

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria

Producción de las proteínas de choque térmico bovinas HSPA1A y HSPA2 en *Escherichia coli*

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Médica
Veterinaria


Autores:

Estefany Mishel Largo Maldonado

Heydi Isabel Pando Tacuri

Director:

Antonio Javier Vallecillo Maza

ORCID:  0000-0001-9141-0176

Cuenca, Ecuador

2024-02-06

Resumen

Las proteínas chaperonas son las encargadas de mantener la calidad y funcionalidad de otras proteínas. Algunas están involucradas en el mantenimiento de la calidad y funcionalidad de las gametas, entre las cuales se encuentran las chaperonas la familia HSP70, que se expresan principalmente como respuesta ante situaciones estresantes como golpes de calor, estrés oxidativo, osmótico, entre otros. Además, miembros de esta familia también han sido identificadas en la membrana plasmática del espermatozoide y descensos en su expresión comprometen la motilidad y calidad de los mismos. En vista de estos antecedentes, este trabajo se enfocó en la producción de las proteínas recombinantes HSPA1A y HSPA2 de bovinos (*Bos taurus*) para su evaluación como aditivo en las soluciones de criopreservación de embriones y gametas. Como resultado, únicamente se logró obtener la proteína HSPA1A en un modelo de expresión bacteriano, con la cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) Rosetta 2 (DE3) se obtuvo aproximadamente 112 mg de proteína pura por litro, en los cultivos incubados a una temperatura de 37 °C. Por el contrario, en cultivos de producción incubados a una temperatura de 30 °C se alcanzó un rendimiento de ± 6 mg de proteína. Por otro lado, no fue posible lograr la producción de la proteína HSPA2, en consecuencia, de poderse amplificar de la secuencia codificante, por lo que deberá diseñarse otra estrategia de amplificación y poder así obtener la construcción genética necesaria para la generación de la cepa recombinante de *E. coli* capaz de producir esta proteína.

Palabras clave: biología molecular, biotecnología animal, proteína, temperatura, reproducción



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

Chaperone proteins are responsible for maintaining the quality and functionality of other proteins. Some chaperones are involved in various functions within reproductive physiology, such as maintaining the quality and functionality of gametes, among which are chaperones HSP70 family, which are expressed mainly in response to stressful situations such as heat shock, oxidative and osmotic stress, among others. Furthermore, members of this family have also been identified in the plasma membrane of the sperm and decreases in their expression compromise their motility and quality. In view of this background, this work focused on the production of recombinant proteins HSPA1A and HSPA2 from bovines (*Bos taurus*) for their evaluation as an additive in cryopreservation solutions for embryos and gametes. As a result, it was only possible to obtain the HSPA1A protein in a bacterial expression model; with the *Escherichia coli* (*E. coli*) Rosetta 2 (DE3) strain, approximately 112 mg of pure protein per liter was obtained, in cultures incubated at a temperature of 37 °C. On the contrary, in production cultures incubated at a temperature of 30 °C, a yield of ± 6 mg of pure protein was achieved. On the other hand, it was not possible to achieve the production of the HSPA2 protein, as a result of being able to amplify the coding sequence, so another amplification strategy must be designed and thus be able to obtain the genetic construction necessary for the generation of the recombinant strain of *E. coli* capable of producing this protein.

Keywords: molecular biology, animal biotechnology, protein, temperature, reproduction



