .	39
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN . . . . .	42
Cepa de <i>Pichia pastoris</i> productora de F1 (X-33-F1) . . . . .	42
6.1. Inducción con metanol de la cepa productora X-33-F1 . . . . .	42
6.2. Concentración de proteínas durante la inducción con metanol del cultivo de la cepa productora X-33-F1 . . . . .	44
6.3. Perfil de cadenas polipeptídicas durante la inducción con metanol del cultivo X-33-F1, por electroforesis (PAGE-SDS). . . . .	45
6.4. Identificación del polipéptido recombinante F1 por Western blot . . . . .	46
6.5. Purificación del polipéptido recombinante F1 por IMAC-NTA-Ni . . . . .	49
7. CONCLUSIÓN . . . . .	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .	57
ANEXOS (PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES). . . . .	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Opacidad corneal en un lechón de 7 días . . . . .	12
Figura 2. Fetos momificados y no momificados . . . . .	14
Figura 3. Histopatología de un testículo, verracos edad 12 meses . . . . .	16
Figura 4. Vacunas comerciales contra el RVP . . . . .	18
Figura 5. Microscopía electrónica de <i>Rubulavirus porcino</i> . . . . .	19
Figura 6. Estructura de <i>Rubulavirus porcino</i> . . . . .	20
Figura 7. Proteína de fusión de paramixovirus. . . . .	23
Figura 8. Mecanismo de fusión por las proteínas de clase I. . . . .	24
Figura 9. Ciclo replicativo de los paramixovirus. . . . .	25
Figura 10. <i>Pichia pastoris</i> . . . . .	27
Figura 11. Vector pPICZα . . . . .	29
Figura 12. Producción de anticuerpos anti-F del virus NDV en ratones . . . . .	30
Figura 13. Inmunodetección de las proteínas recombinantes F1 y F2-1 del RVP. . . . .	31
Figura 14. Integración del ORF del gen <i>F1</i> en el genoma de <i>P. pastoris</i> . . . . .	42
Figura 15. Crecimiento celular con metanol de la cepa productora X-33-F1 y control X-33 . . . . .	43
Figura 16. Curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como proteína estándar . . . . .	44
Figura 17. Concentración de proteínas totales durante la inducción con metanol. . . . .	45
Figura 18. Cadenas polipeptídicas durante la inducción con metanol producidas en el medio de cultivo de <i>P. pastoris</i> que expresa el polipéptido F1 . . . . .	46
Figura 19. Cadenas polipeptídicas de los concentrados y dializados proteicos de <i>P. pastoris</i> productora (X-33-F1) y control (X-33) . . . . .	47
Figura 20. Membrana teñida con rojo de Ponceau de los dializados X-33-F1 y X-33 control. . . . .	48
Figura 21. Western blot de los dializados X-33-F1 y X-33 control . . . . .	48
Figura 22. Perfil de elución 1 de la purificación de F1. . . . .	50
Figura 23. Purificación 1 del polipéptido recombinante F1. . . . .	51
Figura 24. Perfil de elución 2 de la purificación de F1. . . . .	52
Figura 25. Purificación 2 del polipéptido recombinante F1. . . . .	53
Figura 26. Perfil de elución 3 de la purificación de F1. . . . .	54
Figura 27. Purificación 3 del polipéptido recombinante F1. . . . .	54

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del gel de poliacrilamida al 12% . . . . .	38
Tabla 2. Composición del gel de poliacrilamida al 4%. . . . .	38
Tabla 3. Condiciones de purificación de la F1 por IMAC-NTA-Ni . . . . .	49

## ABREVIATURAS

aa	aminoácido
BSA	bovine serum albumin o albúmina de suero bovina
CT	cola citoplasmática
D.O.	densidad óptica
EOA	enfermedad del ojo azul
F	proteína de fusión
FP	péptido de fusión
F1	polipéptido F1 de la proteína de fusión
HI	prueba de inhibición de la hemaglutinación
His	histidina
HN	proteína hemaglutinina-neuraminidasa
HRA	repetición de heptada A
HRB	repetición de heptada B
HRP	horseradish peroxidase o peroxidasa de rábano
IMAC	immobilized metal affinity chromatography/cromatografía de afinidad por metales inmovilizados
kb	kilobase
kDa	kilodalton
L	proteína de alto peso molecular
LPMV	virus de La Piedad Michoacán
M	proteína matriz
nm	nanómetro
NP	nucleoproteína
NTA	nitriлотriacetic acid o ácido nitriлотriacético
ORF	open reading frame o marco de lectura abierto
P	fosfoproteína
PAC	producción animal cerdo
pb	pares de bases
pi	post-infección
POA	paramixovirus del ojo azul
PVDF	fluoruro de polivinilideno
rpm	revoluciones por minuto
RVP	Rubulavirus porcino
PAGE-SDS	polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate/electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida
SNC	sistema nervioso central
TM	dominio transmembrana
VC	volúmenes de columna

## ABSTRACT

Blue eye disease (BED), caused by *Porcine rubulavirus* (PRV), is a viral infection that has been exclusive to Mexico since 1980. It affects pigs, causing neurological, reproductive, and respiratory disorders, as well as the appearance of corneal opacity. Despite the availability of diagnostic methods, no specific treatment has yet been found, mainly due to the persistence of subclinical infections. This has prompted research into strategies using recombinant protein-based vaccines as an alternative control measure. In this context, our team developed a strain of *Pichia pastoris* that produces the F1 polypeptide of the PRV fusion protein (F), named X-33-F1. With this strain, we were able to produce and purify F1, as well as determine its antigenic properties by detecting it with antibodies from pigs infected with PRV. The strains are stored with glycerol at -80 °C for preservation.

During the COVID-19 pandemic (2020-2022), the viability of the strain was affected by problems with the -80 °C ultra-freezer, so the objective of this work was to confirm that the X-33-F1 producer strain still retained its ability to produce the F1 polypeptide and proceed with its purification. To this end, the X-33-F1 strain was induced for seven days in BMMY medium with methanol as a carbon source, monitoring its growth by optical density measurements. Subsequently, the cell-free extract containing the F1 polypeptide was recovered, concentrated by precipitation with ammonium sulfate, and dialyzed with phosphate buffer. The F1 polypeptide (~41 kDa) was detected by Western blot using a specific antibody against the polyhistidine tag located at the C-terminal end of F1, confirming its expression with a band at 41 kDa. For purification, three different affinity chromatography conditions (IMAC-NTA-Ni) were performed, varying the concentrations of NaCl and imidazole. Under the first condition, F1 was detected, although with the presence of contaminating proteins, attributable to the high concentration of NaCl and the absence of imidazole in the washing step. In the third condition, the polypeptide was detected only in the non-bound fraction, but not in the elution, as expected. The process was monitored using UV-VIS spectrophotometry, allowing the identification of protein fractions corresponding to non-binding (NP), washing (L), and elution (E). Western blot analysis was used to evaluate the three F1 purification conditions. In the first condition, the F1 polypeptide was not detected in the eluate, but it was detected in the X-33-F1 dialysate. These conditions were used in the previous study. In the second condition, F1 was detected, although with the presence of contaminating proteins, attributable to the high concentration of NaCl and the absence of imidazole in the washing step. In the third condition, the polypeptide was detected only in the non-bound fraction, but not in the elution, as expected.

In conclusion, the current X-33-F1 production strain may be affected in its variability and/or in the correct folding of the tertiary structure of the F1 polypeptide, due to electrical failures that compromised the operation of the ultra-freezer at -80 °C for several days over the two years of the pandemic, during which the temperature rose considerably. The most advisable course of action would be to rebuild a new producer strain in order to ensure the production of significant quantities of F1 and successfully continue this important project, aimed at evaluating it as a vaccine in pigs.

## RESUMEN

La enfermedad del ojo azul (EOA), causada por el *Rubulavirus porcino* (RVP), es una infección viral exclusiva de México desde 1980. Afecta a los cerdos causando alteraciones neurológicas, reproductivas y respiratorias, así como la aparición de opacidad corneal. A pesar de contar con métodos diagnósticos, aún no se encuentra un tratamiento específico, principalmente por la persistencia de infecciones subclínicas. Esto ha impulsado a investigar estrategias con vacunas basadas en proteínas recombinantes como alternativa de control. En este contexto, nuestro equipo de trabajo desarrolló una cepa de *Pichia pastoris* productora del polipéptido F1 de la proteína de fusión (F) del RVP, nombrada como X-33-F1. Con esta cepa se logró la producción y purificación de F1, además de determinar sus propiedades antigénicas mediante su detección con anticuerpos de cerdo infectados con RVP. Las cepas para su conservación se almacenan con glicerol a -80 °C.

Durante la pandemia de COVID-19 (2020-2022), la viabilidad de la cepa se vio afectada por problemas del ultracongelador a -80 °C, por lo que el objetivo de este trabajo fue confirmar que la cepa productora X-33-F1 aún conservaba su capacidad de producir el polipéptido F1 y proceder a su purificación. Para ello, a partir de la cepa X-33-F1, fue inducida durante siete días en medio BMMY con metanol como fuente de carbono, monitoreando su crecimiento mediante mediciones de densidad óptica. Posteriormente, se recuperó el extracto libre de células donde estaba el polipéptido F1, el cual se concentró precipitando con sulfato de amonio y dializando con buffer fosfato. La detección del polipéptido F1 (~41 kDa) se llevó a cabo con un Western blot, utilizando un anticuerpo específico contra la etiqueta de polihistidina ubicada en su extremo C-terminal de F1, confirmando su expresión con una banda a la altura de 41 kDa. Para la purificación, se realizaron tres condiciones diferentes de cromatografía de afinidad (IMAC-NTA-Ni), variando las concentraciones de NaCl e imidazol. El proceso se monitoreó mediante espectrofotometría UV-VIS, permitiendo identificar las fracciones de proteínas correspondientes a no pegado (NP), lavado (L) y elución (E). Mediante análisis por Western blot, se evaluaron las tres condiciones de purificación de F1. En la primera, no se detectó el polipéptido F1 en la elución, pero sí en el dializado X-33-F1, estas condiciones fueron utilizadas en el estudio precedente. En la segunda condición, se logró la detección de F1, aunque con presencia de proteínas contaminantes, atribuibles a la alta concentración de NaCl y a la ausencia de imidazol en la etapa de lavado. En la tercera condición, el polipéptido se detectó solo en la fracción de no pegado, pero no en la elución, como se esperaba.

En conclusión, la cepa productora X-33-F1 actual puede estar afectada en su viabilidad y/o en el correcto plegamiento de la estructura terciaria del polipéptido F1, debido a las fallas eléctricas que comprometieron el funcionamiento del ultracongelador a -80 °C durante varios días a lo largo de los dos años de pandemia, donde la temperatura se elevó considerablemente. Lo más recomendable será volver a construir una nueva cepa productora, con el fin de garantizar la obtención de cantidades significativas de F1 y continuar con éxito este importante proyecto, orientado a su evaluación como vacuna en cerdos.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Enfermedad del ojo azul en cerdos

La enfermedad del ojo azul (EOA), también conocida como virus del síndrome del ojo azul (VSOA), es una infección provocada por el virus *Orthorubulavirus porcino* anteriormente conocido como *Rubulavirus porcino* (RVP) hasta 2018. Causa alteraciones neurológicas, reproductivas y respiratorias, así como brotes de encefalitis y la aparición de opacidad corneal en cerdos de diversas edades (figura 1) [1–3]. En cerdos adultos, el síntoma más notable es la falla reproductiva, que se presenta con mayor frecuencia que los daños neurológicos o respiratorios [4]. La EOA fue descrita por primera vez en 1980 en granjas porcícolas de la ciudad de La Piedad, Michoacán, México [5].



Figura 1. Opacidad corneal en un lechón de 7 días. Tomado de Zimmerman et al. [6].

## 1.2. Origen, incidencia y expansión del RVP en México

Aún no se ha determinado con certeza el origen del RVP, aunque, según estudios moleculares, se sospecha que pudo haberse transmitido desde un reservorio natural de vida silvestre, como los murciélagos, hasta los cerdos domésticos. Esta hipótesis se basa en la detección de anticuerpos contra el RVP en murciélagos insectívoros (*Rhogeessa parvula major*), así como en el hecho de que existen otras cepas de paramixovirus que tienen como reservorio natural a los murciélagos frugívoros [7].

El RVP ha sido registrado únicamente en la República Mexicana, con sus primeros casos reportados en los estados de Michoacán, Guanajuato y Jalisco, que se consideran zonas endémicas del virus [5,8]. Desde el surgimiento de los primeros brotes en 1980 la enfermedad se ha extendido a otros 16

estados del noreste y centro del país hasta 1992. Entre estos estados se incluyen Nuevo León, Tamaulipas, Hidalgo, Colima, Querétaro, Ciudad de México, Morelos, Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Tabasco, Campeche y Quintana Roo [9].

Hasta el momento, el RVP se ha sido descrito únicamente en la República Mexicana, y los aislados relacionados suelen asociarse con síntomas específicos. Por ejemplo, las cepas del paramixovirus del ojo azul (POA), como la de 1980, el Virus de La Piedad Michoacán (LPMV) de 1984 y la cepa POA2 de 1988, son responsables de causar meningoencefalitis y neumonía en lechones. Asimismo, se han documentado casos de trastornos neurológicos y respiratorios en neonatos asociados con las cepas CI (1991), CII (1991), CIII (1999) y CIV (1999). Por otro lado, las cepas Producción Animal Cerdo 2 (PAC2) de 1990 y 3 (PAC3) de 1993, aisladas de la Facultad de Veterinaria de la UNAM, mostraron problemas reproductivos, como abortos, mortinatos e infertilidad en las hembras, mientras que los machos presentaron casos de epididimitis, orquitis y atrofia testicular. Otros aislamientos, como PAC1 de 1990, PAC4 de 1993 y PAC5 de 1994, ocasionaron problemas respiratorios graves y meningoencefalitis en lechones [10,11]. En la primera década de los 2000, se identificaron las cepas PAC6 en 2001, PAC7 y PAC8 en 2002, y PAC9 en 2003, todas asociadas con signos graves de afecciones respiratorias y neurológicas, lo que resultó en un aumento de hasta un 30% en los brotes [12].

En 2011, un estudio de muestras serológicas realizado en cuatro estados de México (Michoacán, Guanajuato, Jalisco y Estado de México) reveló una prevalencia que variaba del 9% al 23.7%, lo que sugiere diversidad genética en un grupo de lechones infectados en comparación con los brotes iniciales. Un fenómeno similar se observó en un estudio con cepas de 2015 [13,14].

### 1.3. Signología clínica

La EOA es más común en los meses de marzo y agosto, y su presentación clínica varía según la edad de los animales. En el primer brote, la enfermedad afectó principalmente a lechones neonatos y lactantes, causando un síndrome neurológico y respiratorio, con tasas de morbilidad y mortalidad del 20% y 50%, respectivamente [15,16]. Generalmente, la enfermedad se manifiesta con más frecuencia en la zona de maternidad en lechones de 1 a 10 días, quienes desarrollan síntomas progresivos y agudos en el sistema nervioso central (SNC), que incluyen fiebre, neumonía, pelaje áspero, espalda arqueada, y, en ocasiones, estreñimiento y diarrea [2,9,16]. A medida que avanza la enfermedad, pueden aparecer signos de ataxia, rigidez, temblor muscular y debilidad. En cerdos mayores de 30 días, los síntomas suelen ser transitorios e incluyen anorexia, fiebre, tos y estornudos, mientras que los signos neurológicos se presentan con menor frecuencia [6]. A los 3 a 4 meses, aunque la tasa de mortalidad disminuye persisten problemas de crecimiento y afecciones respiratorias [5,9].

En cerdos adultos, los síntomas clínicos están principalmente relacionados con los órganos reproductivos. En las hembras, se pueden observar abortos, nacimientos de crías muertas y una dis-

minución en la fertilidad, con una reducción de la natalidad que puede alcanzar hasta el 20% [5,15]. En un estudio realizado por Hernández-Jáuregui et al. [17] se infectaron cerdas gestantes entre la sexta y la décima semana de gestación con la cepa PAC3. Los resultados mostraron fetos de tamaño inferior al normal, así como lesiones macroscópicas en la placenta y el endometrio, que incluyeron áreas de congestión focal y hemorragias. Asimismo, se observó que algunos fetos presentaban signos de deshidratación o momificación (figura 2) [17].



**Figura 2. Fetos momificados y no momificados.** Tomado de Hernández-Jáuregui et al. [17].

En los machos, se presentan síntomas como epididimitis, orquitis, atrofia testicular, así como una disminución en la motilidad y concentración de espermatozoides, lo que resulta en una pérdida de fertilidad [5]. Además, la variabilidad en el gen de la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) ha dado lugar a cuadros clínicos en cerdos adultos que incluyen signos neurológicos, lo que conlleva pérdidas económicas significativas [16].

Por otro lado, la opacidad corneal, que se presenta con una tonalidad color azul y puede ser unilateral o bilateral, se observa únicamente en el 1 al 10% de los animales infectados, independientemente de su edad. Las afecciones del SNC se manifiestan a través de hiperexcitabilidad cutánea, parálisis de extremidades posteriores, incoordinación motora, convulsiones y, en casos severos, la muerte [3,15].

#### **1.4. Patogenia viral**

La patogénesis del RVP está asociado a un tropismo orgánico positivo, relacionado con la interacción de receptores celulares que expresan ácido siálico (sialil ( $\alpha$ -2,3) lactosa), así como con las proteínas de adhesión viral. La infección generalmente ocurre por vía intranasal y se disemina desde las amígdalas

al SNC a través de los nervios trigémino y olfatorio, así como a los pulmones por vía aérea [2,3,18]. El virus tiene la capacidad de reconocer diversas formas de ácido siálico, incluyendo oligosacáridos de ácido 5-neuramínico  $\alpha$ -2,3 galactosa (Neu5Ac  $\alpha$ -2,3Gal), los cuales son esenciales para el proceso de infección y están relacionados con la edad de los cerdos. Por esta razón, el virus presenta una mayor afinidad por el SNC de lechones neonatos y lactantes, que exhiben una alta expresión de estos oligosacáridos, especialmente en el hipocampo, el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, el cerebelo, y el bulbo raquídeo, mientras que su expresión es menor en los tejidos urogenitales [7]. Además, el aislamiento del virus en órganos distantes de la entrada indica que también podría haber una diseminación a través de las vías sanguínea y linfática [2].

Respecto a su excreción, el virus se elimina principalmente por el tracto respiratorio y la orina. Estudios que han analizado la exposición intratraqueal e intranasal sugieren que las vías de infección pueden incluir tanto la instilación como la transmisión por aerosol [3,7]. Además, la transmisión puede ocurrir a través del semen y la diseminación por fómites, posiblemente mediada por murciélagos, aves o el viento [6]. Asimismo, en las hembras, dado que las inmunoglobulinas (Ig) no se transfieren de la madre al feto por vía placentaria, el calostro se considera también una vía de transmisión [9].

Por otro lado, aunque no se ha documentado zoonosis asociada al RVP, se han encontrado anticuerpos contra el virus en personal veterinario, lo que sugiere un posible riesgo de transmisión zoonótica [19].

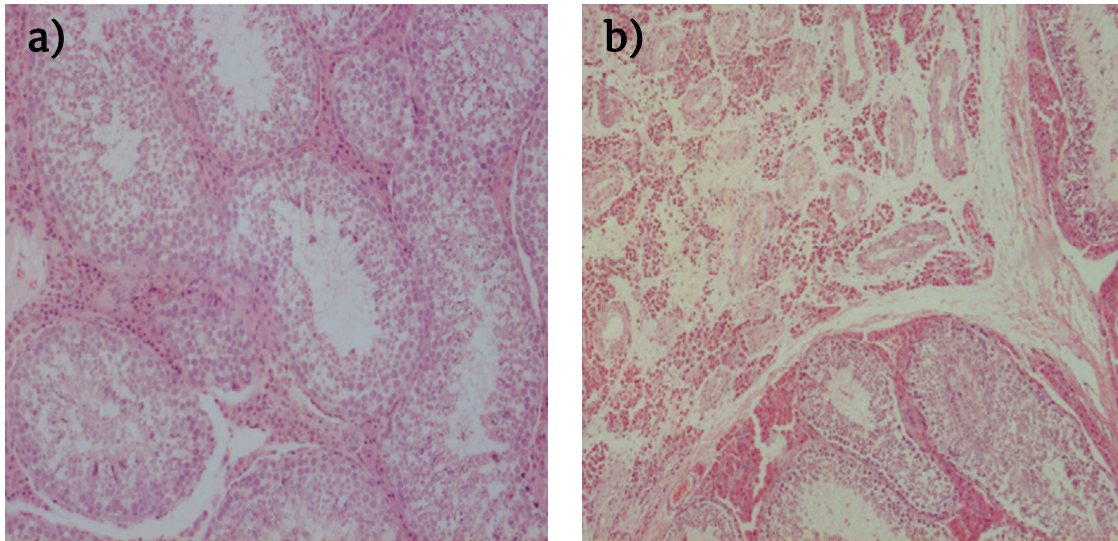
## 1.5. Histopatología

El RVP generalmente afecta diversos órganos del cerdo, incluidos los riñones, el hígado, el bazo, los ganglios mesentéricos y las amígdalas. Sin embargo, los principales cambios histológicos se observan en el SNC, particularmente en el cerebro y la médula espinal, especialmente en cerdos neonatos. En estas áreas, se observa una encefalomiелitis no supurativa que afecta el tálamo, el mesencéfalo y la corteza cerebral. Estos cambios incluyen gliosis, infiltración perivascular de linfocitos, células plasmáticas y células reticulares, necrosis neuronal, neuronofagia, meningitis y coroiditis [6,15,20].

Por otro lado, en los pulmones, se presenta engrosamiento de los septos alveolares acompañado de infiltración celular, lo que es característico de una neumonía intersticial. En los ojos, se observan opacidades corneales que causan edema corneal y uveítis anterior. En los verracos, los testículos muestran degeneración y necrosis epitelial en la cabeza del epidídimo, junto con una intensa infiltración de células mononucleares con fagocitosis de espermatozoides fragmentados. De igual manera, se refleja la formación de vesículas, pérdida de cilios epiteliales y la ruptura de la pared epitelial, junto con la presencia de fibrosis y la formación de granulomas [6,21].