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

| Contenido: | Página: |
|---|---------|
| Resumen y palabras clave | 2 |
| Abstract y keywords | 3 |
| Índice de contenido | 4 |
| Índice de figuras | 7 |
| Índice de tablas | 8 |
| Dedicatorias | 9 |
| Agradecimientos | 11 |
| Listado de abreviaturas | 13 |
| 1. Introducción | 14 |
| 2. Objetivos | 16 |
| 2.1. Objetivo general | 16 |
| 2.2. Objetivos específicos | 16 |
| 2.3. Pregunta de investigación | 16 |
| 3. Revisión de la literatura | 17 |
| 3.1. Generalidades | 17 |
| 3.2. Chaperonas moleculares | 17 |
| 3.3. Proteínas de choque térmico | 19 |
| 3.3.1. Proteínas de choque térmico 70 (HSP70) | 20 |
| 3.4. Proteína de choque térmico HSPA1A | 21 |
| 3.4.1. Generalidades | 21 |
| 3.4.2. Características de la HSPA1A | 21 |
| 3.4.3. Estructura de la HSPA1A | 21 |
| 3.4.4. Funciones de la HSPA1A | 22 |
| 3.4.5. Aplicación de la proteína HSPA1A en biotecnología | 23 |
| 3.5. Proteína de choque térmico HSPA2 | 24 |
| 3.5.1. Generalidades | 24 |
| 3.5.2. Características de la HSPA2 | 24 |
| 3.5.3. Estructura de HSPA2 | 24 |
| 3.5.4. Funciones de la HSPA2 | 25 |
| 3.5.5. Aplicación de la proteína HSPA2 en biotecnología | 26 |
| 3.6. Producción de proteínas recombinantes | 26 |
| 3.7. <i>Escherichia coli</i> como biofábrica | 27 |
| 4. Materiales y métodos | 29 |
| 4.1. Descripción del estudio | 29 |
| 4.2. Actividades experimentales | 29 |
| 4.2.1. Actividad experimental 1: Diseño de primers u polinucleótidos y construcciones genéticas | 29 |
| 4.2.1.1. Materiales | 29 |
| 4.2.1.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio | 29 |
| 4.2.1.2. Procedimiento | 29 |
| 4.2.2. Actividad experimental 2: Amplificación de secuencias codificantes mediante PCR | 30 |
| 4.2.2.1. Materiales | 30 |

| | | |
|--------------|---|----|
| 4.2.2.1.1. | Materiales físicos y equipos de laboratorio | 30 |
| 4.2.2.1.2. | Materiales biológicos | 31 |
| 4.2.2.1.3. | Reactivos y soluciones | 31 |
| 4.2.2.2. | Proceso de amplificación | 31 |
| 4.2.3. | Actividad experimental 3: Clonación de la secuencia codificante de la HSPA1A y construcción del plásmido de expresión | 33 |
| 4.2.3.1. | Materiales | 33 |
| 4.2.3.1.1. | Material físicos y equipos de laboratorio | 33 |
| 4.2.3.1.2. | Materiales biológicos | 34 |
| 4.2.3.1.3. | Reactivos y soluciones | 34 |
| 4.2.3.2. | Proceso de clonación de la secuencia codificante de la HSPA1A en el vector pGEM-T y subclonación en el vector de expresión pET15b | 35 |
| 4.2.4. | Actividad experimental 4: Generación de cepas de expresión recombinantes con el plásmido pET15b-HSPA1A | 37 |
| 4.2.4.1. | Materiales | 37 |
| 4.2.4.1.1. | Material físicos y equipos de laboratorio | 37 |
| 4.2.4.1.2. | Materiales biológicos | 38 |
| 4.2.4.1.3.1. | Reactivos y soluciones para la obtención y procesamiento de la biomasa | 38 |
| 4.2.4.1.3.2. | Para la resolución de las proteínas mediante SDS-PAGE | 38 |
| 4.2.4.2. | Procedimiento | 39 |
| 4.2.5. | Actividad experimental 5: Cultivos de producción | 41 |
| 4.2.5.1. | Materiales | 41 |
| 4.2.5.1.1. | Material físicos y equipos de laboratorio | 41 |
| 4.2.5.1.2. | Materiales biológicos | 42 |
| 4.2.5.1.3. | Reactivos y soluciones | 42 |
| 4.2.5.2. | Procedimiento | 42 |
| 4.2.6. | Actividad experimental 6: Fraccionamiento de la biomasa inducida | 42 |
| 4.2.6.1. | Materiales | 42 |
| 4.2.6.1.1. | Material físicos y equipos de laboratorio | 42 |
| 4.2.6.1.2. | Materiales biológicos | 43 |
| 4.2.6.1.3. | Reactivos y soluciones | 43 |
| 4.2.6.2. | Procedimiento | 43 |
| 4.2.7. | Actividad experimental 7: Purificación por IMAC | 43 |
| 4.2.7.1. | Materiales | 43 |
| 4.2.7.1.1. | Material físicos y equipos de laboratorio | 43 |
| 4.2.7.1.2. | Materiales biológicos | 44 |
| 4.2.7.1.3. | Reactivos y soluciones | 44 |
| 4.2.7.2. | Procedimiento | 44 |
| 4.2.8. | Actividad experimental 8: Verificación de la purificación | 45 |
| 4.2.8.1. | Materiales | 45 |
| 4.2.8.1.1. | Material físicos y equipos de laboratorio | 45 |
| 4.2.8.1.2. | Materiales biológicos | 45 |
| 4.2.8.1.3. | Reactivos y soluciones | 45 |
| 4.2.8.2. | Procedimiento | 46 |
| 4.2.9. | Actividad experimental 9: Diálisis, cuantificado y almacenado | 46 |

| | | |
|------------|---|----|
| 4.2.9.1. | Materiales | 46 |
| 4.2.9.1.1. | Material físicos y equipos de laboratorio | 46 |
| 4.2.9.1.2. | Materiales biológicos | 47 |
| 4.2.9.1.3. | Reactivos y soluciones | 47 |
| 4.2.9.2. | Procedimiento | 47 |
| 5. | Resultados y discusión | 49 |
| 5.1. | Amplificación y clonación de las secuencias codificantes de las proteínas HSPA1A y HSPA2 | 49 |
| 5.2. | Generación y evaluación de las cepas de <i>E. coli</i> C41 (DE3) y Rosetta 2 (DE3) recombinantes para la producción de la proteína HSPA1A | 52 |
| 5.3. | Producción de la proteína HSPA1A | 52 |
| 6. | Conclusiones | 56 |
| 7. | Recomendaciones | 57 |
| 8. | Bibliografía | 58 |
| 9. | Anexos | 65 |

Índice de figuras

| Contenido: | Página: |
|--|---------|
| Figura 1. Modelo estructural de la proteína HSPA1A. | 22 |
| Figura 2. Modelo estructural de la proteína HSPA2. | 25 |
| Figura 3. Electroforesis de las reacciones de amplificación de las secuencias codificantes de HSPA1A y HSPA2. | 50 |
| Figura 4. Electroforesis de las reacciones de digestión de los plásmidos de las clonas seleccionadas de las transformantes obtenidas con las reacciones de ligación del pGEM-T con el producto de PCR de la HSPA1A. | 51 |
| Figura 5. Electroforesis de las reacciones de digestión de los plásmidos de las clonas seleccionadas de las transformantes obtenidas con las reacciones de ligación del pET15b con la secuencia codificante de la HSPA1A. | 51 |
| Figura 6. SDS-PAGE de las fracciones proteicas de las cepas de <i>E. coli</i> C41 (DE3) y Rosetta 2 (DE3) transformadas con el plásmido pET15b-HSPA1A e inducidas. | 52 |
| Figura 7. Material obtenido del fraccionamiento de la biomasa bacteriana inducida en los cultivos de Rosetta 2 (DE3) recombinante, incubados a 37 y 30 °C. | 53 |
| Figura 8. SDS-PAGE de las fracciones proteicas obtenidas la purificación IMAC de los Lotes 1 y 2 de los cultivos de producción de la HSPA1A. | 54 |
| Figura 9. Actividades experimentales. | 65 |

Índice de tablas

| Contenido: | Página: |
|--|----------------|
| Tabla 1. Composición de la mezcla de reacción para los ensayos de PCR para la amplificación de secuencias codificantes para HSPA1A y HSPA2. | 31 |
| Tabla 2. Perfil de temperaturas de amplificación de la secuencia codificante de la HSPA1A. | 32 |
| Tabla 3. Perfil de temperaturas de amplificación de la secuencia codificante de la HSPA2. | 32 |
| Tabla 4. Mezcla de reactivos para el gel separador. | 40 |
| Tabla 5. Mezcla de reactivos para el gel concentrador. | 41 |

Dedicatorias

Al culminar este trabajo de arduo esfuerzo, en primera instancia la dedicatoria va dirigida hacia mis padres, Narcisa Maldonado y Alex Largo, gracias por ser mi apoyo desde el primer día que inicié mi formación académica, por el amor incondicional que me han brindado, por sostenerme en los momentos más difíciles y contribuir de forma significativa en mi formación profesional, espero que todo mi esfuerzo y retribución hacia ustedes se vea reflejado en este trabajo.

En segunda instancia, dedico este trabajo a mi hermana, Katherin Pauleth, porque eres mi mayor fuente de motivación para seguir adelante, y que la culminación de este trabajo sea solo un ejemplo de lo lejos que puedes llegar, y a pesar de las adversidades que se presenten, siempre hay una oportunidad para marcar la diferencia.