En este sentido, Rivera-Benitez et al. [21] inocularon a nueve verracos de 12 meses de edad con la cepa PAC3, manteniéndolos durante 142 días post-infección (pi). Durante el seguimiento, observaron un aumento en el tamaño de los testículos a los 5 días pi y en el epidídimo entre los 12 y los 110 días

pi. El análisis histológico, por su parte, reveló inflamación, degeneración epitelial, ruptura de túbulos seminíferos, infiltrado mononuclear y alteraciones estructurales en las células intersticiales de los testículos, así como fibrosis en el epidídimo (figura 3).



**Figura 3. Histopatología de un testículo, verracos edad 12 meses.** a) Testículo normal. b) Testículo con pérdida de estructura tubular (142 días pi con RVP-PAC3). Tomado de Rivera-Benitez et al. [21].

## 1.6. Diagnóstico de la EOA

Entre los principales signos de la EOA se incluyen la opacidad corneal, encefalitis, problemas reproductivos en las hembras, así como orquitis y epididimitis en los machos. Es crucial señalar que, aunque dichos síntomas también pueden estar relacionados con otras enfermedades, como las provocadas por el virus de la pseudorrabia (enfermedad de Aujeszky) o el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), solo la EOA es capaz de generar específicamente la opacidad corneal, así como orquitis y epididimitis en los machos [6].

En México, desde el primer informe de la EOA, el diagnóstico de RVP se ha centrado en el análisis de la antigenicidad y la inmunodominancia de las proteínas HN, que forman parte de la cápside del virus. El método serológico más utilizado ha sido la inhibición de la hemaglutinación (HI), que se basa en la interacción entre la proteína HN con el receptor celular del huésped infectado. Sin embargo, esta prueba presenta la desventaja de generar falsos positivos si no se realiza correctamente [3,19]. En un estudio realizado por Hidalgo-Lara et al. [1], se señala que una de las limitaciones de la HI es que, al utilizar glóbulos rojos de pollo, la especificidad de la prueba puede verse afectada, mientras que al emplear glóbulos rojos bovinos, si bien la especificidad mejora, la sensibilidad disminuye. Los autores destacan la importancia de eliminar los inhibidores de la hemaglutinación y el sistema de complemento del suero para optimizar la precisión de los resultados. En este contexto, además de la

HI, existen otras técnicas diagnósticas serológicas como las pruebas de neutralización sérica (SN), los ensayos de monocapa de inmunoperoxidasa (IPMA) y los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) [1,3].

Por otro lado, también se han utilizado técnicas adicionales para la detección del RVP, como el aislamiento viral, que se realiza preferentemente a partir del cerebro, aunque también puede obtenerse de los pulmones o las amígdalas. Este procedimiento utiliza células de riñón de cerdo o células PK-15, que muestran formaciones sincitiales típicas y revelan actividad de fusión. Además, se utilizan métodos como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), microscopía electrónica, así como métodos de cuantificación como la RT-PCR convencional y la qPCR en tiempo real que detectan el gen de la fosfoproteína (P) o el de la nucleoproteína (NP). No obstante, estas pruebas presentan la desventaja de ser costosas cuando se aplican a grandes poblaciones [3,6,19].

## 1.7. Prevención y control de la EOA

Aunque existen diversas oportunidades para realizar pruebas rápidas en la detección del RVP, aún no se dispone de un tratamiento específico debido a los cuadros subclínicos y las infecciones persistentes que pueden afectar a los cerdos. Sin embargo, se cuenta con tratamientos antimicrobianos que ayudan a tratar y prevenir infecciones secundarias. Además, en el mercado están disponibles tres vacunas de virus inactivados para su aplicación en cerdas jóvenes, preñadas, verracos y lechones [6,19]. Entre ellas se encuentra la vacuna Innovac® Ojo Azul (figura 4a), producida por los laboratorios Avimex® S. A. de C. V., que es una emulsión auxiliar contra el RVP, cepa MG-55, elaborada mediante cultivo celular, inactivación química y emulsificación en aceite mineral, y que está indicada para lechones, cerdos en etapa de desarrollo y pie de cría [22]. Otra opción es la vacuna Porcimune® SOA (figura 4b), de los laboratorios Lapisa® S. A. de C. V., que contiene las cepas de RVP LPMV-SOA-CI y LPMV-SOA-CIII, con una concentración mínima de  $1 \times 10^6$  U.F.C., inactivadas químicamente y emulsificadas con un adyuvante oleoso. Esta vacuna está indicada para lechones, pie de cría, reemplazos, hembras y sementales [23]. Por otro lado, la tercera vacuna es Avilab® Ojo Azul (figura 4c), fabricada por los laboratorios Avilab® S. A. de C. V., que se compone de antígenos virales inactivados de la cepa POA02 de RVP, cultivados en líneas celulares y emulsificados con adyuvantes oleosos. Está destinada a su uso durante las etapas de gestación, lactancia, reemplazo y en reproductores [24]. Sin embargo, estudios sugieren que una vacuna monovalente no actualizada podría no ofrecer protección efectiva contra cepas con subtipos antigénicos diferentes. Por esta razón, se plantea la posibilidad de utilizar proteínas recombinantes de RVP como antígenos para generar una respuesta inmune protectora [13,19].

En consecuencia, la forma más efectiva de prevenir la EOA es mediante programas de salud para los rebaños, en los que los animales reemplazo, antes de ser introducidos en la granja, deben pasar por un período de cuarentena y someterse a pruebas serológicas. También, se deben implementar medi-

das de bioseguridad, como el control de fauna silvestre, cercados adecuados, eliminación rápida de desechos, supervisión del personal, entre otras [6].



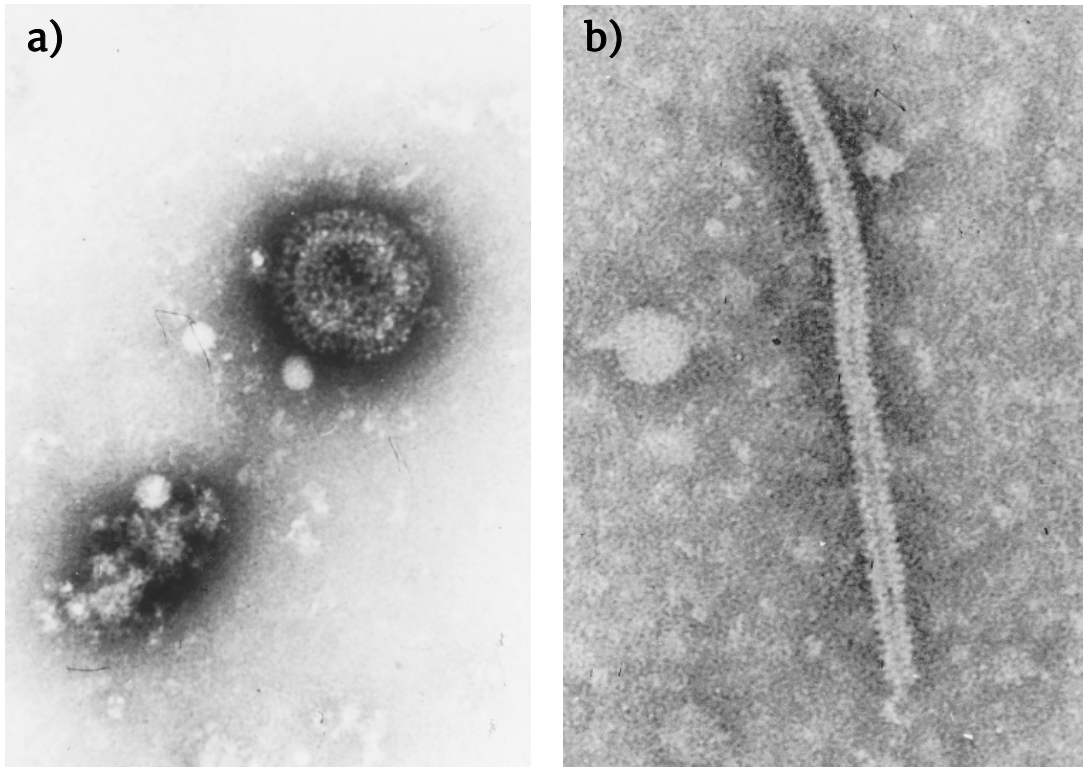
Figura 4. Vacunas comerciales contra el RVP. Tomado de snintegral.com, lapisa.com y avilab.com [22–24].

En caso de que ocurra una infección por EOA, se debe proceder con el aislamiento del rebaño, la eliminación de los cerdos clínicamente afectados y los animales muertos, seguido de un proceso de limpieza y desinfección exhaustivo. Finalmente, se deben realizar pruebas serológicas para confirmar que el virus haya sido erradicado [6].

### 1.8. Agente etiológico de EOA

Como se mencionó anteriormente, aunque el origen del virus sigue siendo incierto, se realizaron análisis genómicos que ubicaron el virus de la EOA dentro del orden *Mononegavirales*, la familia *Paramyxoviridae*, la subfamilia *Rubulavirinae*, el género *Orthorubulavirus* y la especie *Orthorubulavirus porcino*, según la clasificación del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) desde 2019. No obstante, en 2022, la especie fue renombrada a *Orthorubulavirus suis*. Asimismo, el virus mostró tener similitud genómica con los ocho virus pertenecientes al mismo género, entre ellos el virus de las paperas (MuV), el virus Mapuera de los murciélagos (MapV), el virus de la parainfluenza 5 (PIV5), virus simio 41 (SV-41) y los virus de parainfluenza humana 2 (HPIV-2) y 4 (HPIV-4) [5,25,26].

En cuanto a las características estructurales del virus, y según la clasificación de la familia *Paramyxoviridae*, el virión presenta una morfología pleomórfica, predominantemente esférica, con un diámetro que varía entre 300 y 500 nm, sin estructuras filamentosas, y con una ribonucleoproteína en su interior (figura 5) [6,25].

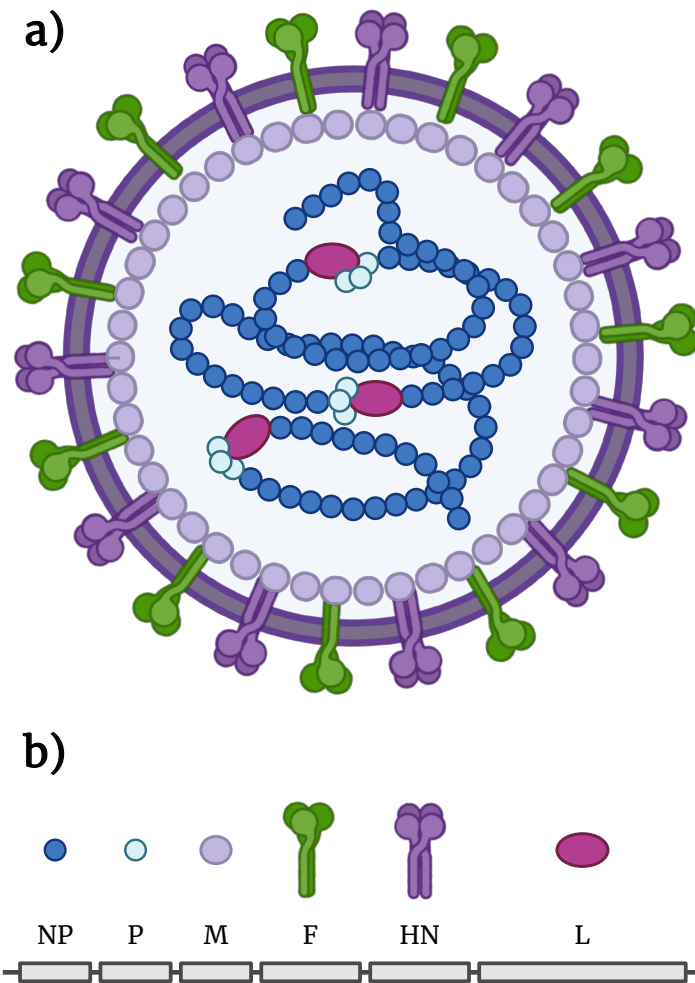


**Figura 5. Microscopía electrónica de *Rubulavirus porcino*.** a) Partículas de RVP de 135-148 nm por 257-360 nm. b) Fracción de nucleocápside de RVP con un diámetro de 20 nm y una longitud de 1000-1630 nm. Tomado de Zimmerman et al. [6].

La figura 6 nos muestra un esquema y mapa genético del RVP. El genoma del virus está compuesto por una cadena de ARN monocatenario de sentido negativo con 6 genes, con un tamaño de 15 kb. Este ARN se asocia con la nucleoproteína NP, para formar una nucleocápside helicoidal, que a su vez está vinculada con la fosfoproteína P, y la proteína L de alto peso molecular, las cuales forman el complejo enzimático encargado de la replicación y transcripción viral. En este complejo, la proteína L alberga la actividad de la ARN polimerasa, mientras que la proteína P actúa como cofactor. Por otro lado, la proteína matriz M se localiza en la parte interna de la envoltura viral y desempeña un papel esencial en el ensamblaje de nuevos viriones.

Finalmente, su envoltura lipídica presenta dos glicoproteínas embebidas: una proteína hemaglutinina-neuraminidasa HN, y una proteína de fusión F. Estas glicoproteínas son responsables de la actividad hemaglutinante, hemolítica, de neuraminidasa y de la formación de sincitios [6,12,27,28].

En relación con su variabilidad genética, el gen *F* de dos aislados de RVP, obtenidos en 1984 y 1988, solo difería en 16 nucleótidos, lo que resultaba en 4 cambios en los aa. En contraste, la proteína HN de diez aislados procedentes de los años 1990 a 2003 presentó una variación de aproximadamente 71 nucleótidos en el gen, lo que la convierte en la principal proteína inmunogénica del virus, pero también en la más susceptible a las variaciones antigénicas [5,27].



**Figura 6. Estructura de *Rubulavirus porcino*.** a) Esquema de RVP y sus proteínas constituyentes. b) Mapa genómico de RVP formado por seis genes separados por regiones intergénicas de longitud variable (1-47 nucleótidos). Tomado y modificado de Santos-López et al. [5].

## 1.9. Proteínas de RVP

### 1.9.1. Proteína NP

La nucleoproteína, con un peso de 68 kDa, forma parte de la nucleocápside y rodea al ARN genómico, proporcionando una conformación estructural que asegura una alta afinidad por la cadena de ARN durante los procesos de replicación y transcripción. En este contexto, cada molécula de NP está asociada con seis nucleótidos, lo que explica porque los genomas de los paramixovirus que poseen un múltiplo de seis muestran una replicación eficiente. Este fenómeno se conoce como la “regla del seis o del hexámero” [5,29].

### 1.9.2. Proteína L

La proteína L es la más grande del virión, con un peso de 200 kDa y compuesta por 2,251 aa. Su función principal es replicar el genoma viral y generar los ARN mensajeros necesarios para su posterior traducción. Para cumplir con esta tarea, se asocia a la nucleocápside, formando aproximadamente cincuenta complejos con actividad de polimerasa, cada uno compuesto por tres unidades de la proteína P. Además, la proteína L de los paramixovirus presenta una alta similitud con la proteína L del virus de la estomatitis vesicular (VSV), lo que sugiere que podrían compartir funciones similares, incluyendo funciones de metiltransferasa, de cinasa y de poliadenil sintetasa [5,29].

### 1.9.3. Proteína P

El gen de la fosfoproteína, que codifica una proteína de 52 kDa y 404 aa, puede dar lugar a otros tres productos diferentes mediante la edición del ARN mensajero y la iniciación alternativa de la traducción: las proteínas I (174 aa), V (249 aa) y C (126 aa). Asimismo, la proteína P forma parte del complejo enzimático con actividad polimerasa, en el que se asocia a una sola unidad de la proteína L, aunque también se pueden encontrar complejos de proteína P sin la proteína L. Su función principal en la síntesis de ARN es estabilizar la proteína L, aumentar la procesividad y regular la síntesis de ARN [5,29,30].

### 1.9.4. Proteína M

La proteína matriz es una proteína hidrofóbica de 40 kDa compuesta por 369 aa, predominando los de carácter básico. Se encuentra localizada en el interior de la envoltura viral y presenta una fuerte afinidad por la proteína NP, debido a su carga neta positiva. Esta interacción facilita su participación en el ensamble del virión y en la estabilidad de su estructura, actuando como un puente entre la nucleocápside y las glicoproteínas de la envoltura viral [5,29].

### 1.9.5. Proteína HN

La glicoproteína hemaglutinina-neuraminidasa, es una proteína de membrana tipo II con un peso molecular aproximado de 66 kDa, compuesta por 576 aa. Esta proteína se organiza en tetrámeros, formados por dímeros unidos por enlaces no covalentes. Además, posee un dominio hidrofóbico cercano a su región N-terminal, que facilita su inserción en la membrana lipídica. En términos de actividad, la proteína HN es capaz de aglutinar eritrocitos de diversas especies animales, incluyendo cerdo, vaca, carnero, pollo, perro, conejo, cobayo, rata, hámster, ratón y humanos de los grupos sanguíneos A, B y O. Esta capacidad de aglutinación se debe a la afinidad por los receptores de ácido siálico presentes en la superficie de los eritrocitos, lo que facilita la formación de puentes entre las

células. En particular, estudios han mostrado que HN tiene una mayor afinidad por el oligosacárido formado por ácido siálico y galactosa (Neu5Ac  $\alpha$ -2,3Gal), cuyos residuos pueden inhibir su actividad hemaglutinante [29,31,32].

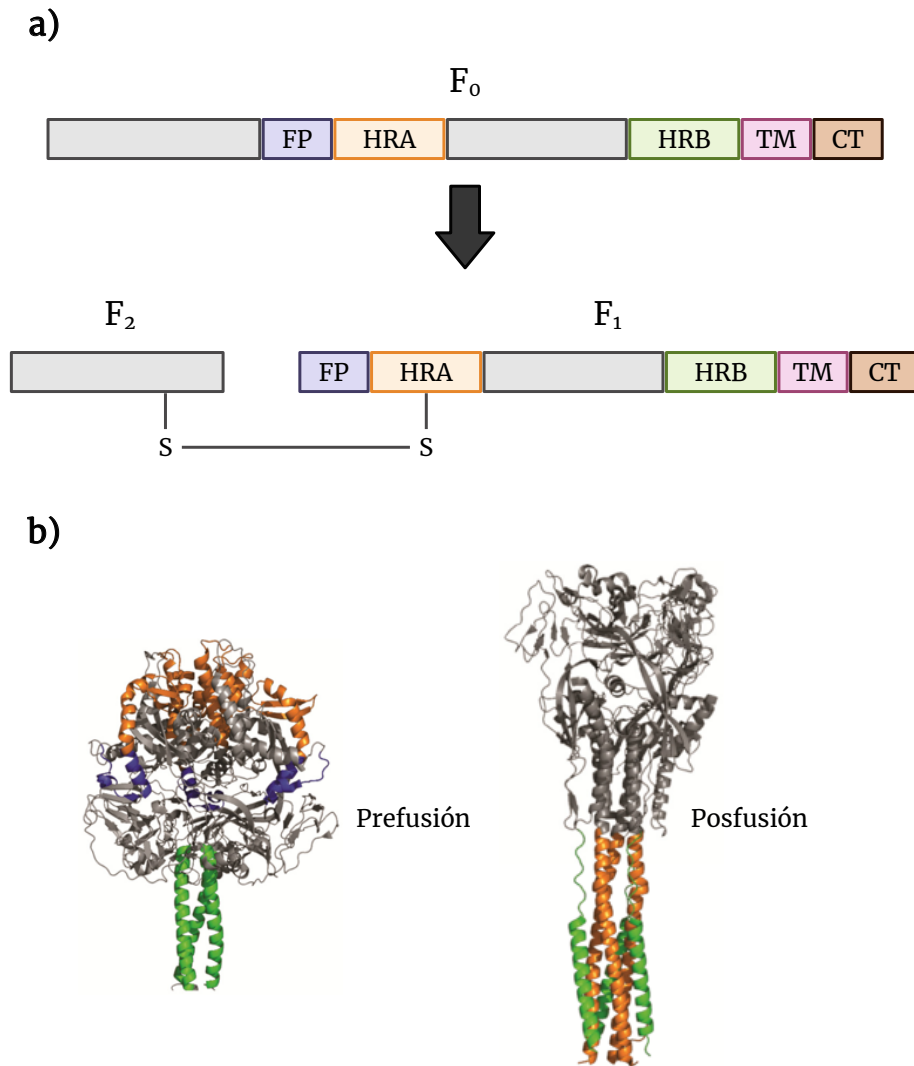
Asimismo, la proteína HN también posee actividad neuraminidasa (o sialidasa) a un pH de 3.3 y en un rango de temperatura de 30-55 °C, lo que le permite hidrolizar los residuos de ácido siálico de la progenie viral, previniendo así la autoagregación. Además, desempeña un papel fundamental en la fusión de las membranas viral y celular, facilitando tanto la entrada del virus en la célula huésped como la liberación de la progenie viral desde la célula infectada. Durante el ciclo replicativo, la proteína HN es crucial para la absorción del virus en la membrana celular, donde se une específicamente a su receptor. Este proceso provoca un cambio conformacional en la proteína, lo que activa la proteína F y permite la fusión de las membranas, facilitando así la infección viral [5,11,29,31].

### 1.9.6. Proteína F

La glicoproteína de fusión, una proteína trimérica de tipo I (como las de la gripe, el ébola, el VIH y el SARS) con un peso molecular de 59 kDa y compuesta por 541 residuos de aa, presenta un dominio altamente hidrofóbico que participa en el proceso de fusión entre la envoltura viral y la membrana celular, facilitando así la entrada del material genético del virión al citoplasma de la célula huésped. Además, esta proteína permite la propagación viral sin exponer el virus al medio extracelular, originando la formación de células gigantes multinucleadas, conocidas como sincitios, que se observan tanto en tejidos infectados como en cultivos celulares [5,33–35].

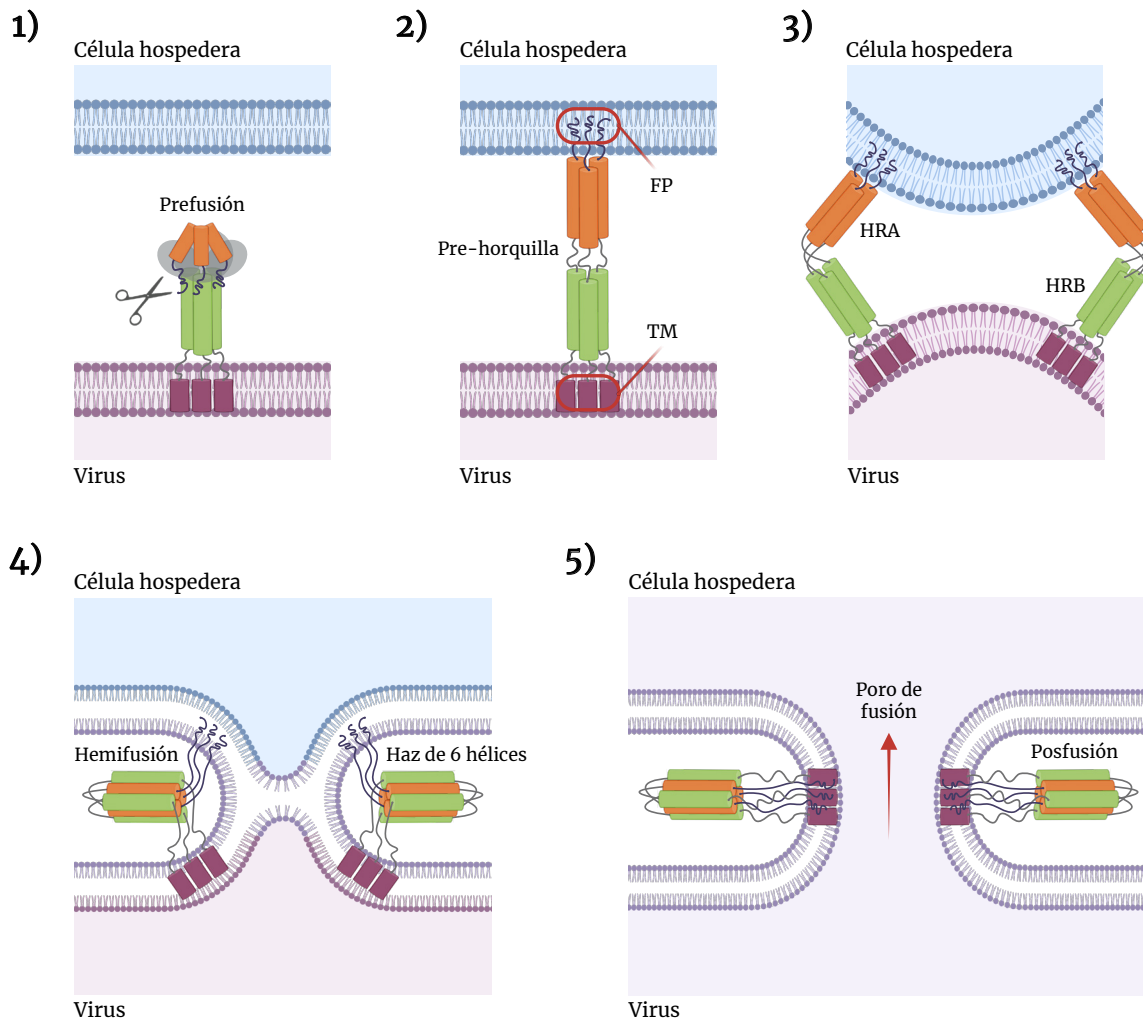
Un ejemplo de la función de la proteína F se observa en los paramixovirus, como se muestra en la figura 7. Para que la infección inicie, la glicoproteína F debe sintetizarse a partir del precursor inactivo denominado  $F_0$ , el cual sufre cambios conformacionales irreversibles por ser escindido por catepsinas o proteasas similares a furina. Este proceso genera dos polipéptidos,  $F_1$  y  $F_2$ , unidos por un enlace disulfuro (figura 7a).

En la subunidad  $F_1$ , se expone un nuevo extremo N-terminal que contiene el péptido de fusión activo (FP, en color morado), una secuencia hidrofóbica de 10 a 15 aa responsable de mediar la fusión entre la membrana viral y la membrana celular. Asimismo, la proteína F cuenta con dos regiones  $\alpha$ -helicoidales anfipáticas de repetición en heptada: HRA (color naranja) y HRB (color verde). A su vez, está anclada a la membrana por un dominio transmembrana de paso único (TM, en color rosa) que se autoasocia en trímeros para ayudar a estabilizar la conformación de prefusión. Por último, se encuentra una cola citoplasmática C-terminal (CT, en color marrón), compuesta por aproximadamente 25 a 30 aa [5,18,33,34,36,37].



**Figura 7. Proteína de fusión de paramixovirus.** a) Representación esquemática de la proteína de fusión escindida, mantenida unida por un enlace disulfuro. b) Conformaciones estructurales de la proteína F del virus de la parainfluenza 5 (PIV5) en estado de prefusión y de la proteína F del virus de parainfluenza humana 3 (HPIV-3) en estado de posfusión. Cabe destacar que las regiones correspondientes al TM y a la CT no se encuentran presentes en la estructura cristalina, ya que fueron sustituidas por un dominio de trimerización de GCNt. En todas las imágenes, el péptido de fusión (FP) se muestra en color morado, la repetición de heptada A (HRA) en naranja, la repetición de heptada B (HRB) en verde, el dominio transmembrana (TM) en rosa y la cola citoplasmática (CT) en marrón. Modificado de Chang y Dutch [34].

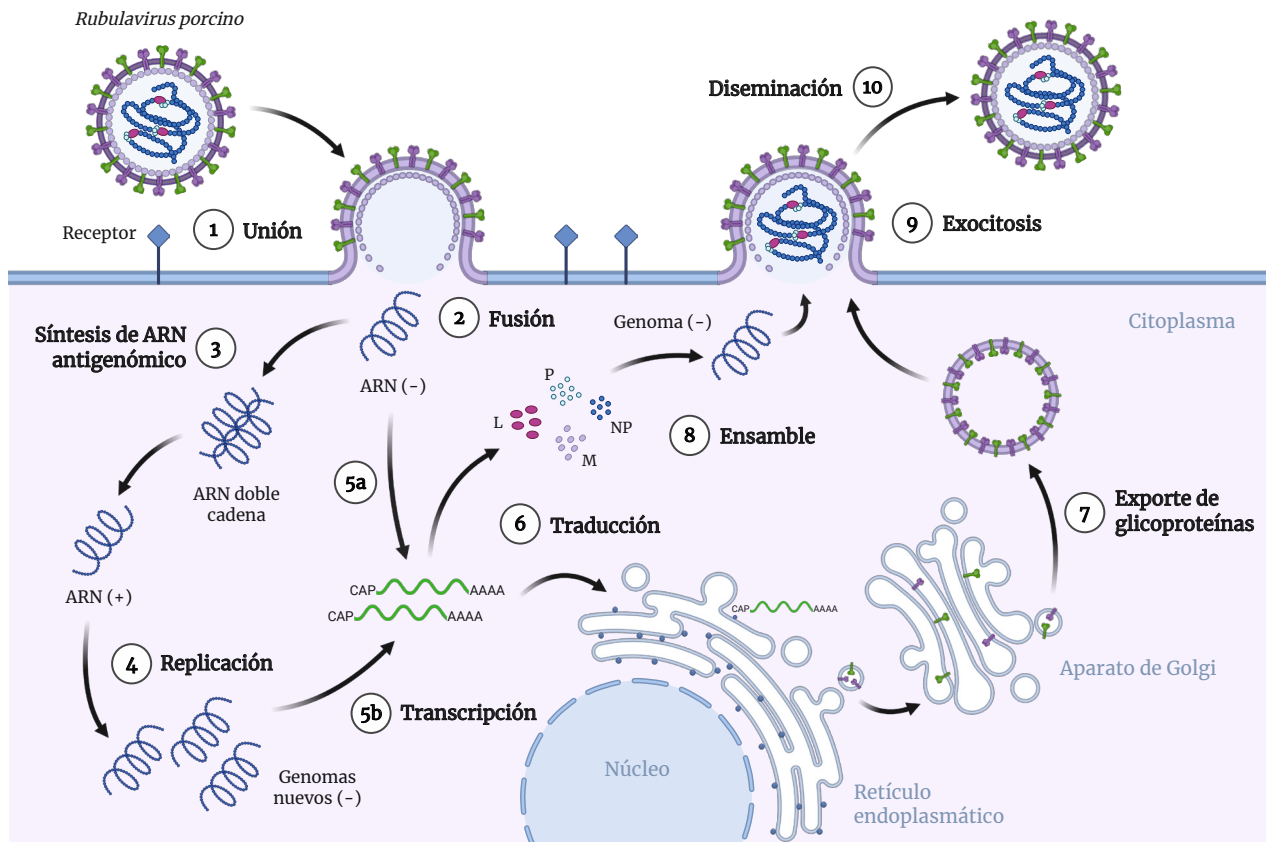
## 1.10. Ciclo replicativo de RVP



**Figura 8. Mecanismo de fusión por las proteínas de clase I.** El esquema ilustra las etapas del cambio conformacional que permite la fusión entre la membrana del virión y la de la célula huésped. 1) Tras recibir la señal activadora de la proteína HN, la proteína F es escindida (representado simbólicamente con unas tijeras) en dos subunidades:  $F_1$  y  $F_2$ . 2) Una vez activada, la proteína adopta una conformación extendida denominada estructura de pre-horquilla, permitiendo que el FP se inserte en la membrana de la célula huésped. 3) Después, la estructura comienza a replegarse, lo que aproxima las regiones repetidas de heptada (HRA y HRB). 4) Este acercamiento da lugar a la formación de un haz de seis hélices, alcanzando un estado de hemifusión, donde las capas externas de ambas membranas ya empiezan a mezclarse. 5) Finalmente, cuando el péptido de fusión (FP) y el dominio transmembrana (TM) se unen formando la estructura de posfusión, se completa la fusión de las membranas y se abre el poro de fusión, permitiendo la mezcla del contenido viral con el citoplasma celular. Tomado y modificado de Lozada et al. [39].

La replicación del virus comienza cuando la proteína HN se une a receptores de ácido siálico, específicamente Neu5Ac  $\alpha$ -2,3Gal, presentes en la superficie de las células huésped. Esta unión induce

un cambio conformacional en la HN que permite la activación de la proteína F mediante su escisión proteolítica de  $F_0$  a  $F_1$  y  $F_2$ , un proceso que ocurre a pH neutro. Una vez activada, la proteína F expone un péptido hidrofóbico que se inserta en la membrana celular. A través del plegamiento simultáneo de más de una proteína F, se genera un poro de fusión que facilita la unión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula, permitiendo así la liberación de la nucleocápside al citosol (figura 8). Durante este proceso, la proteína F transita de una conformación metaestable de prefusión a un estado de posfusión de menor energía (figura 7b) [7,26,34,35,38].



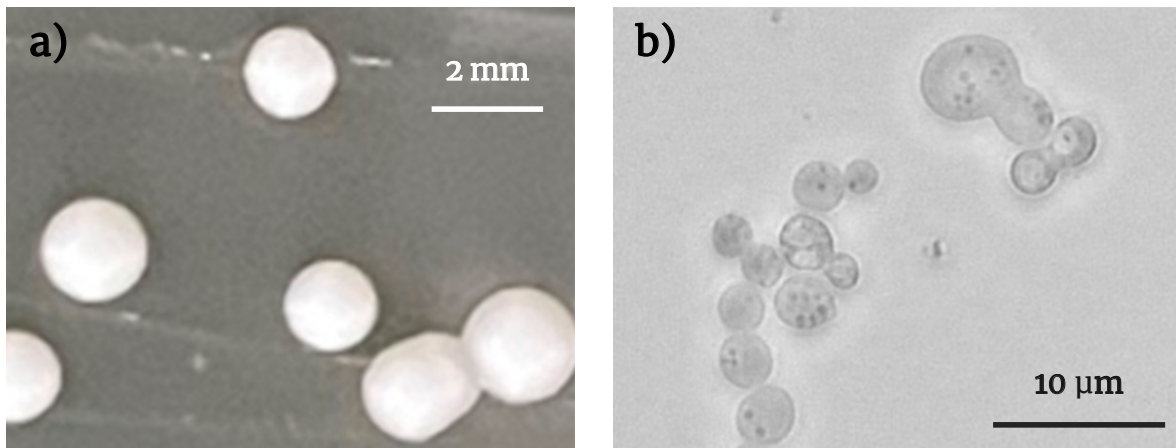
**Figura 9. Ciclo replicativo de los paramixovirus.** 1) Unión con el receptor: la proteína HN del virul reconoce el oligosacárido Neu5Ac  $\alpha$ -2,3Gal en la superficie celular. 2) Fusión de membranas: la HN activa a la proteína F, que media la fusión entre la membrana viral y celular, liberando el ARN viral al citoplasma. 3 y 4) Síntesis de ARN antigenómico y replicación: la ARN polimerasa viral sintetiza una cadena antigenómica (positiva), que sirve de molde para generar nuevos genomas virales. 5 y 6) Transcripción y traducción: se producen ARNm para la síntesis de proteínas estructurales y no estructurales. 7 y 8) Exporte de glicoproteínas y ensamble: las glicoproteínas HN y F, sintetizadas en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi, se transportan hasta la membrana plasmática, donde se ensamblan las nuevas partículas virales. 9 y 10) Liberación por exocitosis y diseminación: los viriones maduros se liberan al medio extracelular por exocitosis para infectar nuevas células. Tomado y modificado de Santos-López et al. [5].

Posteriormente, la ARN polimerasa viral inicia la síntesis del ARN antígenómico, una cadena complementaria al genoma viral, lo que permite la replicación del virus y la producción de nuevos genomas. Paralelamente, los distintos genes virales son transcritos para dar lugar a los ARNm, los cuales más adelante son traducidos para generar las proteínas virales estructurales y no estructurales. Estas proteínas se dirigen hacia el sitio de ensamblaje, donde las proteínas NP, P y L se asocian con el ARN genómico recién sintetizado, mientras que la proteína M se posiciona en la cara citoplasmática de la membrana celular. Al mismo tiempo, las glicoproteínas de envoltura HN y F, previamente sintetizadas en el retículo endoplasmático y modificadas en el aparato de Golgi, son transportadas a la membrana plasmática, donde se incorporan como parte de la futura envoltura viral. En ese sentido, la alta afinidad entre las proteínas del genoma (NP, P y L) y la proteína M, sumada a la interacción de esta última con las glicoproteínas de envoltura (HN y F), promueve la formación del virión. Una vez ensamblado, el virión es liberado de la célula mediante un proceso de exocitosis, y gracias a la actividad neuraminidasa de la HN, los nuevos viriones no se adhieren a los receptores de la célula ya infectada, lo que favorece su diseminación (figura 9) [5,26,34,39].

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Levadura *Pichia pastoris* como sistema de expresión

La levadura *Pichia pastoris*, actualmente clasificada como *Komagataella phaffii*, es una cepa metilotrófica ampliamente utilizada como sistema de expresión para la producción de proteínas heterólogas. Su colonia es color blanco lechoso, con una superficie lisa y una protuberancia (figura 10). Crece a 28-30 °C con una tolerancia de pH que varía de 3 a 7 [40,41]. Hasta ahora, se han logrado expresar más de 5000 proteínas recombinantes, entre ellas insulina,  $\alpha$ -interferón y antígeno de la hepatitis B. Entre sus principales ventajas, además de ser una opción rentable, se encuentran el hecho de que su genoma ha sido completamente secuenciado y existen diversas herramientas disponibles para su manipulación genética. De igual forma, *P. pastoris* destaca por su alta eficiencia en el plegamiento de proteínas en el retículo endoplasmático, su capacidad para llevar a cabo fermentaciones a altas densidades celulares con tiempos de duplicación entre 60-120 min, y por su notable estabilidad genética. Su sistema de secreción maduro, mediado por la peptidasa señal Kex2, facilita la liberación de proteínas al medio extracelular, lo que optimiza el proceso de purificación. Por otro lado, produce proteínas con un patrón de glicosilación similar al de las células de mamíferos, lo cual es importante para su funcionalidad biológica [42,43].



**Figura 10. *Pichia pastoris*.** a) Morfología de la colonia. b) Imagen microscópica. Tomado de Zha et al. [41].

La capacidad de *P. pastoris* para utilizar metanol como única fuente de carbono y energía para su crecimiento celular constituye un aspecto clave en su metabolismo. A diferencia de la cepa Y11430 (tipo silvestre), que no se emplea para la expresión de proteínas, la cepa GS115 y X-33 tienen dos genes que codifican la enzima alcohol oxidasa: *AOX1* y *AOX2*. Entre estos, el promotor *AOX1* (*pAOX1*) es el más potente, generando aproximadamente un 30% del total de la proteína soluble en los extractos

de la levadura durante la inducción con metanol. En cambio, el promotor AOX2 (*pAOX2*) contribuye solo con un 15% de la actividad total de alcohol oxidasa en la célula. De este modo, la proteína AOX1 representa la principal fuente de actividad oxidante del metanol [40,44].

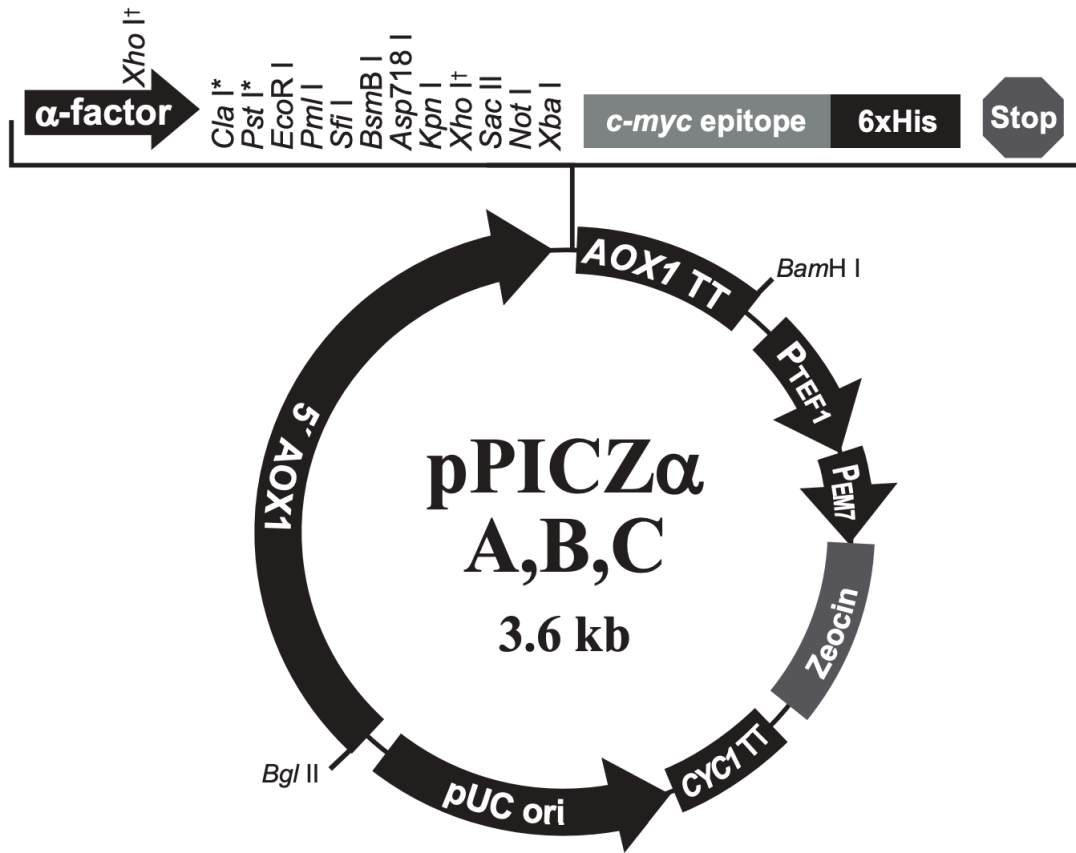
Una de las principales limitaciones de *P. pastoris* es que el metanol, al ser tóxico e inflamable, debe ser manejado con precaución, y sus niveles deben ser controlados durante la fermentación. Esto se debe a que el metabolismo del metanol puede dar lugar a la acumulación de formaldehído y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), lo que genera un estrés oxidativo que puede desencadenar la degradación de proteínas recombinantes o incluso la muerte celular. De igual forma, si los niveles de metanol son bajos, también podría producirse una degradación proteolítica de las proteínas recombinantes [40,43].

La cepa se clasifica en tres fenotipos comerciales: las cepas Mut<sup>+</sup>, que conservan los genes AOX1 y AOX2 intactos en sus cromosomas; las cepas Mut<sup>s</sup>, que tienen el gen AOX2 intacto pero el gen AOX1 interrumpido; y las cepas Mut<sup>-</sup>, que carecen por completo de ambos genes AOX y no pueden sobrevivir en presencia de metanol debido a la interrupción de ambos. En las cepas Mut<sup>+</sup> y Mut<sup>s</sup>, los genes AOX permanecen reprimidos cuando se emplean otras fuentes de carbono, como glucosa, glicerol o etanol. No obstante, al cambiar la fuente de carbono a metanol, se induce su expresión, lo que activa la transcripción de los genes AOX [40,44].

Entre los vectores utilizados para transformar a *P. pastoris* se encuentra la serie pPICZα A (3593 pb), B (3597 pb) y C (3598 pb) de Invitrogen (figura 11), que cuentan con las siguientes características tomadas de Invitrogen [56]:

- **5' AOX1 (promotor de AOX1):** permite una expresión de alto nivel inducible por metanol en *Pichia* y dirige la integración del plásmido al locus AOX1.
- **Señal de secreción del factor α de *S. cerevisiae*:** facilita la secreción extracelular de proteínas recombinantes en *Pichia*.
- **Sitio múltiple de clonación (MCS):** contiene 10 sitios de restricción únicos para insertar un gen de interés en el vector de expresión.
- **Etiqueta Myc (C-terminal):** epítipo que facilita la detección de la proteína recombinante mediante el anticuerpo Anti-Myc y Anti-Myc-HRP.
- **Etiqueta de polihistidina (6xHis, C-terminal):** permite la purificación de la proteína recombinante y su detección mediante el anticuerpo Anti-His-HRP.
- **Terminador de transcripción AOX1 (TT):** señal de terminación de la transcripción y poliadenilación del gen AOX1, lo que mejora la estabilidad del ARNm transcrito en *Pichia*.
- **Promotor TEF1:** promotor constitutivo del gen del factor de elongación 1 de *S. cerevisiae* que impulsa la expresión del gen *Sh ble* en *Pichia*, proporcionando resistencia a zeocina.
- **Promotor sintético EM7:** Promotor constitutivo que impulsa la expresión del gen *Sh ble* en *E. coli*, proporcionando resistencia a zeocina.
- **Gen *Sh ble*:** Gen de resistencia a zeocina proveniente de *Streptoalloteichus hindustanus ble*. Funciona tanto en bacterias como en levaduras.