En última instancia, la dedicatoria va para la niña pequeña que soñaba con ser Veterinaria, y hoy con la culminación de este trabajo parte de nuestro de objetivo se ha cumplido, sabiendo que lo único imposible es aquello que no intentas.

Estefany Mishel Largo Maldonado

Dedicatorias

A pesar de las adversidades y todo el tiempo invertido se llegó a cumplir la promesa que hace tiempo atrás nos parecía casi imposible de lograrlo, por todo ese esfuerzo y sacrificio empleado dedico mi tesis principalmente a Dios y a la Virgen por acompañarme y darme la fuerza física, mental y emocional para culminar esta meta; del mismo modo, le destino a la persona más valiente y apasionada que puedo conocer: mi niña interior, quién se siente orgullosa por estar cumpliendo una parte de su sueño.

De la misma manera, la dedico a mi pequeño angelito (†*), que desde el cielo es esa luz, dándome la fortaleza para continuar este caminar; a mi hermana Priscila, por acompañarme en cada paso que doy en la búsqueda de mi formación personal y profesional; a mis padres Darío y Adriana, quienes me impulsan a ser mejor y me ayudan a levantarme en cada caída. Que Dios los bendiga.

Finalmente, a mis familiares y amigos, por creer en mí y brindarme toda su ayuda en el transcurso de mi formación académica, pero en especial a: mi tío Nelson, mi hermano Andrés, mi sobrino Matías, mis abuelos Ofelia y Miguel y mi amigo Stalin.

Por todo su apoyo y por siempre estar pendiente de mí, a todos ustedes se les dedico de todo corazón, gracias a ustedes estoy aquí, dando mi último paso para culminar mis estudios.

LOS AMO.

Heydi Isabel Pando Tacuri

Agradecimientos

Quisiera expresar mis sinceros y profundos agradecimientos a mi director de tesis, el Dr. Antonio J. Vallecillo, que por medio de su experiencia, comprensión y paciencia nos ha guiado a través de este arduo y gratificante camino de formación académica. Gracias a su guía constante que nos ha permitido ampliar nuestros conocimientos en el área de biología molecular, descubrimientos nuevos horizontes.

De igual forma, extendiendo mis agradecimientos hacia nuestros revisores, el Dr. Andrés Galarza y Dr. Luis Ayala, por formar parte del desarrollo de este trabajo académico.

Del mismo modo, un agradecimiento especial a mi amiga y compañera de tesis, Heydi Pando, por haber compartido juntas numerosas experiencias durante el transcurso de nuestra formación académica, y en nuestra vida personal.

Estefany Mishel Largo Maldonado

Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar mi profundo agradecimiento al Dr. Antonio J Vallecillo, tutor de esta investigación, por la dedicación, apoyo y orientación que me ha brindado, ya que por su experiencia y conocimiento se logró llegar a realizar esta investigación. Durante todo este tiempo, fue mi mentor y un modelo a seguir no solo en el ámbito profesional, sino en la formación personal ya que con sus conversaciones y consejos hicieron las visitas al laboratorio más amenas.

En segunda instancia, extiendo un sincero agradecimiento a amiga y compañera de esta investigación, Mishel Largo ya que estuvo conmigo en los momentos de estrés y alegría durante este largo y retador camino.

De igual manera, agradezco a mi familia por ser el soporte sentimental y económico a lo largo de este caminar.

Finalmente, a los docente y personas que formaron parte de mi vida universitaria, quienes confiaron en mí y se tomaron el arduo trabajo de transmitirme sus conocimientos.

Heydi Isabel Pando Tacuri

Listado de abreviaturas

| Abreviatura: | Significado: |
|---------------------|---|
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| ADP | Difosfato de adenosina |
| UV | Luz ultravioleta |
| ORF | (Open Reading frame) Marco abierto de lectura |
| ADN | Adenosina difosfato |
| dNTP's | Nucleótidos trifosfatados |
| bp | (Base pair) Pares de bases |
| S | Segundo |
| Min | Minuto |
| °C | Grados Celsius |
| IPTG | Isopropil-tiogalactopiranosido |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galacto-piranosido |
| PCR | (Polymerase Chain Reaction) Reacción en cadena de la polimerasa |
| IMAC | (Immobilized Metal Affinity Chromatography) Cromatografía de afinidad de metales inmovilizados |
| SDS-PAGE | (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida |
| r.p.m. | Revoluciones por minuto |

Introducción

Las chaperonas moleculares pertenecen a diversas familias de proteínas que se encuentran ampliamente distribuidas y fuertemente conservadas en los diversos niveles taxonómicos, su principal función es monitorear la calidad y funcionalidad de otras proteínas (1). Son consideradas como el componente central de los mecanismos celulares empleados contra el desarrollo de enfermedades producto del envejecimiento y el mal plegamiento de las proteínas. Dentro de esta familia de chaperonas se encuentran las proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas del Inglés de *Heat Shock Proteins*), que se expresan como respuesta biológica ante situaciones de estrés en diversos organismos (1).