- **Terminador de transcripción CYC1 (TT):** Extremo 3' del gen *CYC1* de *S. cerevisiae*, que facilita el procesamiento 3' del ARNm del gen *Sh ble*, aumentando su estabilidad en *Pichia*.
- **Origen pUC:** Permite la replicación y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*.
- **Sac I, Pme I, BstX I:** Sitios de restricción únicos que permiten la linealización del vector en el locus *AOX1*, facilitando la integración eficaz en el genoma de *Pichia*.

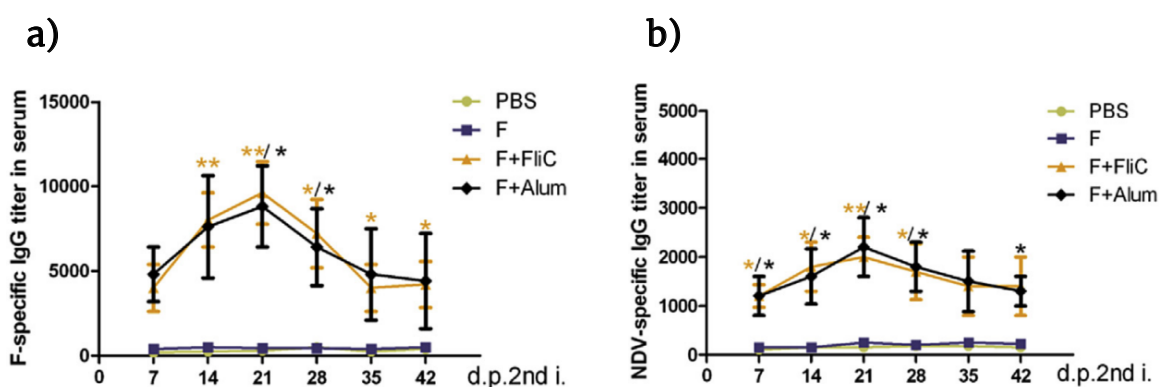


**Figura 11. Vector pPICZ $\alpha$ .** Los vectores incluyen un origen de replicación bacteriano (*pUC ori*), un marcador de selección para bacterias y levaduras (resistencia a zeocina), y un sitio múltiple de clonación (MCS) para la inserción del gen de interés. Contiene secuencias promotoras como 5' *AOX1*, *pTEF1* y *pEM7*, así como señales de terminación transcripcional (*AOX1 TT* y *CYC1 TT*). Incorpora una secuencia de secreción ( $\alpha$ -factor), que dirige la proteína recombinante al medio extracelular, así como etiquetas peptídicas c-Myc y 6xHis en el extremo C-terminal, útiles para su detección inmunológica y su purificación mediante métodos de afinidad. Tomado de Invitrogen [56].

## 2.2. Expresión de la proteína F en un sistema heterólogo

Diversos estudios han demostrado la capacidad de *Pichia pastoris* para expresar la proteína F de distintos virus, así como su eficacia en la inducción de una respuesta inmunitaria mediante la producción de anticuerpos específicos. Por ejemplo, McAleer y Rima [45] reportaron la sobreexpresión

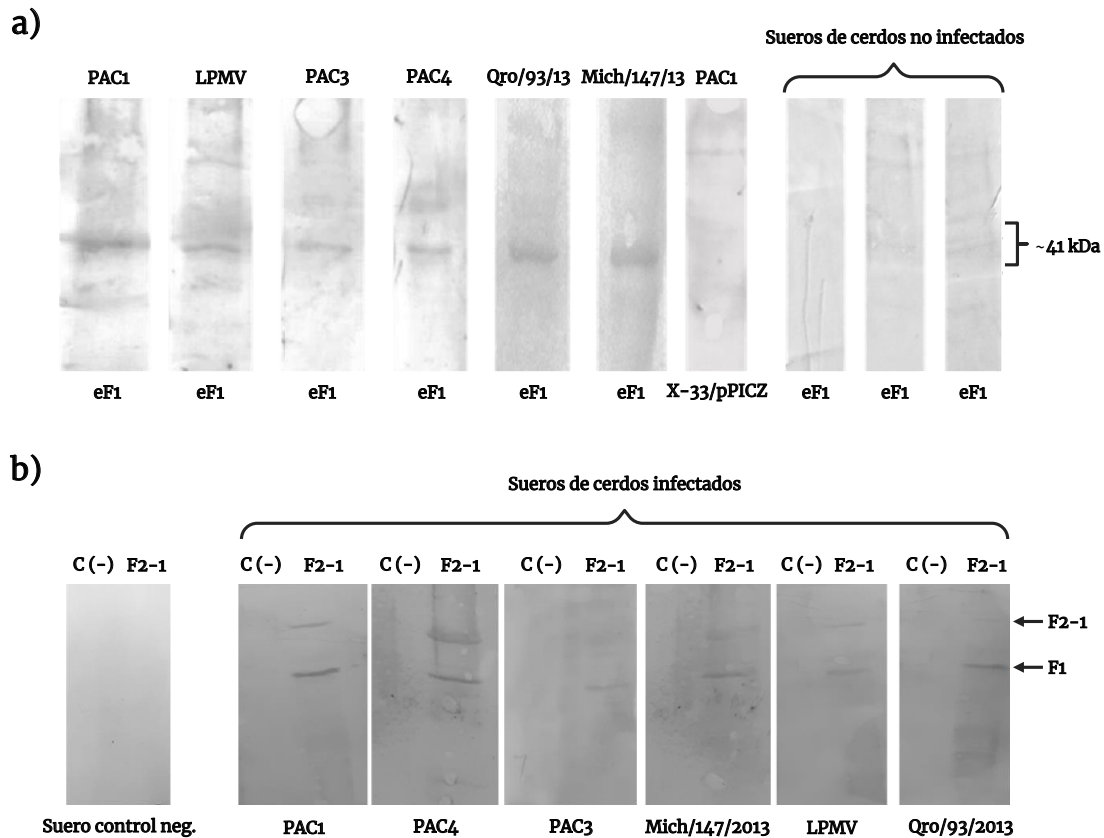
de la proteína F del virus de las paperas (MuV) en células de *P. pastoris* GS115 his4, señalando que parámetros como la temperatura de inducción y la concentración de metanol son determinantes para optimizar la expresión de la proteína. De manera similar, Pourbakhsh et al. [46] expresaron la proteína F del virus de la peste de los pequeños rumiantes (PPRV, cepa Nigeria 75/1) utilizando el vector pPICZαA, destacando el potencial inmunogénico de las proteínas de fusión del género *Morbillivirus*. Por su parte, Kang et al. [47] expresaron la proteína F de la cepa velogénica F48E8 del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y evaluaron la respuesta inmunitaria en ratones C3H/HeJ tras administrarla con adyuvantes como la flagelina o una mezcla de hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio. Los resultados mostraron que la combinación con flagelina indujo una respuesta inmunitaria de tipo IgG2a significativamente mayor, la cual está asociada con la activación de la vía Th1 y, por tanto, con la estimulación de linfocitos T citotóxicos. En comparación, el uso del hidróxido de aluminio/hidróxido de magnesio que generó una menor respuesta de IgG2a (figura 12). Finalmente, Tizzano et al. [48] lograron la expresión de la proteína F del virus del moquillo canino (CDV) y evaluaron su inmunogenicidad en ratones BALB/c utilizando un adyuvante oleoso (Specol), lo que resultó en la generación de anticuerpos capaces de reconocer la proteína recombinante. En conjunto, estos estudios respaldan la eficacia de *P. pastoris* como sistema de expresión para los dominios extracelulares de glicoproteínas virales.



**Figura 12. Producción de anticuerpos anti-F del virus NDV en ratones.** Se inmunizaron ratones C3H/HeJ por vía intraperitoneal con F, F + FluC, F + Alum y buffer de elución (PBS). a) IgG específicas contra la proteína F. b) IgG específicas contra el virus de Newcastle. Tomado de Kang et al. [47].

Hasta ahora, solo se había documentado la expresión de la proteína HN del *Rubulavirus porcino* en sistemas heterólogos debido a su carácter inmunodominante (tesis de doctorado de José Luis Cerriteño Sánchez) [31]. Sin embargo, esta característica favorece la aparición frecuente de cambios aminoácidos y variaciones antigénicas, lo que resaltaba la necesidad de explorar otros antígenos potenciales, como la proteína F, con el objetivo de inducir una respuesta inmunitaria protectora frente a diversas cepas virales. En este contexto, en nuestro laboratorio, Luis Ignacio Siañez Estrada en su tesis doctoral

secuenció el gen de la proteína F del RVP cepa PAC1, y lo comparó con otros aislados, reportando un alto porcentaje de identidad que oscila entre 97.78% y 99.26% [18]. Adicionalmente, utilizó herramientas de inmunoinformática para predecir epítomos antigénicos reconocidos por células B y T en las glicoproteínas virales HN y F. Por último, empleó AutoDock Vina para determinar las energías de enlace entre los epítomos seleccionados y las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), con el objetivo de evaluar su potencial uso como antígenos.



**Figura 13. Inmunodetección de las proteínas recombinantes F1 y F2-1 del RVP.** Las proteínas F1 y F2-1, expresadas en *P. pastoris*, fueron reconocidas mediante Western blot utilizando sueros de cerdo infectados con diferentes cepas de RVP (PAC1, PAC3, PAC4, LPMV, Qro/93/2013 y Mich/147/2013). a) En el caso de la proteína F1, expresada por la cepa X-33-F1, se observó un reconocimiento específico por parte de los sueros positivos, mientras que no se observó señal en los controles negativos, que incluyeron una cepa transformada con el vector vacío pPICZαB y sueros de cerdos no infectados. b) Para la proteína F2-1, también se observó reconocimiento por sueros positivos, aunque se detectaron dos bandas con pesos moleculares aproximados de 53.5 kDa para F2-1 y 43.5 kDa para F1, indicando una degradación parcial de F2-1 bajo condiciones reductoras del PAGE-SDS. Mientras que, en los controles negativos, correspondientes a la cepa transformada con el vector vacío pPICZαB, no se observó señal. Tomado de Siañez Estrada [10].

Paralelamente, construyó en el laboratorio cepas de *P. pastoris* productoras de la proteína F del RVP cepa PAC1, mediante la clonación de dos regiones génicas en el vector de expresión pPICZαB: la

región F1 (correspondiente a los aa 129 al 489, con un peso molecular estimado de 41 kDa) y la región F2-F1 (de los aa 23 al 489, con un peso aproximado de 53.5 kDa), ambas sin la región transmembran- al. Estas construcciones, denominadas pPICZ $\alpha$ -F1 y pPICZ $\alpha$ -F2-1, fueron integradas en el genoma de la levadura *P. pastoris* cepa X-33, obteniéndose cepas con fenotipo Mut<sup>+</sup>, nombradas X-33-F1 y X-33-F2-1. La expresión de la proteína F recombinante en ambas cepas fue confirmada mediante análisis por Western blot, utilizando sueros de cerdo infectados con distintas cepas de RVP, lo cual constituye el primer reporte que demuestra el reconocimiento de la proteína F en su forma recombi- nante por anticuerpos generados durante la infección natural (figura 13). Dichos resultados sugieren que, al ser reconocida por diferentes sueros, la proteína F representa un gran candidato para estudios de inmunogenicidad en modelos porcinos, y potencialmente útil como antígeno en el desarrollo de vacunas o en pruebas serológicas para la detección del virus [10].

### 3. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad del ojo azul (EOA), causada por el *Rubulavirus porcino* (RVP), ha representado un problema sanitario persistente en diversas regiones de la República Mexicana, provocando a lo largo de los años importantes daños reproductivos, respiratorios y neurológicos en porcinos de todas las edades, así como una elevada tasa de mortalidad. Aunque existen vacunas disponibles en el mercado, ninguna cuenta con evidencia científica sólida que respalde su eficacia, lo que ha evidenciado la necesidad de desarrollar nuevos métodos de detección y prevención. Ante este panorama, una de las estrategias exploradas para disminuir la incidencia de infección ha sido la producción de proteínas recombinantes capaces de inducir una respuesta inmune protectora. Particularmente, la proteína HN ha sido estudiada por su carácter inmunodominante; sin embargo, esta misma propiedad ha favorecido la aparición de variaciones genéticas en el virus que limitan su efectividad como antígeno universal, lo que ha impulsado la búsqueda de otros blancos antigénicos más conservados, como la proteína F. De esta manera, nuestro grupo de trabajo desarrolló una cepa recombinante de *Pichia pastoris*, denominada X-33-F1, diseñada para expresar el polipéptido recombinante F1 del RVP cepa PAC1, la cual fue reconocida por sueros de cerdo infectados con distintas cepas del virus, posicionándola como un candidato prometedor para continuar con estudios de inmunogenicidad en modelos porcinos.

No obstante, aunque inicialmente se logró la purificación del polipéptido F1 por Luis Ignacio Siañez Estrada en su tesis doctoral [10], durante la pandemia de COVID-19 (marzo-2020 a diciembre-2022) la viabilidad de la cepa se vio comprometida debido a factores externos relacionados con su almacenamiento a -80 °C.

Por lo que, la finalidad del presente trabajo fue confirmar que la cepa X-33-F1 aún conservaba su capacidad para producir el polipéptido F1 y proceder a su posterior purificación.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Producir el polipéptido F1 con la cepa productora X-33-F1 de *Pichia pastoris* y purificarlo mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados.

### 4.2. Objetivos específicos

- Producir el polipéptido F1 utilizando la cepa X-33-F1 de *Pichia pastoris*.
- Realizar la precipitación del polipéptido F1 en el cultivo libre de células a través de la adición de sulfato de amonio para concentrar la proteína.
- Purificar el polipéptido F1 utilizando tres condiciones diferentes de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados, para determinar la condición más efectiva.

## 5. MATERIAL Y METODOLOGÍA

### 5.1. Expresión del polipéptido F1

Para la inducción del polipéptido F1 se partió de un pre-cultivo de 10 mL de la cepa X-33-F1 y de la cepa control X-33 en medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% glucosa) crecidos durante 48 h a 30 °C en agitación constante. Posteriormente, los pre-cultivos se utilizaron para inocular 200 mL de medio BMGY (1% extracto de levadura, 2% peptona, 1.34% YNB, 0.0004% biotina, buffer fosfato de potasio 0.1 M a pH 6 y 1% glicerol) en matraces de 500 mL para aumentar de biomasa. Los matraces se incubaron por 24 h a 30 °C en agitación constante. El medio BMGY se centrifugó a 6,000 rpm por 15 min a 4 °C, se decanta el sobrenadante y las células son resuspendidas en 200 mL de medio BMMY (1% extracto de levadura, 2% peptona, 1.34% YNB, 0.0004% biotina, buffer fosfato de potasio 0.1 M a pH 6 y 1% metanol) e incubado en matraces de 500 mL a 30 °C en agitación constante. Cada 24 h se alimenta el cultivo con metanol puro estéril al 1% (v/v) durante 8 días para inducir la máxima expresión del polipéptido F1, el cual es excretado al medio extracelular. Además, se mide absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS 1900 de SHIMADZU a 600 nm cada día de inducción, utilizando una dilución de 1:10.

Se toman alícuotas de 5 mL cada día de inducción del cultivo X-33-F1, las cuales se centrifugan a 10,000 rpm por 15 min a 4 °C. El medio libre de células (sobrenadante) se recolecta y se almacena a -20 °C.

### 5.2. Precipitación con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Al octavo día de inducción, el medio BMMY es centrifugado a 6,000 rpm por 15 min a 4 °C. El pellet celular se desecha, y el medio libre de células es precipitado con sulfato de amonio al 80% de saturación, manteniéndolo en agitación suave durante 1 h a 4 °C. A continuación, se centrifuga a 6,000 rpm por 30 min a 4 °C. Se desecha el sobrenadante y el precipitado se resuspende en aproximadamente 2 mL (100 veces concentrado) de buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 8. Más tarde, los solubilizados X-33-F1 y X-33 control se exponen a un proceso de diálisis.

Asimismo, las alícuotas de 5 mL de cada día de inducción se tratan con sulfato de amonio al 80% de saturación, agitándose suavemente durante 30 min a 4 °C. Luego, se centrifugan a 10,000 rpm por 15 min a 4 °C, y el precipitado se resuspende en 50  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 8. Los solubilizados 1-8 X-33-F1 son almacenados a -20 °C para su posterior cuantificación.

### 5.3. Diálisis del solubilizado proteico

Los solubilizados proteicos de la cepa control X-33 y de la cepa X-33-F1 se dializan toda la noche a 4 °C en agitación constante, utilizando una bolsa de celulosa y un buffer fosfato de potasio 50 mM a pH 8, en un volumen 50 veces mayor que el de los solubilizados. Transcurrido el tiempo, se realiza un recambio de la solución amortiguadora, dejándola por 2 h a 4 °C en agitación suave. Los dializados se recuperan y alícuotan en tubos Eppendorf con una jeringa para la determinación de proteínas.

Por otro lado, las fracciones recolectadas de la cromatografía (no pegado, lavado y elución) se dializaron con buffer Tris-HCl 4 mM a pH 8, en un volumen 50 veces mayor, durante toda la noche a 4 °C con agitación suave. Después, las fracciones se recuperan, se alícuotan en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se congelan a -80 °C toda la noche para su liofilización al día siguiente.

### 5.4. Determinación de proteínas totales por el método de Sedmak y Grossberg [49]

En primer lugar, se desarrolla una curva de calibración utilizando la albúmina sérica bovina (BSA) como proteína estándar a concentraciones de 2, 4, 7, 10 y 14 µg a partir de una solución de trabajo de 0.1 mg/mL de BSA. Para las muestras se tomaron 10 µL de cada dializado proteico (X-33 control y X-33-F1) y de 5-10 µL de los solubilizados proteicos de cada día de inducción (1-8 X-33-F1). Se añadió agua Milli-Q estéril para completar 500 µL, seguido de 500 µL de solución azul de Coomassie G-250 al 0.06% en ácido perclórico al 3% (w/v). Todos los tubos se dejaron reposar en la oscuridad durante 10 min a temperatura ambiente, y se midió la absorbancia a 620 nm. El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

La curva de calibración se construyó graficando las lecturas de absorbancia en el eje y frente a las concentraciones de la proteína estándar (BSA) en µg en el eje x. Para la interpolación, es fundamental que los valores obtenidos de absorbancia de cada muestra se encuentren dentro del rango de la curva patrón; de lo contrario, se realizó una dilución para determinar el valor de proteínas totales en µg/µL.

### 5.5. Concentración de proteínas para PAGE-SDS

#### 5.5.1. Precipitación de proteínas con acetona

En tubos Eppendorf, se añaden 9 volúmenes de acetona a un volumen de dializados proteicos (entre 100 y 300 µL). Luego, se incuban a -20 °C y se mezcla por inversión cada 30 min durante 2 h. Enseguida, se centrifuga a 10,000 rpm por 15 min a 4 °C. Se decanta el sobrenadante y se deja secar el precipitado por 10 min a temperatura ambiente. A continuación, el pellet se resuspende en 30 a 60 µL

de buffer reductor 1X y se coloca en baño maría a 100 °C por 5 min. Finalmente, se deja enfriar y se almacena a -20 °C, o bien, se carga directamente en el gel para PAGE-SDS.

### **5.5.2. Liofilización**

Las fracciones de cromatografía (no pegado, lavado y elución), que fueron previamente dializadas y congeladas a -80 °C, se colocan en un liofilizador Freeze Dryer 4.5 de LABCONCO. El liofilizador se enciende a una temperatura de -50 °C y se mantiene a una presión de 25 micrones a lo largo de toda la noche, o hasta obtener un polvo en el fondo del tubo. Más tarde, el polvo es resuspendido en 15 µL de buffer reductor 1X y colocado en baño maría 5 min a 100 °C. Dejar enfriar y almacenar a -20 °C, o bien, cargar directamente en el gel para PAGE-SDS.

### **5.6. Desnaturalización de proteínas para PAGE-SDS**

Para los solubilizados proteicos de cada día de inducción (1-8 X-33-F1), se preparó una dilución 2:4 del equivalente a 10 µg de proteínas con buffer reductor 4X (8% SDS, 40% glicerol, 20% b-mercaptoetanol, tris-HCl 0.25 M a pH 6.8 y una pizca de azul de bromofenol), asegurando una mezcla homogénea. Posteriormente, las muestras se colocan en un baño maría a 100 °C por 5 min, se dejan enfriar y se almacenan a -20 °C, o bien, se cargan directamente en el gel de poliacrilamida.

### **5.7. Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)**

Para preparar el gel de poliacrilamida en un equipo Mini-PROTEAN de Bio-Rad, se vertieron primero 4.5 mL del gel separador/corrida al 12% de acrilamida (tabla 1) en el molde, seguido de 500 µL de metanol puro o alcohol etílico al 70% para eliminar burbujas de aire. Una vez que el gel se solidificó, se retiró el metanol y se añadió 1 mL del gel separador al 4% de acrilamida (tabla 2). Finalmente, se colocó un peine de 10 pozos. Ambos geles contienen un buffer Tris-HCl para mantener el pH, dodecilsulfato sódico (SDS) como agente desnaturante, persulfato de amonio (PSA) como iniciador de la polimerización y TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletano-1,2-diamina) como acelerador de la polimerización.

Se cargan las muestras y 3 µL del marcador de peso molecular PageRuler Plus de Thermo Fisher Scientific en los pocillos del gel. Después, se hace la corrida en el gel concentrador a 80 V por 1 h, o hasta que las muestras entren en el gel y se alineen correctamente antes de la separación. Cuando el frente de corrida se encuentre sobre la marca del gel separador, se aumenta el voltaje a 120 V por aproximadamente 2 hrs. La electroforesis se lleva a cabo en buffer de corrida a pH 8.3 (tris-base 25 mM, glicina 192 mM y 0.1% SDS) para el paso de la corriente eléctrica y mantenimiento del pH.