Las HSP son componentes normales de las células (2); sin embargo, en ausencia de factores de estrés se registran valores basales de concentración que son necesarios para el plegamiento normal de proteínas y el mantenimiento de la transducción de señales. Por el contrario, su incremento no siempre se encuentra relacionado a dichos factores (3).

La HSP70 es una familia constituida principalmente por proteínas producidas en respuesta a situaciones de estrés, como los golpes de calor, estrés osmótico, agresiones ambientales, estrés oxidativo, entre otros (1).

En bovinos (*Bos taurus*), la familia HSP70 está integrada por 18 genes, de las cuales la HSP70.2 está involucrada en los procesos biológicos de espermatogénesis, ejerciendo un efecto protector sobre las células de procesos apoptóticos y estrés oxidativo; por lo tanto, está indirectamente implicada en la fertilidad (4).

Como menciona Tripathy (5) las proteínas HSPA1A y HSPA2 se expresan a nivel de vesícula seminal, en mayor cantidad durante la etapa fetal y primeros meses de vida, y en etapa adulta durante la espermatogénesis, respectivamente (4). Además, se ha descrito la presencia de éstas HSP en el esperma de varios animales incluidos ratones, cerdos, cabras, humanos y bovinos (6).

Rosyada y colaboradores (4) plantean que en la membrana plasmática del espermatozoide se encuentran miembros de la familia HSP70 asociándose con lípidos, y cuando existe un descenso en la expresión de estas proteínas durante las fases de congelación y descongelación, la integridad de la membrana, motilidad y calidad de los espermatozoides se ven afectados. Así mismo, la HSP70.2 está ubicada a nivel de la membrana superficial hasta la pieza intermedia del espermatozoide ejerciendo una acción de protección celular y regulación de la energía para la motilidad; cuando existe una alteración en la cantidad de esta proteína, la función de las enzimas antioxidantes se ve disminuida, favoreciendo a la formación de especies de Oxígeno reactivo (ROS, sus siglas del Inglés - Reactive Oxygen Species) perjudicando al esperma.

Algunas proteínas de la familia HSP70 de ovejas y cabras han sido clonadas, expresadas y purificadas mediante modelos de expresión bacterianos. La secuencia de nucleótidos de estas proteínas en ovejas presenta una homología del 98 % con el ganado vacuno, búfalo y cabra; mientras que en caprinos la relación de homología fue del 98,6 % con la especie bovina (1), lo cual sugiere que es factible obtener estas proteínas de bovino en modelos de expresión bacteriano basados en *Escherichia coli*.

Investigaciones realizadas previamente evidencian que las proteínas de la familia HSP70 podrían ayudar en la supervivencia de los espermatozoides en la criopreservación (4), lo cual implica una posible aplicación importante dentro del área reproductiva ayudando a incrementar las tasas de concepción en los sistemas de producción bovina y manteniendo la diversidad genética. Sin embargo, en Ecuador no se han registrado publicaciones que hayan evaluado el uso de HSP en biotecnología reproductiva aplicable al ganado bovino, debido a la complejidad para producirlas y costo elevado que poseen estas proteínas en el mercado.

Por lo anterior, el propósito de esta investigación es clonar y producir las proteínas HSPA1A y HSPA2 de la familia HSP70 para evaluar su uso en la conservación de germoplasma de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la universidad de Cuenca y así tenerlas disponibles para futuras investigaciones que evalúen el efecto de su adición en la criopreservación de embriones y gametos bovinos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general:

Clonar y producir en un modelo de expresión bacteriana, dos proteínas bovinas de choque térmico.

2.2. Objetivos específicos:

Clonar las secuencias codificantes de las proteínas bovinas de choque térmico HSPA1A y HSPA2 en un vector de expresión bacteriano.

Obtener de forma pura las proteínas recombinantes HSPA1A y HSPA2 bovinas expresadas en *Escherichia coli*.