**Tabla 1.** Composición del gel de poliacrilamida al 12%.

<b>Gel separador/corrida (12%)</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen (5 mL)</b>	<b>Concentración final</b>
Agua tridestilada estéril	1.025 mL	---
Tris-HCl 1 M, pH 8.8	1.875 mL	0.375 M
Bis/Acrilamida 30%, solución 29:1	2 mL	12%
SDS 10%	50 $\mu$ L	0.1%
PSA 10%	50 $\mu$ L	0.1%
TEMED	5 $\mu$ L	0.1%

**Tabla 2.** Composición del gel de poliacrilamida al 4%.

<b>Gel concentrador (4%)</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen (3 mL)</b>	<b>Concentración final</b>
Agua tridestilada estéril	1.790 mL	---
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	750 $\mu$ L	0.125 M
Bis/Acrilamida 30%, solución 29:1	400 $\mu$ L	4%
SDS 10%	30 $\mu$ L	0.1%
PSA 10%	30 $\mu$ L	0.1%
TEMED	3 $\mu$ L	0.1%

## 5.8. Tinción con azul de Coomassie R-250

Más tarde, el gel de poliacrilamida se sumerge durante toda la noche en una solución de tinte con 0.05% de azul de Coomassie R-250, 10% de ácido acético glacial y 50% de metanol. En el siguiente paso, se retira el exceso de color mediante una solución de desteñido compuesta por 10% de ácido acético glacial y 50% de metanol, agitando por 40 a 60 min. Finalmente, el gel se lava con agua Milli-Q estéril hasta eliminar el colorante residual.

## 5.9. Western blot (Inmunotransferencia)

Al concluir el PAGE-SDS, se llevó a cabo una transferencia semi-seca en un Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell de Bio-Rad, empleando una membrana Immobilon-P de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m. Primero, la membrana se cortó al tamaño del gel y se activó sumergiéndola en metanol durante 30 s. Después, se realizó un lavado de 5 min con agua Milli-Q estéril, seguido de 10 min con el buffer de transferencia (BT), que consiste en 25 mM de tris-base,

192 mM de glicina, 0.1% de SDS y 20% de metanol. Así mismo, el gel de poliacrilamida se lavó en BT durante 10 min.

Subsecuentemente, sobre el plato del sistema de transferencia se colocó un papel filtro previamente humedecido por capilaridad con BT. Pronto, se dispuso la membrana, seguida del gel que contiene las proteínas separadas. Finalmente, se colocó otro papel filtro humedecido encima, evitando la formación de burbujas. La transferencia se realizó a 0.3 A, 50 V durante 45 min. Al terminar, se lavó la membrana con agua Milli-Q estéril por 10 min y se tiñó con una solución roja de Ponceau (0.5% rojo de Ponceau y 1% metanol) entre 25 a 30 s para visualizar las bandas de proteína. La eliminación del colorante se realizó mediante lavados de 10 min con agua Milli-Q estéril, repitiendo el proceso hasta lograr su completa desaparición.

A continuación, se lavó la membrana con buffer TBS-Tween a pH 8 (tris-base 20 mM, NaCl 150 mM, 0.1% Tween-20) por 10 min. Posteriormente, se incubó en una solución de bloqueo compuesta por 5% de leche descremada diluida en TBS-Tween, durante 1 h a temperatura ambiente o, alternativamente, durante toda la noche a 4 °C. Luego, se realizaron tres lavados con TBS-Tween, cada uno de 10 min. Tras el lavado, la membrana se incubó en una dilución 1:5000 del anticuerpo Anti-His (C-Term)-HRP de Invitrogen, en buffer TBS-Tween, por 1 h a temperatura ambiente o, de nuevo, durante toda la noche a 4 °C. Finalmente, se repitieron los tres lavados, cada uno de 10 min.

Para el revelado, se preparó una mezcla 1:1 de luminol y peróxido de hidrógeno (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate), que se depositó sobre la membrana. Por último, la membrana se acomodó entre dos hojas de acetato y se posicionó boca abajo sobre un escáner C-Digit Blot Scanner LI-COR para visualizar la reacción quimioluminiscente.

## 5.10. Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC-NTA-Ni)

Para la purificación del polipéptido F1, se llevaron a cabo tres cromatografías utilizando diferentes condiciones de buffer de unión (BU), lavado (BL) y elución (BE), empleando una columna HisTrap FF de Cytiva con una matriz de níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) inmovilizado en sefarosa. En este sistema, la etiqueta de 6xHis del polipéptido interacciona específicamente con los iones metálicos de  $\text{Ni}^{2+}$ , facilitando la separación de F1 de otras proteínas no deseadas.

Primero, se prepararon 4 mL de dializado proteico (X-33-F1), incorporando NaCl en una concentración de 0.3 a 0.5 M, de acuerdo con los buffers usados para cada condición de cromatografía. Además, el dializado se filtró a través de un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  para eliminar contaminantes.

Por otro lado, la columna se colocó en posición vertical con un soporte universal y se procedió a adicionar el siguiente orden de soluciones:

Sanitización de la resina NTA-Ni:

- a. 3 VC de agua Milli-Q estéril.
- b. 0.5 VC de EDTA 0.05 M.
- c. 2 VC de NaCl 0.5 M.
- d. 3 VC de agua Milli-Q estéril.
- e. 2 VC de NaOH 0.2 M.
- f. 3 VC de agua Milli-Q estéril.

Activación de la resina NTA-Ni:

- g. 0.5 VC de  $\text{NiCl}_2$  2 M.
- h. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
- i. 5 VC de NaCl 0.5 M.
- j. 3 VC de agua Milli-Q estéril.

Equilibrio de la resina NTA-Ni:

- k. 5 VC de BU en las siguientes condiciones:
  - ♦ Cromatografía 1: buffer fosfato de potasio 50 mM a pH 8 y NaCl 0.3 M.
  - ♦ Cromatografía 2: buffer fosfato de potasio 50 mM a pH 8 y NaCl 0.5 M.
  - ♦ Cromatografía 3: buffer fosfato de potasio 50 mM a pH 8 y NaCl 0.4 M.
- l. Tapar la columna y dejar incubar en agitación lenta durante 20 min a 4 °C.

Incubación de la muestra:

- m. Añadir 4 mL de dializado proteico.
- n. Tapar la columna y dejar incubar en agitación lenta durante 2 h a 4 °C.
- o. Eluir el contenido de la columna y recolectar en fracciones de 2 mL correspondiente a la etapa de no pegado (NP).

Lavado de la columna:

- p. 8 VC de BL en las siguientes condiciones:
  - ♦ Cromatografía 1: buffer fosfato de potasio 50 mM a pH 8, NaCl 0.3 M e imidazol 10 mM.
  - ♦ Cromatografía 2: buffer fosfato de potasio 50 mM a pH 8 y NaCl 0.5 M.
  - ♦ Cromatografía 3: buffer fosfato de potasio 50 mM a pH 8, NaCl 0.4 M e imidazol 10 mM.En esta cromatografía, se añadieron 4 VC del BU y posteriormente 4 VC del BL.

- q. Eluir el contenido de la columna y recolectar en fracciones de 2 mL correspondiente a la etapa de lavado (L).

Elución de la columna:

- r. 3 VC de BE en las siguientes condiciones:
- ♦ Cromatografía 1: buffer fosfato de potasio 50 mM a pH 8, NaCl 0.3 M e imidazol 300 mM.
  - ♦ Cromatografía 2: buffer fosfato de potasio 50 mM a pH 8, NaCl 0.5 M e imidazol 500 mM.
  - ♦ Cromatografía 3: buffer fosfato de potasio 50 mM a pH 8, NaCl 0.4 M e imidazol 400 mM.
- s. Eluir el contenido de la columna y recolectar en fracciones de 2 mL correspondiente a la etapa de elución (E).

Regeneración de la resina:

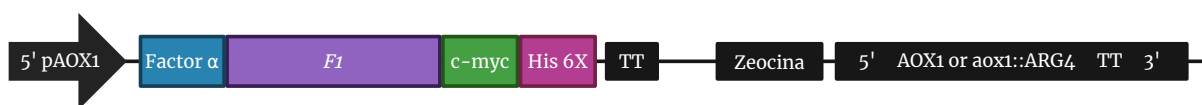
- t. 3 VC de agua Milli-Q estéril.
- u. 0.5 VC de EDTA 0.05 M.
- v. 2 VC de NaCl 0.5 M.
- w. 3 VC de agua Milli-Q estéril.
- x. 2 VC de NaOH 0.2 M.
- y. 3 VC de agua Milli-Q estéril.
- z. 1.5 VC de etanol al 20% para conservar la columna a 4 °C.

Al finalizar, se mide la D.O. de las fracciones recolectadas a 280 nm, utilizando los buffers correspondientes de cada etapa como blancos. Además, las fracciones se someten a diálisis, liofilización y análisis por Western blot.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cepa de *Pichia pastoris* productora de F1 (X-33-F1)

En este estudio se utilizó la cepa X-33-F1, construida en 2019 en el laboratorio por Luis Ignacio Siañez Estrada en su tesis doctoral [10]. Esta cepa contiene el ORF del gen foráneo, correspondiente al polipéptido F1 de la proteína F del *Rubulavirus porcino*, en el genoma de la cepa X-33 de *P. pastoris* mediante recombinación homóloga con el gen *AOX1*, lo que dio lugar a un fenotipo Mut<sup>+</sup> que permite su crecimiento en presencia de metanol (figura 14).



**Figura 14.** Integración del ORF del gen *F1* en el genoma de *P. pastoris*. Se muestra el fenotipo Mut<sup>+</sup> resultante de la inserción del gen *F1* por desplazamiento en el cromosoma 4 de *P. pastoris*. Tomado de la tesis de Siañez Estrada [10] y adaptado de Invitrogen [56].

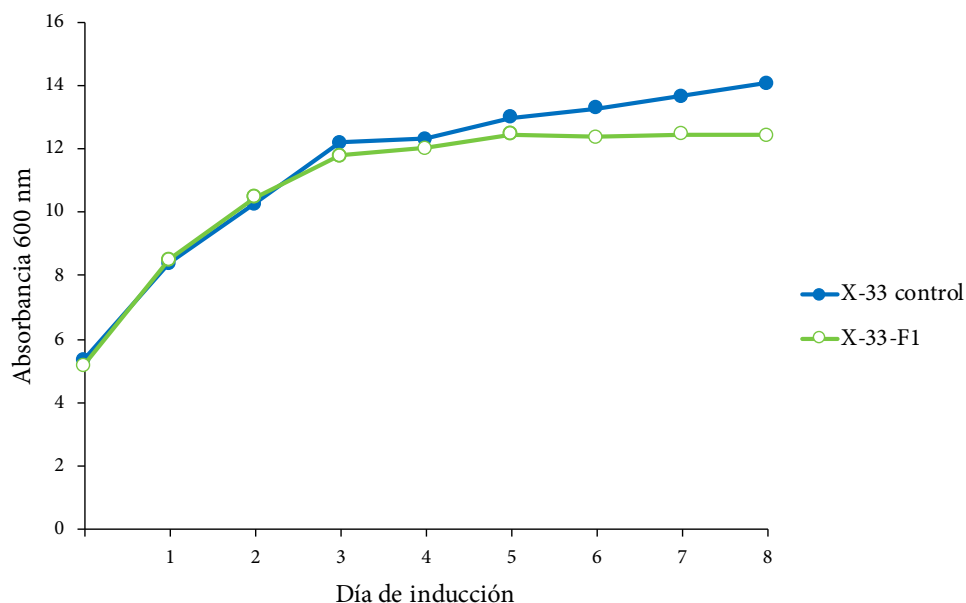
Por otra parte, el ORF de gen *F1*, está flanqueado en el extremo N-terminal por el factor  $\alpha$ , un péptido señal que promueve la secreción del polipéptido al medio extracelular. Asimismo, en el extremo C-terminal se encuentra una etiqueta c-Myc y un motivo de 6xHis, lo que facilita su reconocimiento como polipéptido recombinante y su posterior purificación.

### 6.1. Inducción con metanol de la cepa productora X-33-F1

La cepa productora X-33-F1 y la cepa control X-33 fueron cultivadas inicialmente en un medio con glicerol como fuente de carbono, con el objetivo de obtener una cantidad significativa de biomasa celular durante su fase media exponencial, pero antes de alcanzar la fase estacionaria. Esto permitió que, al sustituir su alimentación del glicerol por metanol como fuente de carbono, se contara con un número adecuado de células para favorecer una alta expresión del polipéptido recombinante F1.

Posteriormente, se evaluó el crecimiento de las cepas, productora y control, en presencia de metanol durante la fase de inducción para la producción del polipéptido F1. La densidad óptica fue medida a lo largo del periodo de inducción del polipéptido recombinante F1, utilizando esta técnica como un método indirecto para estimar la concentración celular, donde un aumento en la densidad óptica indica un aumento en la turbidez del medio, resultado del crecimiento y división de las células [50].

Como se muestra en la figura 15, las células siguieron duplicándose durante los primeros tres días de inducción con metanol, aunque a un ritmo lento, dado que el metanol representa una fuente de carbono de difícil acceso. A partir del cuarto día, no se observó un crecimiento significativo, lo que indicó que las células entraron en fase estacionaria, considerado un crecimiento típico de levaduras según lo descrito por Karbalaeei et al. [40]. Dado que la absorbancia se mantuvo casi constante el resto de los días (4 al 8) nos indicó que las células se encuentran viables metabólicamente.



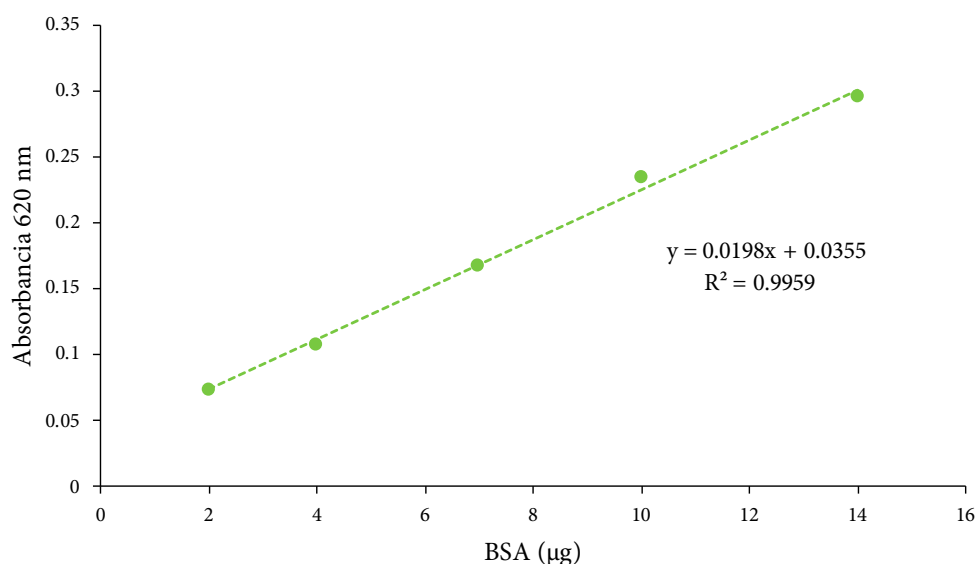
**Figura 15. Crecimiento celular con metanol de la cepa productora X-33-F1 y control X-33.** Curva obtenida a partir de cultivos de 200 mL, alimentados con metanol al 1% (v/v) a 30 °C en agitación constante durante 8 días. No se observaron cambios en la viabilidad de la cepa productora de F1 en comparación con la cepa no transformada X-33.

Asimismo, se observó que tanto la cepa control X-33 como la cepa productora X-33-F1, sometidas a las mismas condiciones durante los ocho días de inducción, no presentaron diferencias en su densidad celular. Además, se identificó el cambio de fase de crecimiento de exponencial a estacionaria en ambas cepas. Esto nos sugiere que, al tener un tiempo de duplicación similar, la expresión y producción del polipéptido F1 en la cepa productora no altera la viabilidad de la levadura.

## 6.2. Concentración de proteínas durante la inducción con metanol del cultivo de la cepa productora X-33-F1

Con el objetivo de conocer las proteínas presentes a lo largo de los ocho días de inducción con metanol, se tomaron muestras diarias de los cultivos. Dado que el polipéptido F1 producido contiene un péptido señal (factor  $\alpha$ ) que promueve su secreción al medio extracelular, se determinaron las proteínas en el medio libre de células. Para ello, las muestras fueron sometidas a un proceso de precipitación por sales, seguido de su recuperación para posterior análisis.

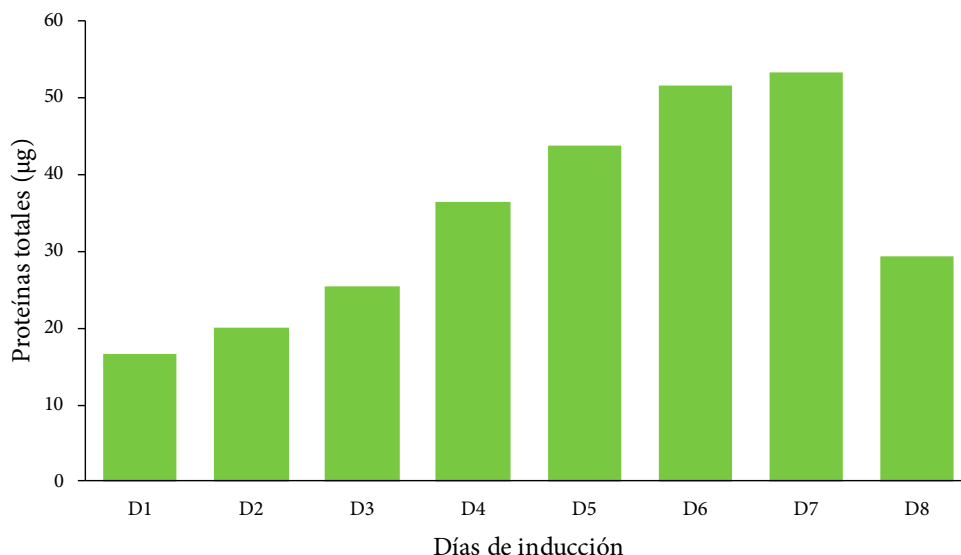
La figura 16 nos muestra la curva de calibración que se utilizó para la cuantificación de proteínas de nuestras muestras, observando una buena correlación lineal entre la concentración de proteína estándar y la absorbancia medida, lo que valida la confiabilidad del método empleado.



**Figura 16. Curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como proteína estándar.** Se pusieron 2, 4, 7, 10 y 14 µg de BSA y se realizó un ajuste lineal obteniendo una ecuación de la recta  $y = 0.0198x + 0.0355$  con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.9959. Método utilizado de Sedmak y Grossberg (1977) [49].

Paralelamente a la curva de calibración, se cuantificaron las proteínas de nuestras muestras. En la figura 17 se presenta la concentración de proteínas totales, obtenida durante la inducción del polipéptido F1 durante los ocho días con metanol. De forma general, se observó un aumento significativo en los niveles de proteína desde el día 1 hasta el día 7, alcanzando una concentración aproximadamente tres veces mayor al séptimo día. En el día 8, se detectó una disminución significativa en la concentración de proteínas, posiblemente atribuible al envejecimiento celular y la presencia de células no viables. Con este resultado podemos considerar que un período de inducción de 7 días con metanol es suficiente para alcanzar una producción óptima de proteínas.

Cabe destacar que la secuencia que codifica para F1, al incluir el factor  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*, no solo facilita la secreción del polipéptido recombinante al medio extracelular, sino que también contribuye al aumento de la concentración de proteínas en el sobrenadante del cultivo. Esto se ha observado en trabajos de producción de otras proteínas recombinantes en *P. pastoris* como lo reportó Hartwing et al. [51] en la expresión de rLigANI y rLipL32 y Li et al. [52] en la producción de fitasa de *Citrobacter amalonaticus*.



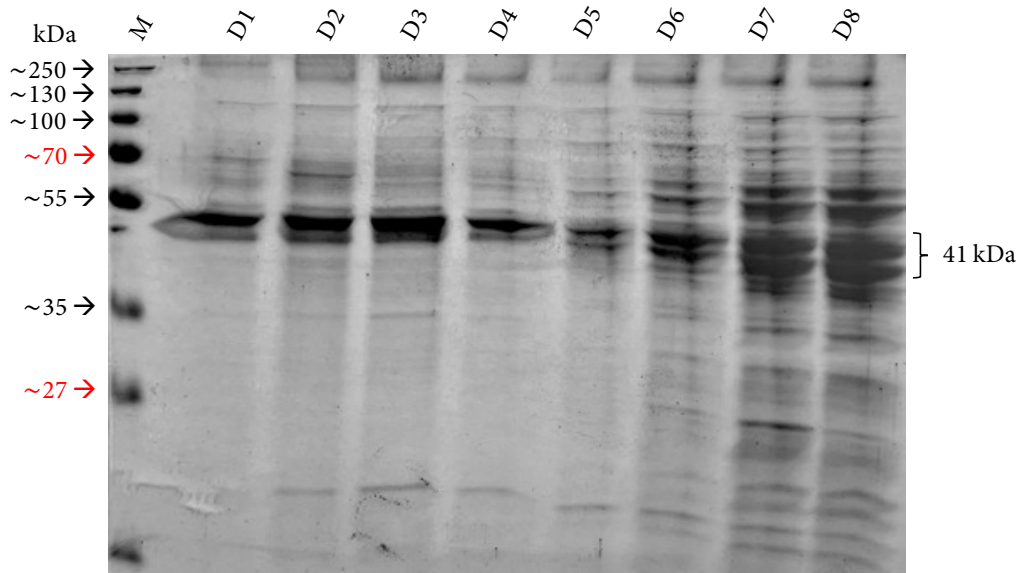
**Figura 17. Concentración de proteínas totales durante la inducción con metanol.** El gráfico muestra la cantidad de proteínas totales durante 8 días de inducción de la cepa X-33-F1. Determinado en el sobrenadante de 5 mL de cultivo recolectado de un matraz de 200 mL.

### 6.3. Perfil de cadenas polipeptídicas durante la inducción con metanol del cultivo X-33-F1, por electroforesis (PAGE-SDS)

Se llevó a cabo un análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS), con el fin de evaluar la variación en los perfiles de cadenas polipeptídicas presentes durante la inducción con metanol. Esta técnica permitió obtener una resolución más detallada de las proteínas presentes en las muestras, facilitando tanto su identificación como la observación de posibles cambios en su expresión a lo largo del tiempo.

Según se muestra en la figura 18, se observó un conjunto de bandas proteicas a lo largo de todos los días de inducción, siendo más abundante el número de bandas los días 6, 7 y 8. También se identificó una banda más intensa alrededor de 41 kDa, según la referencia de las proteínas estándar ubicadas en el carril izquierdo. Puesto que, el polipéptido F1 posee un peso molecular de ~41 kDa, la presencia consistente de esta banda sugiere ser el polipéptido de F1 recombinante. Resultados pare-

cidos fueron reportados previamente en nuestro laboratorio por Siañez Estrada [10], lo cual respalda esta observación. Estos hallazgos sugirieron que la cepa productora que estamos utilizando sigue expresando y produciendo proteínas.



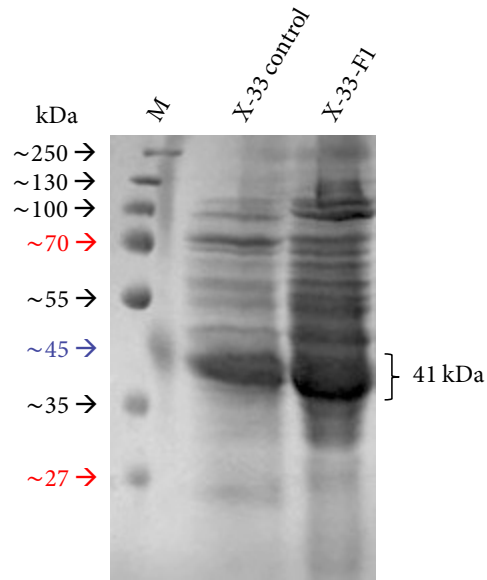
**Figura 18. Cadenas polipeptídicas durante la inducción con metanol producidas en el medio de cultivo de *P. pastoris* que expresa el polipéptido F1.** Se presenta un gel de PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie, en el que se cargaron 20  $\mu$ g de proteína correspondientes a los días 1 al 8 de expresión inducida con metanol. M: marcador de peso molecular.

#### 6.4. Identificación del polipéptido recombinante F1 por Western blot

Para poder confirmar que la banda de proteína observada en el PAGE-SDS a la altura de 41 kDa es F1, utilizamos la técnica de Western blot, basada en la identificación de la etiqueta 6xHis ubicada en el extremo C-terminal de F1, mediante un anticuerpo específico Anti-His.

Con las condiciones precedentes obtenidas, se realizó un cultivo de 200 mL induciendo la cepa productora X-33-F1 con metanol por 7 días y corriendo al mismo tiempo un cultivo con la cepa control X-33. Luego, se trabajó con el medio libre de células, a partir del cual se precipitaron las proteínas, se procedió a concentrar en una proporción 1:100 y a dializarlos para su estudio.

En primer lugar, se corrió un gel PAGE-SDS, que permitió observar la presencia de una banda polipeptídica alrededor de 41 kDa. En la figura 19, se observa en el carril de la cepa X-33-F1 una banda más intensa en esta región en comparación con el carril de la cepa control X-33. Dicha banda corresponde al peso molecular esperado del polipéptido F1, sugiriendo que podría tratarse de la proteína de interés.



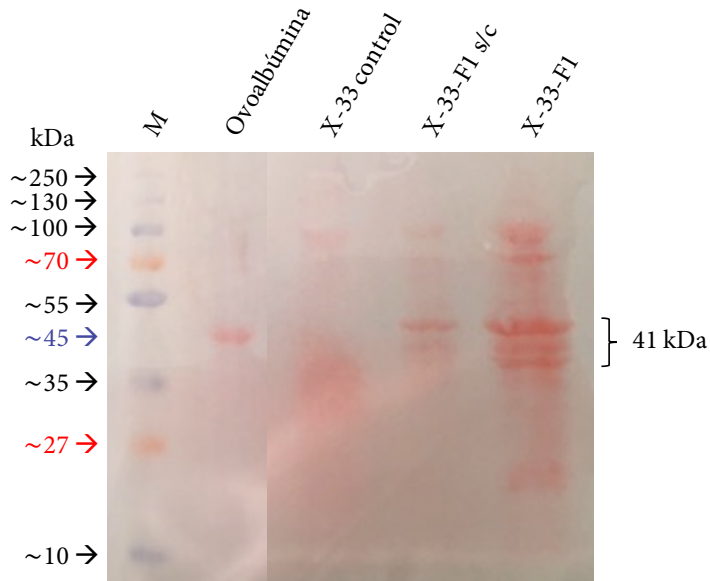
**Figura 19. Cadenas polipeptídicas de los concentrados y dializados proteicos de *P. pastoris* productora (X-33-F1) y control (X-33).** Se presenta un gel PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie, en el que se cargaron 100  $\mu$ L de los dializados proteicos obtenido de las cepas. M: marcador de peso molecular.

Una vez confirmada la presencia de bandas polipeptídicas relevantes, se procedió con el análisis por Western blot. Para esto, se hizo primero el PAGE-SDS, seguido de la transferencia de las proteínas desde el gel hacia una membrana. La eficiencia de la transferencia de proteínas se verificó tiñendo con Rojo de Ponceau, un colorante que se une a las proteínas a través de interacciones no específicas, permitiendo visualizar las proteínas transferidas en la membrana.

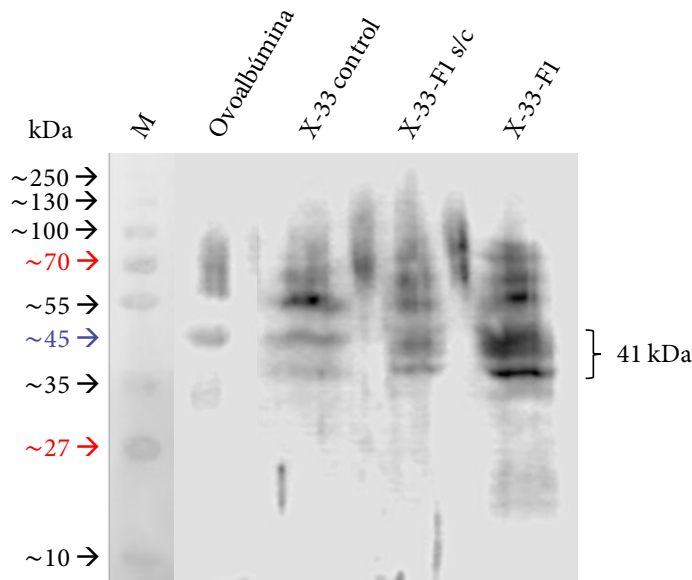
La figura 20 nos muestra una transferencia uniforme de proteínas, destacando alrededor de 41 kDa una banda que posiblemente sea F1. Además, se comparó una muestra de F1 dializada sin concentrar (s/c) con una muestra concentrada con acetona, evidenciando que la detección de proteínas es más eficiente en la muestra concentrada.

Finalmente, la detección específica del polipéptido F1 se llevó a cabo utilizando un anticuerpo (Anti-His), dirigido contra la etiqueta de 6xHis localizada en su extremo C-terminal. En la figura 21, se visualizó una banda aproximadamente a 41 kDa en ambas muestras de la cepa productora X-33-F1. Aunque la diferencia más notable entre las muestras fue la intensidad de la señal, siendo considerablemente mayor en la muestra concentrada. En contraste, la señal en el carril de la cepa control, al ser difusa y sin una forma definida, así como otras bandas observadas de más de 45 kDa sugiere una unión inespecífica, probablemente atribuible a una cantidad elevada de anticuerpo, a un bloqueo ineficiente de la membrana, o bien que dichas proteínas tengan en su superficie dos histidinas cercanas, capaces de interactuar débilmente con el anticuerpo Anti-His.

Este resultado de Western blot indica que las bandas detectadas a ~41 kDa en las muestras dializadas de la cepa X-33-F1 corresponden al polipéptido F1.



**Figura 20. Membrana teñida con rojo de Ponceau de los dializados X-33-F1 y X-33 control.** Se muestran las proteínas teñidas de color rojo en una membrana de PVDF, donde se cargaron 100  $\mu$ L de los dializados proteicos de las cepas X-33-F1 y X-33 control, previamente precipitados con acetona, así como 20  $\mu$ L del dializado proteico de la cepa X-33-F1 sin concentrar (s/c). M: marcador de peso molecular.



**Figura 21. Western blot de los dializados X-33-F1 y X-33 control.** Señal quimioluminiscente obtenida utilizando un anticuerpo anti-histidina. Se cargaron 100  $\mu$ L de los dializados proteicos de las cepas X-33-F1 y X-33 control, previamente precipitados con acetona, así como 20  $\mu$ L del dializado proteico de la cepa X-33-F1 sin concentrar (s/c). M: marcador de peso molecular.

## 6.5. Purificación del polipéptido recombinante F1 por IMAC-NTA-Ni

Para la siguiente etapa del trabajo, se purificó el polipéptido F1 por cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC), una técnica ampliamente utilizada para la separación de proteínas en procesos de término, utilizando la interacción entre proteínas con grupos funcionales histidina e iones metálicos divalentes ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ). En esta ocasión, utilizamos una resina de Sepharose-NTA-Ni, ampliamente recomendada para purificar proteínas recombinantes que tienen una etiqueta 6xHis, permitiendo una captura eficiente selectiva del polipéptido de interés.

En un principio, seguimos las condiciones previamente reportadas en nuestro laboratorio, descritas en la tesis doctoral de Luis Ignacio Siañez Estrada [10]. Sin embargo, no fue posible replicar los resultados reportados de la tesis de referencia, ya que durante la pandemia (2020-2021), aunque las cepas productoras obtenidas se encontraban almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el ultracongelador presentó fallas continuas que provocaron elevaciones de temperatura, afectando la viabilidad o capacidad productora de las cepas.

Por lo anterior, tuvimos que buscar condiciones alternas para las etapas de pegado, lavado y elución de la F1 en la columna. Tras realizar una revisión bibliográfica, decidimos aplicar tres condiciones diferentes para el proceso de purificación.

La tabla 3 nos resume las condiciones utilizadas para la purificación.

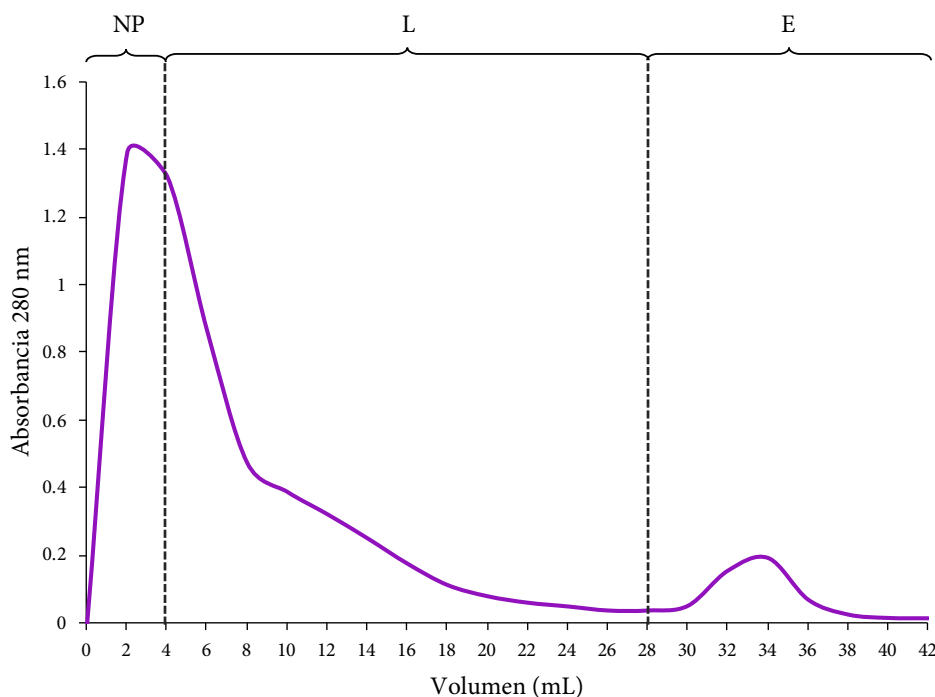
**Tabla 3.** Condiciones de purificación de la F1 por IMAC-NTA-Ni.

Cromatografía	Buffer de unión	Buffer de lavado	Buffer de elución
1	Buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 8 y NaCl 0.3 M	Buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 8; NaCl 0.3 M e imidazol 10 mM	Buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 8; NaCl 0.3 M e imidazol 300 mM
2	Buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 8 y NaCl 0.5 M	Buffer fosfato de potasio 50 mM, pH; NaCl 0.5 M	Buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 8; NaCl 0.5 M e imidazol 500 mM
3	Buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 8 y NaCl 0.4 M	Buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 8; NaCl 0.4 M e Imidazol 10 mM	Buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 8; NaCl 0.4 M e imidazol 400 mM

En el buffer de unión no se añadió imidazol, con el fin de evitar la competencia directa con los motivos de histidina del polipéptido F1 durante su interacción inicial con la resina. En dos de los buffers de lavado se utilizó una baja concentración de imidazol de 10 mM, para minimizar la unión inespecífica de proteínas contaminantes sin comprometer significativamente la retención del polipéptido de interés, que posee una etiqueta 6xHis. Para la etapa de elución, se emplearon concentraciones de imidazol en un rango de 300 a 500 mM.

En los cromatogramas presentados (figuras 22, 24, 26) se observa lo siguiente: a) fracción NP (no pegado), donde la mayoría de las proteínas presentes no se unen a la resina por la ausencia de motivos de histidina, que son necesarios para la interacción con el níquel en la columna; b) fracción L (lavado), la cual contiene las proteínas que no se retuvieron durante la etapa de carga, así como aquellas que tienen una unión débil con la resina; y c) fracción E (elución), que muestra un aumento en la absorbancia debido a la desorción de las proteínas que sí se unieron al níquel en la columna. Esta desorción es resultado del incremento en la concentración de imidazol, que compite con los motivos de histidina por los sitios de unión al níquel, desplazando así al polipéptido de interés F1.

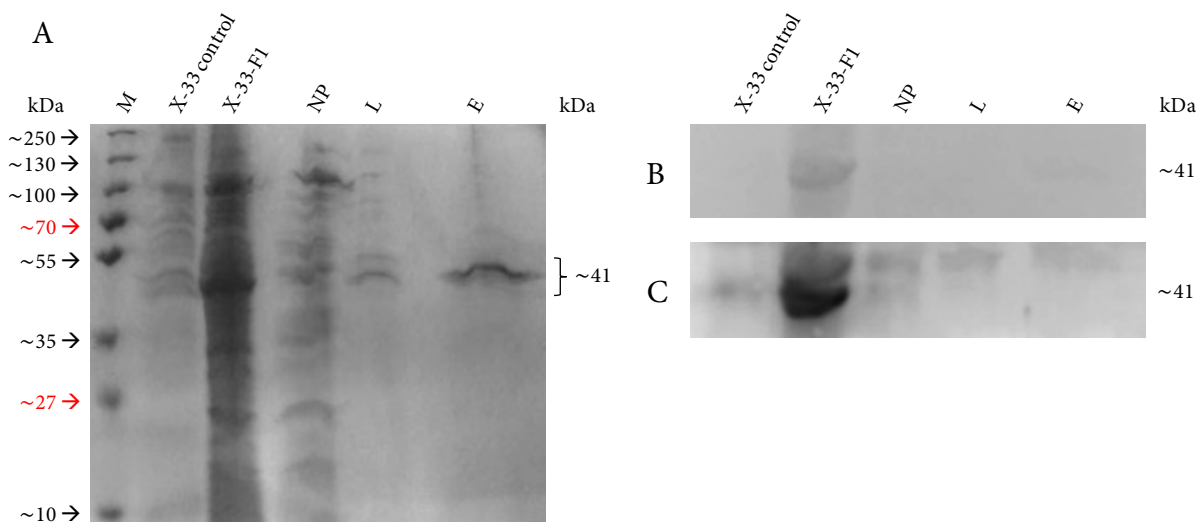
Dicho lo anterior, en la figura 22 se presenta el primer cromatograma de las fracciones de purificación, obtenido con una concentración de NaCl de 0.3 M en todos los buffers (unión, lavado y elución). Se observó un pico mayoritario al inicio, que corresponde a la proteína que no se pegó a la resina (NP). Durante el lavado, se empleó un buffer con 10 mM de imidazol, y se evidenció la continua elución de proteínas. Una vez que se observó que ya no eluyeran proteínas, se procedió a la elución con un buffer de 300 mM de imidazol obteniendo un pequeño pico de proteínas. Con esto, el resultado indicó que parte de la proteína que tenía afinidad por el níquel (correspondiente al polipéptido F1) se unió a la resina y fue eluida tras el incremento en la concentración de imidazol.



**Figura 22. Perfil de elución 1 de la purificación de F1.** Cromatograma de fracciones recolectadas cada 2 mL en una columna con capacidad de 5 mL (Sephacrose-NTA-Ni) cargada con 4 mL de dializado proteico X-33-F1. NP: no pegado, L: lavado, E: elución. Condiciones: BU=buffer fosfatos de potasio 50 mM, pH 8 + NaCl 0.3 M, BL=BU + Imidazol 10 mM y BE=BU + Imidazol 300 mM.

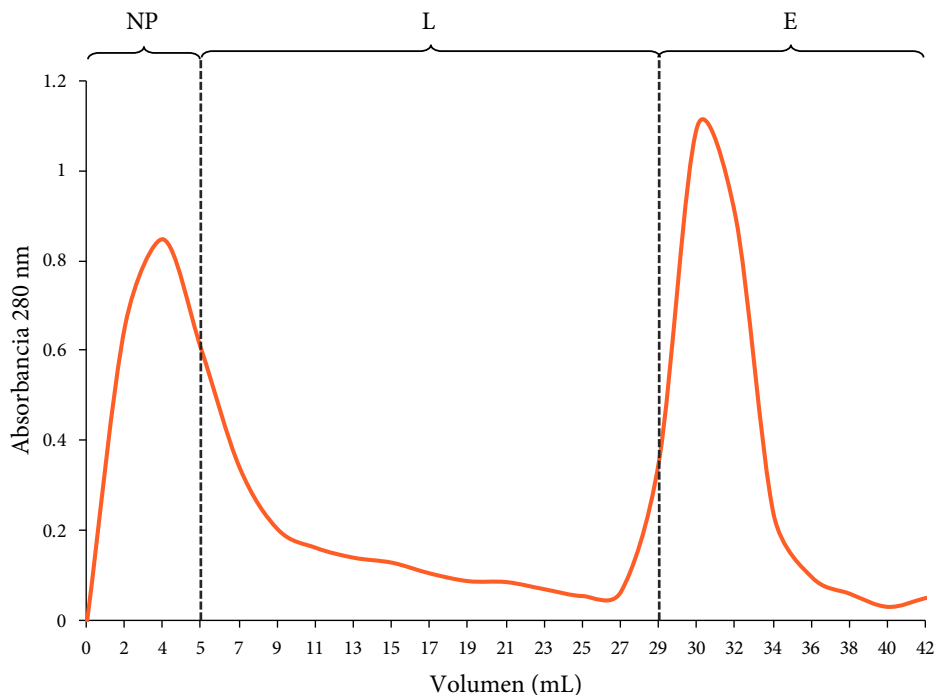
Para corroborar estos resultados se hizo un análisis mediante PAGE-SDS y un Western blot para confirmar la pureza y la identidad de F1.

En la figura 23a, se presenta un gel que incluye las tres fracciones de la purificación, las cuales fueron dializadas para eliminar sales y liofilizadas para permitir la carga de más proteína en el gel. También, se incluyeron 50 µL precipitados con acetona de los dializados proteicos X-33 control y X-33-F1 para comparación. La banda que se observó en la elución (E), con un tamaño aproximado de 41 kDa, sugiere que podría corresponder al polipéptido F1. Más tarde, esta banda fue analizada por Western blot (figura 23c), donde se detectó muy buena señal para el dializado X-33-F1, pero no para el carril de la elución. Es posible que la transferencia del gel no haya sido óptima, como se ven en la figura 23b, donde se observan bandas muy tenues en la membrana teñida con rojo de Ponceau en el carril de la muestra E. Otra posibilidad es que la concentración de F1 obtenida en la elución haya sido muy baja, lo que habría afectado la detección del polipéptido de interés ya en el revelado con anticuerpos Anti-His.



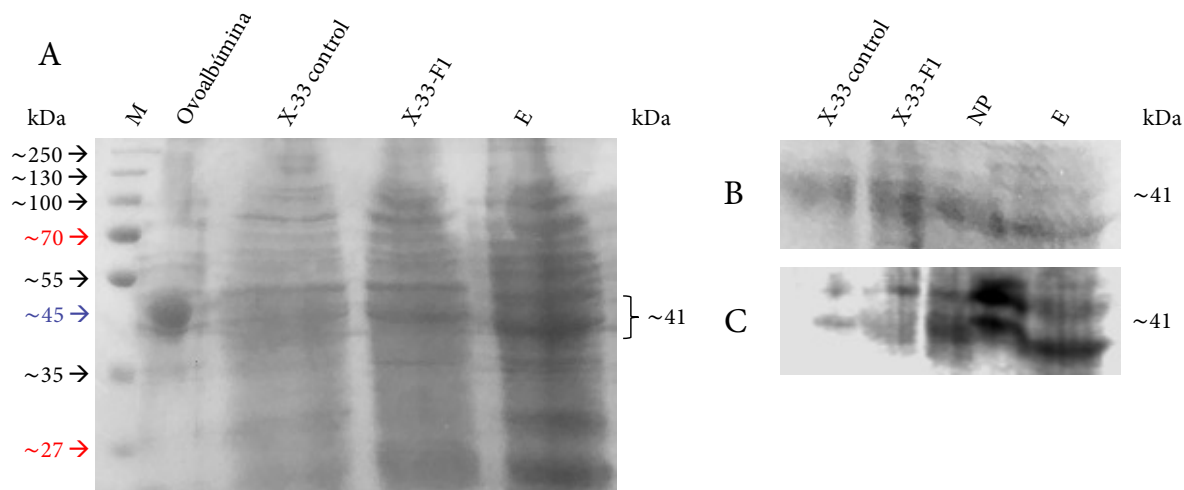
**Figura 23. Purificación 1 del polipéptido recombinante F1.** A) PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie que muestra los dializados X-33 control y X-33-F1, así como los volúmenes de elución correspondientes a las fracciones de purificación: NP, L y E. B) Membrana teñida con rojo de Ponceau. C) Western blot de las fracciones de purificación. M: marcador de peso molecular.

En la figura 24 tenemos el segundo cromatograma, obtenido con una concentración de NaCl de 0.5 M en todos los buffers, se optó por no utilizar imidazol en el buffer de lavado y emplear 500 mM en el buffer de elución. La estrategia se basó en que una alta concentración de NaCl desde el inicio podría reducir interacciones no específicas entre proteínas contaminantes y la columna. Al no incluir imidazol durante el lavado, se buscó permitir la eliminación de aquellos contaminantes que se unieron débilmente.



**Figura 24. Perfil de elución 2 de la purificación de F1.** Cromatograma de fracciones recolectadas cada 2 mL en una columna con capacidad de 5 mL (Sephacrose-NTA-Ni) cargada con 4 mL de dializado proteico X-33-F1. NP: no pegado, L: lavado, E: elución. Condiciones: BU=buffer fosfatos de potasio 50 mM, pH 8 + NaCl 0.5 M, BL=BU y BE=BU + Imidazol 500 mM.

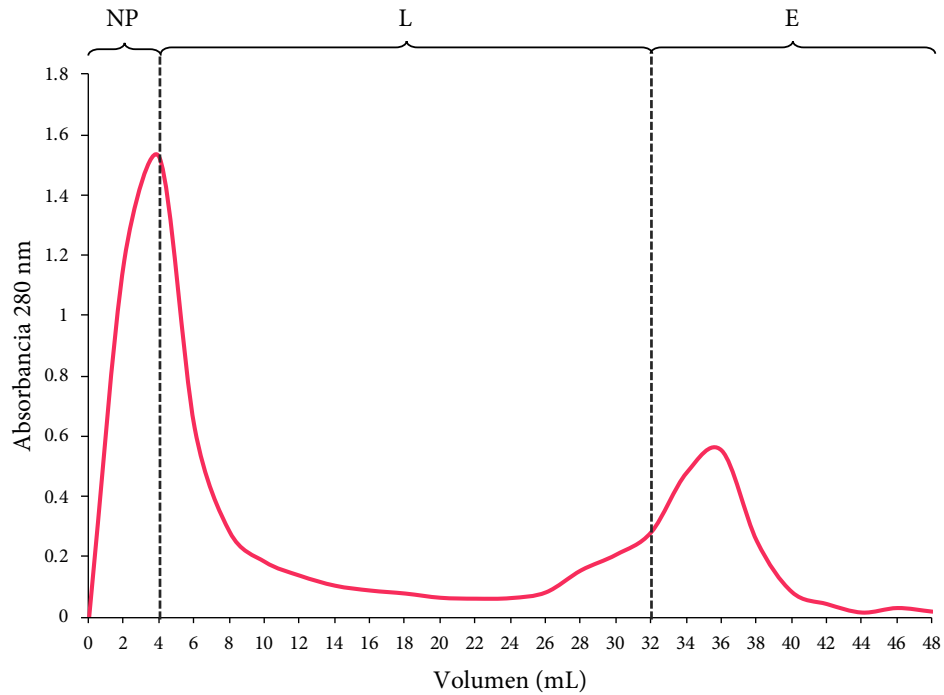
Por consiguiente, en la figura 24 se visualizaron dos picos en el cromatograma: uno al inicio, correspondiente a la proteína que no se pegó a la resina (NP), y el segundo durante la etapa de elución (E), el que fue incluso más alto que el primero. Esto sugiere que, al no haber aplicado imidazol durante la etapa de lavado, algunas proteínas inespecíficas permanecieron unidas a la columna y todas se eluyeron junto con el polipéptido F1. El análisis de PAGE-SDS y Western blot, en la figura 25a, mostró precipitados con acetona con dos bandas intensas alrededor de ~41 kDa, probablemente correspondientes a la F1, lo que se confirmó en la figura 25c. Si bien se detectó que la F1 sale también en la fracción de NP, su señal sigue apareciendo en la fracción de E, aunque no completamente pura. Por ende, se concluyó que, a pesar de usar una alta concentración de NaCl, como lo sugiere Yuliawati et al. [53] en su estudio sobre la purificación del factor estimulante de colonias de granulocitos humanos en *P. pastoris*, el aumento de la fuerza iónica del medio no mejoró la pureza del polipéptido. De igual forma, sumado a la ausencia de imidazol permitió que muchas proteínas inespecíficas compitieran por los sitios de unión, lo que comprometió la selectividad del proceso y favoreció una pérdida parcial de F1 durante los primeros lavados.



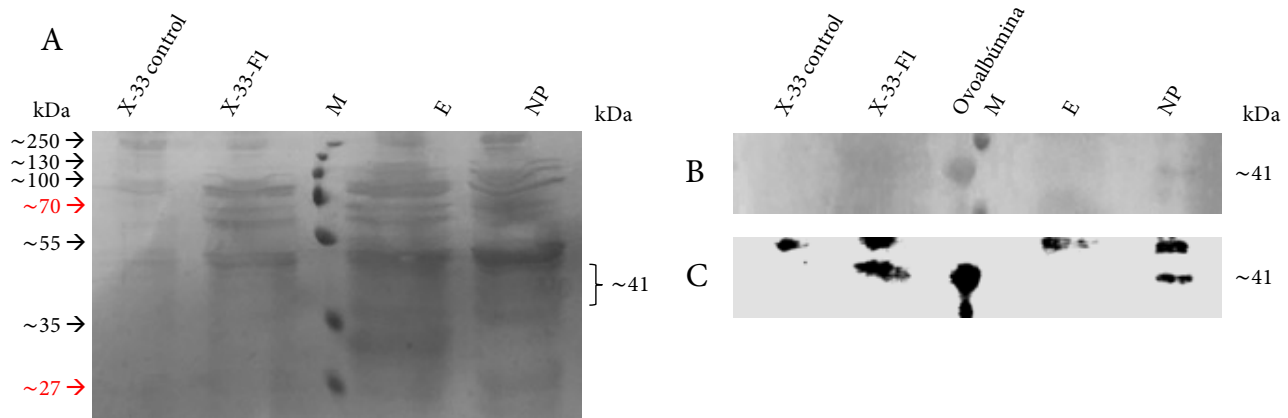
**Figura 25. Purificación 2 del polipéptido recombinante F1.** A) PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie que muestra los dializados X-33 control y X-33-F1, así como los volúmenes de elución correspondientes a las fracciones de purificación: NP y E. B) Membrana teñida con rojo de Ponceau. C) Western blot de las fracciones de purificación. M: marcador de peso molecular.

Por último, en la figura 26 se presenta el tercer cromatograma de las fracciones de purificación, obtenido con una concentración de NaCl de 0.4 M en todos los buffers y 400 mM de imidazol en el buffer de elución. Para la etapa de lavado, se utilizó inicialmente el buffer de unión, seguido de la adición del buffer de lavado con una concentración de 10 mM de imidazol. Dicho enfoque tuvo como objetivo principal conservar el polipéptido recombinante al minimizar el riesgo de desorción prematura y permitir un control más preciso sobre la elución del polipéptido en comparación con el ensayo de cromatografía 2 (figura 24).

En la figura 26 se observó primero un pico alto de absorbancia al inicio del cromatograma, correspondiente a la fracción de NP, seguido de un aumento progresivo desde los últimos lavados en la etapa L hasta culminar en un pico alto en la etapa de elución. No obstante, según el análisis por PAGE-SDS e inmunotransferencia (figura 27), el lavado inicial de la columna sin imidazol en los primeros mililitros pareció afectar la pureza del polipéptido F1 según la figura 27a, ya que permitió que proteínas inespecíficas se unieran firmemente a la columna complicando su eliminación en etapas posteriores. De igual modo, esta condición pareció contribuir a una pérdida del polipéptido de interés, como se evidenció en la figura 27c, donde se detectó F1 en la fracción de NP, pero no en la fracción de E.



**Figura 26. Perfil de elución 3 de la purificación de F1.** Cromatograma de fracciones recolectadas cada 2 mL en una columna con capacidad de 5 mL (Sepharose-NTA-Ni) cargada con 4 mL de dializado proteico X-33-F1. NP: no pegado, L: lavado, E: elución. Condiciones: BU=buffer fosfatos de potasio 50 mM, pH 8 + NaCl 0.4 M, BL=BU + Imidazol 10 mM y BE=BU + Imidazol 400 mM.



**Figura 27. Purificación 3 del polipéptido recombinante F1.** A) PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie mostrando los dializados X-33 control y X-33-F1 y volúmenes de elución correspondientes a las fracciones de purificación NP y E. B) Membrana teñida con rojo de Ponceau. C) Western blot de las fracciones de purificación. M: marcador de peso molecular.

Como se observó, la purificación del polipéptido F1, se llevó a cabo mediante tres experimentos con condiciones variables en las concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) e imidazol. El NaCl tiene como objetivo reducir las interacciones no específicas, aumentando la fuerza iónica del medio y facilitando la elución del polipéptido objetivo sin contaminantes. Además, al incrementar la fuerza iónica, se mejora la solubilidad y estabilidad del polipéptido, lo que es crucial para evitar la precipitación indeseada. Asimismo, el rango de 0.3 a 0.5 M de NaCl proporciona un equilibrio que permite adaptarse a diferentes condiciones de purificación [54].

Por otro lado, el imidazol actúa como un competidor por los sitios de unión al  $\text{Ni}^{2+}$  en el soporte cromatográfico, lo que lo convierte en un componente clave para lograr un equilibrio óptimo en su concentración. Concentraciones bajas permiten la retención de proteínas con uniones más débiles, mientras que concentraciones altas favorecen una elución más rápida y eficiente, desplazando así el polipéptido de interés. El imidazol se incorpora generalmente en los buffers de lavado y elución para minimizar la unión de proteínas contaminantes, lo que aumenta la pureza de la proteína objetivo con menos pasos de lavado [55]. No obstante, por lo observado en las cromatografías realizadas es importante considerar la posibilidad de añadir imidazol al buffer de unión, especialmente en situaciones donde se presentan dificultades en la unión del polipéptido, como las cromatografías 2 y 3, que mostraron una banda en las etapas de NP (figura 25 y 27). Esta situación podría atribuirse a una saturación de la columna debido a un exceso de proteínas. De igual manera, se podría reducir o eliminar el imidazol en los demás buffers y aumentar la cantidad de pasos de lavado y elución para mejorar la purificación [55]. Aunque podría requerir más tiempo y pasos adicionales para obtener el polipéptido purificado.

Finalmente, la única condición en la que se logró detectar el polipéptido F1 mediante Western blot fue en la que se utilizó un buffer de unión con NaCl 0.5 M, un buffer de lavado con NaCl 0.5 M sin imidazol, y un buffer de elución con NaCl 0.5 M y 500 mM de imidazol (figura 25). No obstante, esta purificación tuvo cierta contaminación y parte del polipéptido se perdió en la fracción de no pegado (NP). Aunque en la cromatografía 1 esta condición parecía ser la más adecuada para la purificación del polipéptido F1, no se observó señal en la inmunotransferencia, posiblemente debido a una baja concentración de proteína, como ya se había mencionado.

Aunado a lo anterior, Siañez Estrada [10] reportó buenos resultados de purificación bajo la primera condición (buffer de unión con NaCl 0.3 M, buffer de lavado con NaCl 0.3 M + imidazol 30 mM y buffer de elución con NaCl 0.3 M + 300mM), tal y como se obtuvo en el PAGE-SDS de la figura 23 del presente trabajo con una banda a una altura aproximada de 41 kDa. Por ello, se sugiere que además de las condiciones de purificación, la baja expresión del polipéptido podría deberse a una disminución progresiva en la producción por parte de la cepa, incluso cuando se utilizó un cultivo joven no mayor a 3 meses.

## 7. CONCLUSIÓN

En este trabajo se logró la producción y expresión del polipéptido F1 en forma soluble a partir de la cepa recombinante X-33-F1 de *Pichia pastoris*, observándose un aumento progresivo durante un periodo de 8 días por PAGE-SDS.

Se llevó a cabo la precipitación con sulfato de amonio del polipéptido F1 a partir del cultivo libre de células para concentrar la proteína, confirmándose su presencia mediante un Western blot.

Se evaluaron tres condiciones de cromatografía diferentes para la purificación del polipéptido F1. En la condición 1 (buffer de unión con NaCl 0.3 M, buffer de lavado con NaCl 0.3 M + imidazol 30 mM y buffer de elución con NaCl 0.3 M + 300mM) se obtuvo una aparente purificación de F1, pero no se confirmó su identidad por Western blot.

La condición 3 (buffer de unión con NaCl 0.4 M, buffer de lavado con NaCl 0.4 M + imidazol 30 mM y buffer de elución con NaCl 0.4 M + 400mM) no resultó efectiva, ya que la totalidad del polipéptido se detectó por Western-blot en la fracción de no pegado, además de mostrar en su PAGE-SDS proteínas contaminantes.

La condición 2 (buffer de unión con NaCl 0.5 M, un buffer de lavado con NaCl 0.5 M sin imidazol, y un buffer de elución con NaCl 0.5 M y 500 mM de imidazol), permitió detectar el polipéptido por Western-blot, aunque con proteínas contaminantes.

En conclusión, la cepa productora X-33-F1 actual puede estar afectada en su viabilidad y/o en el correcto plegamiento de la estructura terciaria del polipéptido F1, debido a las fallas eléctricas que comprometieron el funcionamiento del ultracongelador a -80 °C durante varios días a lo largo de los dos años de pandemia, donde la temperatura se elevó considerablemente. Lo más recomendable será volver a construir una nueva cepa productora, con el fin de garantizar la obtención de cantidades significativas de F1 y continuar con éxito este importante proyecto, orientado a su evaluación como vacuna en cerdos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hidalgo-Lara DR, De la Luz-Armendáriz J, Rivera-Benítez JF, Gomez-Núñez L, Salazar-Jiménez EN, Madrigal-Valencia TL, Ramírez-Mendoza H. Comparison of hemagglutination inhibition tests, immunoperoxidase monolayer assays, and serum neutralizing tests in detecting antibodies against blue eye disease in pigs. *J Immunol Methods* 2021;496:113088. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2021.113088>.
- [2] Reyes-Leyva J, García-Morales O, Santos-López G, Vallejo V, Ramírez-Mendoza H, Hernández J. Detection of viremia in the Porcine rubulavirus experimental infection. *Arch Med Vet* 2004;36:39–47. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2004000100004>.
- [3] Lara-Romero R, Cerriteño-Sánchez JL, Mendoza-Elvira S, García-Cambrón JB, Castañeda-Montes MA, Pérez-Aguilar JM, Cuevas-Romero JS. Development of Novel Recombinant Antigens of Nucleoprotein and Matrix Proteins of Porcine orthorubulavirus: Antigenicity and Structural Prediction. *Viruses* 2022, Vol 14, Page 1946 2022;14:1946. <https://doi.org/10.3390/V14091946>.
- [4] Hernández J, Leyva JR, Ramírez H, Valenzuela O, Zenteno E. Características de la respuesta inmune de cerdos infectados con el rubulavirus porcino. *Veterinaria México* 2004;35:1–10.
- [5] Santos-Lopez G, Hernandez J, Borraz-Argüello, Ramirez-Mendoza H, Vallejo V, Reyes-Leyva J. Proteins of Porcine rubulavirus: Structure, function and pathological implications. *Arch Med Vet* 2004;36:119–36. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2004000200003>.
- [6] Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J. Diseases of swine. *Diseases of Swine* 2019:1–1108. <https://doi.org/10.1002/9781119350927;JOURNAL:JOURNAL:-BOOKS;WGROU:STRING:PUBLICATION>.
- [7] Cuevas-Romero JS, Blomström A-L, Berg M. Molecular and epidemiological studies of Porcine rubulavirus infection – an overview . *Infect Ecol Epidemiol* 2015;5:29602. <https://doi.org/10.3402/IEE.V5.29602;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>.
- [8] Herrera J, Gómez-Núñez L, Lara-Romero R, Diosdado F, Martínez-Lara A, Jasso M, et al. Acute neurologic disease in Porcine rubulavirus experimentally infected piglets. *Virus Res* 2017;230:50–8. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2017.01.010>.
- [9] Fuentes Rodriguez JM. Evaluacion de una vacuna experimental contra ojo azul en cerdos mediante las pruebas de inmunogenicidad, inocuidad, potencia y medicion de la inmunidad pasiva en lechones 1993.
- [10] Siañez Estrada LI. Producción, purificación y valoración antigénica de la proteína de fusión (F) del Rubulavirus porcino, expresada en la levadura *Pichia pastoris* 2020. Tesis de Doctorado en Cc. Químicas, área Bioquímica y Biología Molecular. BUAP.
- [11] Del Tránsito Borraz Argüello M, Santos López G, Vallejo Ruiz V, Herrera Camacho I, Reyes Leyva J. Caracterización biológica de tres aislamientos naturales del Rubulavirus porcino (México). *Rev Biol Trop* 2007. <https://doi.org/10.15517/RBT.V56I2.5602>.
- [12] Sánchez-Betancourt JI, Santos-López G, Alonso R, Doporto JM, Ramírez-Mendoza H, Mendoza S, et al. Molecular characterization of the hemagglutinin-neuraminidase gene of porcine rubulavirus

- isolates associated with neurological disorders in fattening and adult pigs. *Res Vet Sci* 2008;85:359–67. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2007.10.007>.
- [13] Escobar-López AC, Rivera-Benitez JF, Castillo-Juárez H, Ramírez-Mendoza H, Trujillo-Ortega ME, Sánchez-Betancourt JI. Identification of Antigenic Variants of the Porcine Rubulavirus in Sera of Field Swine and their Seroprevalence. *Transbound Emerg Dis* 2012;59:416–20. <https://doi.org/10.1111/J.1865-1682.2011.01286.X>.
- [14] Garcia-Barrera AA, Del Valle A, Montaña-Hirose JA, Barrón BL, Salinas-Trujano J, Torres-Flores J. Full-genome sequencing and phylogenetic analysis of four neurovirulent Mexican isolates of porcine rubulavirus. *Arch Virol* 2017;162:1765–8. <https://doi.org/10.1007/S00705-017-3267-7/METRICS>.
- [15] Ramírez-Herrera MA, Mendoza-Magaña ML, Dueñas-Jiménez JM, Mora-Galindo J, Dueñas-Jiménez SH. Electrophysiological and Morphological Alterations in Peripheral Nerves by the Pig Paramyxovirus of Blue Eye Disease in Neonatal Pigs. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 2001;48:477–87. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0450.2001.00444.X>.
- [16] Cuevas-Romero JS, Cerriteño-Sánchez JL, Lara-Romero R, Vega-López MA, Ramírez-Estudillo C, Ramírez-Mendoza H, et al. Immunogenicity of a recombinant hemagglutinin neuraminidase-Porcine rubulavirus produced by *Escherichia coli* of Porcine rubulavirus gives protective immunity of litter after challenge. *Journal of Veterinary Medical Science* 2022;84:1595–604. <https://doi.org/10.1292/JVMS.22-0207>.
- [17] Hernández-Jáuregui P, Ramírez Mendoza H, Mercado García C, Moreno-López J, Kennedy S. Experimental Porcine Rubulavirus (La Piedad-Michoacan virus) Infection in Pregnant Gilts. *J Comp Pathol* 2004;130:1–6. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(03\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(03)00058-6).
- [18] Siañez-Estrada LI, Rivera-Benítez JF, Rosas-Murrieta NH, Reyes-Leyva J, Santos-López G, Herrera-Camacho I. Immunoinformatics approach for predicting epitopes in HN and F proteins of Porcine rubulavirus. *PLoS One* 2020;15:e0239785. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0239785>.
- [19] Rivera-Benítez JF, De la Luz-Armendáriz J, Gómez-Núñez L, Vargas FD, Escatell GS, Ramírez-Medina E, et al. Salud porcina: historia, retos y perspectivas. *Rev Mex Cienc Pecu* 2021;12:149–85. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5879>.
- [20] Valentina GMD. El rubulavirus porcino (PORV) infecta neuronas y células gliales a través de una sialoglicoproteína que funciona como receptor 2013. Tesis de Licenciatura en Biología. CUCBA. Universidad de Guadalajara.
- [21] Rivera-Benitez JF, Martínez-Bautista R, Pérez-Torres A, García-Contreras A del C, Reyes-Leyva J, Hernández J, et al. Persistence of porcine rubulavirus in experimentally infected boars. *Vet Microbiol* 2013;162:491–8. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2012.10.037>.
- [22] INNOVAC OJO AZUL | PLM - Veterinario n.d. [https://www.diccionarioveterinariopl.com/innovac\\_ojo\\_azul-76-12362-79-33-2](https://www.diccionarioveterinariopl.com/innovac_ojo_azul-76-12362-79-33-2) (accessed August 24, 2025).
- [23] Lapisa | Empresa líder en el sector agropecuario n.d. <https://lapisa.com/productos/porcimune-soa> (accessed August 24, 2025).
- [24] AVILAB - Products n.d. <https://avilab.com.mx/en/productos/mercado/porcinos/biologicos/virus-in-activado> (accessed August 24, 2025).

- [25] Rima B, Balkema-Buschmann A, Dundon WG, Duprex P, Easton A, Fouchier R, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Paramyxoviridae. *Journal of General Virology* 2019;100:1593–4. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001328/CITE/REFWORKS>.
- [26] González Solórzano KL. “Evaluación de la excreción del Orthorubulavirus porcino y la respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación durante la infección experimental en cerdos” 2023. Tesis de Maestría en Cc de la Producción y de la Salud Animal. UNAM.
- [27] Cuevas-Romero S, Blomström AL, Alvarado A, Hernández-Jauregui P, Rivera-Benitez F, Ramírez-Mendoza H, et al. Development of a real-time RT-PCR method for detection of porcine rubulavirus (PoRV-LPMV). *J Virol Methods* 2013;189:1–6. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2012.12.009>.
- [28] Mendoza-Magaña ML, Godoy-Martinez D V., Guerrero-Cazares H, Rodriguez-Peredo A, Dueñas-Jimenez JM, Dueñas-Jiménez SH, et al. Blue eye disease porcine rubulavirus (PoRv) infects pig neurons and glial cells using sialo-glycoprotein as receptor. *The Veterinary Journal* 2007;173:428–36. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2005.12.004>.
- [29] Chávez Flores MC. Evolución genética y antigénica de diferentes cepas de rubulavirus porcino 2023.
- [30] Bloyet LM, Schramm A, Lazert C, Raynal B, Hologne M, Walker O, et al. Regulation of measles virus gene expression by P protein coiled-coil properties. *Sci Adv* 2019;5:3702–10. [https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAW3702/SUPPL\\_FILE/AAW3702\\_SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAW3702/SUPPL_FILE/AAW3702_SM.PDF).
- [31] Cerriteño-Sánchez JL, Santos-López G, Rosas-Murrieta NH, Reyes-Leyva J, Cuevas-Romero S, Herrera-Camacho I. Production of an enzymatically active and immunogenic form of ectodomain of Porcine rubulavirus hemagglutinin-neuraminidase in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 2016;223:52–61. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2016.02.035>.
- [32] Reyes-Leyva J, Espinosa B, Santos G, Zenteno R, Hernández J, Vallejo V, et al. Purification and characterization of the Hemagglutinin-Neuraminidase of Porcine rubulavirus LPMV. *Glycoconj J* 1999;16:517–22. <https://doi.org/10.1023/A:1007022021301/METRICS>.
- [33] Morrison TG. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2003;1614:73–84. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00164-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00164-0).
- [34] Chang A, Dutch RE. Paramyxovirus Fusion and Entry: Multiple Paths to a Common End. *Viruses* 2012, Vol 4, Pages 613-636 2012;4:613–36. <https://doi.org/10.3390/V4040613>.
- [35] Barrett CT, Dutch RE. Viral Membrane Fusion and the Transmembrane Domain. *Viruses* 2020, Vol 12, Page 693 2020;12:693. <https://doi.org/10.3390/V12070693>.
- [36] Panda A, Huang Z, Elankumaran S, Rockemann DD, Samal SK. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microb Pathog* 2004;36:1–10. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2003.07.003>.
- [37] Aguilar HC, Henderson BA, Zamora JL, Johnston GP. Paramyxovirus Glycoproteins and the Membrane Fusion Process. *Curr Clin Microbiol Rep* 2016;3:142–54. <https://doi.org/10.1007/S40588-016-0040-8/METRICS>.
- [38] Bose S, Jardetzky TS, Lamb RA. Timing is everything: Fine-tuned molecular machines orchestrate paramyxovirus entry. *Virology* 2015;479–480:518–31. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2015.02.037>.

- [39] Lozada C, Barlow TMA, Gonzalez S, Lubin-Germain N, Ballet S. Identification and Characteristics of Fusion Peptides Derived From Enveloped Viruses. *Front Chem* 2021;9:689006. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2021.689006/XML>.
- [40] Karbalaeei M, Rezaee SA, Farsiani H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *J Cell Physiol* 2020;235:5867–81. <https://doi.org/10.1002/JCP.29583>.
- [41] Zha J, Liu D, Ren J, Liu Z, Wu X. Advances in Metabolic Engineering of *Pichia pastoris* Strains as Powerful Cell Factories. *Journal of Fungi* 2023, Vol 9, Page 1027 2023;9:1027. <https://doi.org/10.3390/JOF9101027>.
- [42] Pan Y, Yang J, Wu J, Yang L, Fang H. Current advances of *Pichia pastoris* as cell factories for production of recombinant proteins. *Front Microbiol* 2022;13:1059777. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.1059777/XML>.
- [43] Shen W, Xue Y, Liu Y, Kong C, Wang X, Huang M, Cai M, Zhou X, Zhang Y, Zhou M. A novel methanol-free *Pichia pastoris* system for recombinant protein expression. *Microb Cell Fact* 2016;15:1–11. <https://doi.org/10.1186/S12934-016-0578-4>.
- [44] Cerriteño Sánchez JL. Producción de una forma enzimática activa e inmunogénica del ectodominio de la hemaglutinina neuraminidasa (eHN) del Rubulavirus porcino en la levadura *Pichia pastoris* 2016. Tesis de Doctorado en Cc. Químicas, área Bioquímica y Biología Molecular. BUAP.
- [45] McAleer B, Rima B. Cloning and secreted expression of the extracellular domain of the mumps virus fusion protein in *Pichia pastoris*. *Virus Genes* 2000;20:127–33. <https://doi.org/10.1023/A:1008162329499/METRICKS>.
- [46] Pourbakhsh SA, Goudarzi H, Seyfi Abad Shapouri MR, Keyvanfar H, Lotfi M, Kamalzade M. Cloning of fusion (F) protein gene of peste des petits ruminants virus (PPRV) in secretory *Pichia pastoris* vector. *Arch Razi Inst* 2007;62:215–21. <https://doi.org/10.22092/ARI.2007.103757>.
- [47] Kang X, Wang J, Jiao Y, Tang P, Song L, Xiong D, Yin Y, Pan Z, Jiao X. Expression of recombinant Newcastle disease virus F protein in *Pichia pastoris* and its immunogenicity using flagellin as the adjuvant. *Protein Expr Purif* 2016;128:73–80. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2016.08.009>.
- [48] Tizzano MA, Sguazza GH, Picotto LD, Echeverría MG, Pecoraro MR. The cloning of the virus envelope glycoprotein F of canine distemper virus expressed in *Pichia pastoris*. *Microb Pathog* 2020;142:104094. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104094>.
- [49] Sedmak JJ, Grossberg SE. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem* 1977;79:544–52. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90428-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90428-6).
- [50] Shemesh P, Fishman A. Optimal fermentation conditions for growth and recombinant protein production in *Pichia pastoris*: Strain selection, ploidy level and carbon source. *Curr Res Food Sci* 2024;9:100840. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2024.100840>.
- [51] Hartwig DD, Oliveira TL, Seixas FK, Forster KM, Rizzi C, Hartleben CP, et al. High yield expression of leptospirosis vaccine candidates LigA and LipL32 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* 2010;9:1–7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-98/FIGURES/5>.

- [52] Li C, Lin Y, Zheng X, Pang N, Liao X, Liu X, et al. Combined strategies for improving expression of *Citrobacter amalonaticus* phytase in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol* 2015;15:1–11. <https://doi.org/10.1186/S12896-015-0204-2/FIGURES/5>.
- [53] Yuliawati, Aminah, Fuad AM. Purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor from *Pichia pastoris* using two ninta chromatography methods. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 2020;439:012044. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/439/1/012044>.
- [54] Gräslund S, Nordlund P, Weigelt J, Hallberg BM, Bray J, Gileadi O, et al. Protein production and purification. *Nat Methods* 2008;5:135–46. <https://doi.org/10.1038/NMETH.F.202;KWRD=LIFE+SCIENCES>.
- [55] Chhandak B. *Biofuels and Biodiesel* 2021;2290. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1323-8>.
- [56] Invitrogen, C. (2005). EasySelect *Pichia* Expression Kit, version G. [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/easyselect\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/easyselect_man.pdf)

## ANEXOS (PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES)

### Medio YPD

Para 100 mL:

- 1 g extracto de levadura
- 2 g peptona
- 2 g glucosa
- 2 g agar (en caso de hacer placas)

Disolver en 100 mL de agua Milli-Q estéril. Esterilizar por autoclave a 15 psi durante 15 min y almacenar a 4 °C.

### Medio BMGY

Para 100 mL:

- 1 g extracto de levadura
- 2 g peptona
- 10 mL YNB 10X
- 200 µL biotina 500X
- 10 mL buffer fosfato de potasio 1 M, pH 6
- 10 mL glicerol 10X

Disolver el extracto de levadura y la peptona en 70 mL de agua Milli-Q estéril. Esterilizar por autoclave a 15 psi/15 min. En una campana de flujo laminar, añadir el resto de los volúmenes y almacenar a 4 °C.

### Medio BMMY

Para 100 mL:

- 1 g extracto de levadura
- 2 g peptona
- 10 mL YNB 10X

- 200  $\mu$ L biotina 500X
- 10 mL buffer fosfato de potasio 1 M, pH 6
- 10 mL metanol 10X

Disolver el extracto de levadura y la peptona en 70 mL de agua Milli-Q estéril. Esterilizar por autoclave a 15 psi/15 min. En una campana de flujo laminar, añadir el resto de los volúmenes y almacenar a 4 °C.

### **Medio YNB 10X (13.4%)**

Para 100 mL:

- 13.4 g YNB

Disolver en 80 mL de agua Milli-Q estéril y aforar a 100 mL. Esterilizar por autoclave a 15 psi/15 min y almacenar a 4 °C.

### **Biotina 500X (0.2%)**

Para 100 mL:

- 200 mg biotina

Disolver en 100 mL de agua Milli-Q estéril. Esterilizar por filtración utilizando un filtro de 20  $\mu$ m y almacenar a 4 °C.

### **Buffer fosfato de potasio 1 M**

Para 1 L:

#### **Solución 1**

Reactivo: fosfato dipotásico

Fórmula:  $K_2HPO_4$

PM: 174.18 g/mol

- 87.09 g  $K_2HPO_4$

Disolver en 300 mL de agua Milli-Q estéril y aforar a 500 mL.

## **Solución 2**

Reactivo: fosfato monopotásico

Fórmula:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

PM: 136.09 g/mol

- 68.045 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Disolver en 300 mL de agua Milli-Q estéril y aforar a 500 mL.

Mezclar la solución 1 y 2. Almacenar a 4 °C.

## **Buffer fosfato de potasio 1 M, pH 6**

Para 500 mL:

Tomar 400 mL de buffer fosfato de potasio 1 M y ajustar el pH utilizando HCl concentrado si el pH es mayor a 6, o NaOH 5 N si el pH es menor a 6. Completar el volumen hasta 500 mL. Esterilizar por autoclave a 15 psi/15 min y almacenar a 4 °C.

## **Glicerol 10X (10%)**

Para 100 mL:

- 10 mL glicerol
- 90 mL agua Milli-Q estéril

Esterilizar por autoclave a 15 psi/15 min y conservar a temperatura ambiente.

## **Metanol 10X (10%)**

Para 100 mL:

- 10 mL metanol puro
- 90 mL agua Milli-Q estéril

Esterilizar por filtración utilizando un filtro de 20  $\mu\text{m}$  y almacenar en un frasco ámbar a 4 °C.

## **Bolsas de diálisis**

Cortar bolsas de diálisis de membrana de celulosa de Sigma-Aldrich de tamaño adecuado usando guantes. Hervir las bolsas en 800 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% durante 1 h para eliminar compuestos azufrados y abrir los poros. Lavar con agua destilada hasta que el pH sea 7. Almacenar las bolsas en una solución de  $\text{NaN}_3$  al 0.03% a 4 °C.

## **Carbonato de sodio al 2%**

Para 800 mL:

- 18 g carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

Disolver en 600 mL de agua Milli-Q estéril y aforar a 800 mL.

## **Azida de sodio al 0.03%**

Para 500 mL:

- 0.15 g azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ )

Disolver en 500 mL de agua Milli-Q estéril y almacenar a 4 °C.

## **Buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 8**

Para 1 L:

Mezclar 50 mL de buffer fosfato de potasio 1 M con 850 mL de agua Milli-Q estéril. Ajustar el pH utilizando HCl concentrado si el pH es mayor a 8, o NaOH 5 N si el pH es menor a 8. Completar el volumen hasta 1 L y almacenar a 4 °C.

## **Colorante azul de Coomassie (0.06% azul de Coomassie R-250, 3% ácido perclórico)**

Para preparar la solución de ácido perclórico al 3%, es necesario realizar un volumen de 10 mL superior al requerido. Por lo tanto, en lugar de preparar 200 mL, se deben preparar 210 mL.

- 201 mL agua Milli-Q estéril
- 9 mL ácido perclórico al 70%

- 0.12 g azul brillante G-250

NOTA: Se debe tomar en cuenta la concentración del ácido perclórico para realizar el ajuste de pureza requerido.

Mezclar suavemente el agua Milli-Q con el ácido perclórico y disolver el colorante en aproximadamente 180 mL de solución ácida. Mantener la agitación constante durante 30-40 min, o hasta que la solución adquiera una tonalidad lo suficientemente oscura como para impedir ver a través de ella.

A continuación, filtrar la solución utilizando papel filtro y añadir 20 mL de la solución ácida para completar el volumen hasta 200 mL. Realizar la lectura en el espectrofotómetro, asegurando que la absorbancia esté entre 1.3 y 1.5 a 465 nm. Almacenar en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

NOTA: En caso de que la absorbancia sea mayor a 1.5, añadir un poco más de la solución de ácido perclórico al 3% (de los 10 mL preparados en exceso). Si, por el contrario, la absorbancia es menor a 1.3, agregar una pizca de colorante hasta alcanzar los valores de absorbancia deseados.

### **Buffer reductor 4X (8% SDS, 40% glicerol, 20% b-mercaptoetanol, Tris-HCl 0.25 M a pH 6.8)**

Para 10 mL:

- 0.8 g dodecilsulfato sódico (SDS)
- 4 mL glicerol
- 2 mL b-mercaptoetanol
- 2.5 mL tris-HCl 1 M, pH 6.8

Mezclar bien la solución y aforar a 10 mL con agua Milli-Q estéril. Hacer alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf, cubrirlos con papel aluminio y almacenar a -20 °C.

### **Tris-HCl 1 M, pH 6.8**

Para 50 mL:

Reactivo: tris-base o (tris(hidroximetil)aminometano)

Fórmula:  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$

PM: 121.14 g/mol

- 6.057 g tris-base

Disolver en 40 mL de agua Milli-Q estéril. Ajustar el pH utilizando HCl concentrado. Completar el volumen hasta 50 mL y almacenar a 4 °C.

### **Tris-HCl 1 M, pH 8.8**

Para 100 mL:

Reactivo: tris-base o (tris(hidroximetil)aminometano)

Fórmula:  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$

PM: 121.14 g/mol

- 12.114 g tris-base

Disolver en 80 mL de agua Milli-Q estéril. Ajustar el pH utilizando HCl concentrado. Completar el volumen hasta 100 mL y almacenar a 4 °C.

### **Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8**

Para 100 mL:

Reactivo: tris-base o (tris(hidroximetil)aminometano)

Fórmula:  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$

PM: 121.14 g/mol

- 6.057 g tris-base

Disolver en 80 mL de agua Milli-Q estéril. Ajustar el pH utilizando HCl concentrado. Completar el volumen hasta 100 mL y almacenar a 4 °C.

### **SDS (10%)**

Para 50 mL:

- 5 g dodecilsulfato sódico (SDS)

Disolver por agitación suave en 40 mL de agua Milli-Q estéril para evitar formación de espuma. Si es necesario, calentar ligeramente para facilitar la disolución. Aforar a 50 mL y conservar a temperatura ambiente.

NOTA: El reactivo es nocivo para las vías respiratorias, se recomienda uso de cubrebocas.

### **PSA (10%)**

Para 1 mL:

- 100 mg persulfato de amonio (APS)

Disolver en 1 mL de agua Milli-Q estéril y almacenar a -20 °C.

NOTA: Si se excede del peso, ajustar el volumen de agua. No se recomienda regresar el reactivo al envase.

### **Buffer de corrida 10X, pH 8.3**

Para 1 L:

Reactivo: tris-base o (tris(hidroximetil)aminometano)

Fórmula:  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$

PM: 121.14 g/mol

Reactivo: glicina

Fórmula:  $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$

PM: 75.07 g/mol

- 30.285 g tris(hidroximetil)aminometano (tris-base)
- 144.134 g glicina
- 10 g dodecilsulfato sódico (SDS)

Disolver en 800 mL de agua Milli-Q estéril. Ajustar el pH utilizando HCl concentrado si el pH es mayor a 8.3, o NaOH 5 N si el pH es menor a 8.3. Completar el volumen hasta 1 L y almacenar a 4 °C.

### **Buffer de corrida 1X, pH 8.3 (tris-base 25 mM, glicina 192 mM, 0.1% SDS)**

Para 1 L:

Mezclar 100 mL de buffer de corrida 10X con 900 mL de agua Milli-Q estéril y almacenar a 4 °C.

NOTA: La solución puede utilizarse hasta 3 veces para corrimiento electroforético.

## **Solución de tñido (0.05% azul de Coomassie R-250, 10% ácido acético glacial, 50% metanol)**

Para 100 mL:

- 40 mL agua Milli-Q estéril
- 10 mL ácido acético glacial
- 50 mL metanol puro
- 0.05 g azul de Coomassie R-250

Agitar hasta que el colorante esté completamente disuelto. Filtrar la solución con papel filtro y conservar en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

## **Solución de desteñido (10% ácido acético glacial, 50% metanol)**

Para 100 mL:

- 40 mL agua Milli-Q estéril
- 10 mL ácido acético glacial
- 50 mL metanol puro

Conservar en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

## **Buffer de transferencia (tris-base 25 mM, glicina 192 mM, 0.1% SDS, 20% metanol)**

Para 500 mL:

Reactivo: tris-base o (tris(hidroximetil)aminometano)

Fórmula:  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$

PM: 121.14 g/mol

Reactivo: glicina

Fórmula:  $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$

PM: 75.07 g/mol

- 1.515 g tris-base
- 7.2 g glicina
- 0.5 g SDS

- 100 mL metanol puro

Disolver los polvos en 300 mL de agua Milli-Q estéril. Añadir el metanol, aforar a 500 mL y almacenar a 4 °C.

### **Buffer TBS-Tween 0.1%, pH 8 (tris-base 20 mM, NaCl 150 mM)**

Para 500 mL:

Reactivo: tris-base o (tris(hidroximetil)aminometano)

Fórmula:  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$

PM: 121.14 g/mol

Reactivo: cloruro de sodio

Fórmula: NaCl

PM: 58.44 g/mol

- 1.211 g tris-base
- 4.383 g NaCl
- 500  $\mu\text{L}$  tween-20

Disolver los polvos en 400 mL de agua Milli-Q estéril. Ajustar el pH utilizando HCl concentrado. Completar el volumen hasta 500 mL, añadir el Tween-20 y almacenar a 4 °C.

### **Solución de bloqueo (5% leche descremada)**

Para 50 mL:

- 2.5 g leche descremada
- 50 mL TBS-Tween

Disolver completamente la leche en vórtex.

NOTA: La solución de bloqueo se prepara cuando requiera ser utilizada.

## **Tris-HCl 4 mM, pH 8**

Para 500 mL:

Reactivo: tris-base o (tris(hidroximetil)aminometano)

Fórmula:  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$

PM: 121.14 g/mol

- 242.28 mg tris-base

Disolver en 500 mL de agua Milli-Q estéril. Ajustar el pH utilizando HCl concentrado y almacenar a 4 °C.

## **Buffer de unión, pH 8**

Para 100 mL:

Reactivo: cloruro de sodio

Fórmula: NaCl

PM: 58.44 g/mol

### **Cromatografía 1 (buffer fosfato de potasio 50 mM, NaCl 0.3 M)**

- 1.753 g NaCl

### **Cromatografía 2 (buffer fosfato de potasio 50 mM, NaCl 0.5 M)**

- 2.922 g NaCl

### **Cromatografía 3 (buffer fosfato de potasio 50 mM, NaCl 0.4 M)**

- 2.338 g NaCl

Mezclar 5 mL de buffer fosfato de potasio 1 M con 85 mL de agua Milli-Q estéril y disolver el polvo. Ajustar el pH utilizando HCl concentrado si el pH es mayor a 8, o NaOH 5 N si el pH es menor a 8. Completar el volumen hasta 100 mL y almacenar a 4 °C.

## **Buffer de lavado, pH 8**

Para 100 mL:

Reactivo: cloruro de sodio

Fórmula: NaCl

PM: 58.44 g/mol

Reactivo: imidazol

Fórmula: C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>

PM: 68.077 g/mol

### **Cromatografía 1 (buffer fosfato de potasio 50 mM, NaCl 0.3 M, Imidazol 10 mM)**

- 1.753 g NaCl
- 68.077 mg imidazol

### **Cromatografía 2 (buffer fosfato de potasio 50 mM, NaCl 0.5 M)**

- 2.922 g NaCl

### **Cromatografía 3 (buffer fosfato de potasio 50 mM, NaCl 0.4 M, Imidazol 10 mM)**

- 2.338 g NaCl
- 68.077 mg imidazol

Mezclar 5 mL de buffer fosfato de potasio 1 M con 85 mL de agua Milli-Q estéril y disolver los polvos. Ajustar el pH utilizando HCl concentrado si el pH es mayor a 8, o NaOH 5 N si el pH es menor a 8. Completar el volumen hasta 100 mL y almacenar a 4 °C.

## **Buffer de elución, pH 8**

Para 100 mL:

Reactivo: cloruro de sodio

Fórmula: NaCl

PM: 58.44 g/mol

Reactivo: imidazol

Fórmula:  $C_3H_4N_2$

PM: 68.077 g/mol

**Cromatografía 1 (buffer fosfato de potasio 50 mM, NaCl 0.3 M, Imidazol 300 mM)**

- 1.753 g NaCl
- 2.042 g imidazol

**Cromatografía 2 (buffer fosfato de potasio 50 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 500 mM)**

- 2.922 g NaCl
- 3.404 g imidazol

**Cromatografía 3 (buffer fosfato de potasio 50 mM, NaCl 0.4 M, Imidazol 400 mM)**

- 2.338 g NaCl
- 2.723 g imidazol

Mezclar 5 mL de buffer fosfato de potasio 1 M con 85 mL de agua Milli-Q estéril y disolver los polvos. Ajustar el pH utilizando HCl concentrado si el pH es mayor a 8, o NaOH 5 N si el pH es menor a 8. Completar el volumen hasta 100 mL y almacenar a 4 °C.