2.3. Pregunta de investigación

¿Es posible producir las proteínas bovinas de choque térmico HSPA1A y HSPA2 en un modelo de expresión bacteriano?

3. Revisión de la literatura

3.1. Generalidades

Las proteínas, son entendidas como biomoléculas compuestas por secuencias de aminoácidos, juegan roles fundamentales en la vida de los organismos. Estas sustancias exhiben variadas y complicadas secuencias y estructuras que les otorgan diversas características fisicoquímicas, además de tener una función biológica específica, que puede ser solamente estructural, de transporte, señalización, movilización y catálisis, como es el caso de las enzimas (7). En ese sentido, cumplen múltiples funciones, que abarcan desde ser elementos estructurales hasta servir como enzimas, hormonas, mensajeros químicos, transportadores y contribuyentes al sistema inmunológico como efectores con diferentes actividades, entre otras; las proteínas están constituidas a partir de un conjunto común de 20 aminoácidos, de los cuales 9 de ellos no pueden de ser producidos por el organismo animal, lo que los define como aminoácidos esenciales (8).

En otro sentido, las proteínas figuran como los complejos macromoleculares más comunes en la vida, se sintetizan en el interior de las células y desempeñan un papel activo en todas las funciones de los seres vivos. Existen múltiples variedades en cuanto a su forma y tamaño (9). Una proteína se compone de un polímero que incluye una secuencia de compuestos orgánicos denominados aminoácidos. En términos generales, la disposición de aminoácidos en la secuencia determina la configuración tridimensional que adoptará la proteína. Esta estructura de la proteína, a su vez, influye en su actividad química y, por consiguiente, en su actividad biológica (10).

Los organismos vivos sintetizan diversas categorías de proteínas, tales como enzimas, hormonas, anticuerpos, transportadoras, fibras musculares, componentes de la lente ocular, plumas, telarañas, cuernos, antibióticos, toxinas de hongos, en plantas y animales, y muchas otras manifestaciones. Entre todas estas, las enzimas se destacan como las proteínas más especializadas y diversas, ya que prácticamente se encuentran presentes en todas las reacciones celulares, cumpliendo la función de catalizar sustancias intracelulares (9).

3.2. Chaperonas moleculares

Las proteínas definidas como chaperonas conforman un conjunto de péptidos que tienen la capacidad de detectar discrepancias o anomalías en las estructuras de las proteínas. La mayoría de estas chaperonas son identificadas como proteínas que se expresan en respuesta a alteraciones en la temperatura o condiciones ambientales estresantes, y se les denominó como proteínas de choque térmico (11, 12). Del mismo modo, las chaperonas moleculares se entienden como proteínas que ayudan a otras proteínas a adoptar su

conformación funcional, aunque la información para plegarse está en la propia secuencia de aminoácidos, sin embargo, algunas proteínas no logran plegarse correctamente dado un ambiente no favorable (13). Las chaperonas pueden favorecer el plegamiento de proteínas desplegadas o corregir las mal plegadas, evitando la formación de agregados y facilitando la reactivación de proteínas agregadas; también pueden estar involucradas en la degradación de proteínas defectuosas o con alteraciones irreversible al interactuar con proteasas específicas. Esto es esencial para mantener la integridad y función de las proteínas en condiciones de estrés como el calor, la exposición a especies reactivas de Oxígeno y en el caso de algunas enfermedades degenerativas (14).

Las chaperonas moleculares pueden clasificarse en dos amplias categorías en función de su requerimiento de energía: aquellas que necesitan para su funcionamiento ATP y aquellas que no (15, 16). Las chaperonas que dependen del ATP utilizan ciclos de hidrólisis del ATP, acompañados de cambios conformacionales significativos, para reconocer, plegar y liberar sus proteínas sustrato. Estas proteínas poseen un peso molecular elevado y se organizan en oligómeros para llevar a cabo sus funciones como chaperonas. Entre los ejemplos más investigados se encuentran HSP60 (GroEL/ES), HSP70/HSP110 (DnaK), HSP40 (DnaI), HSP104 (ClpB) y HSP90 (HtpG) (17, 18).

Es importante añadir que la proteostasis es esencial para mantener la estabilidad de las proteínas en las células y prevenir problemas de plegamiento. Esto se logra a través de una red compleja que incluye chaperonas moleculares, el sistema de ubiquitinaproteasoma (UPS) y la autofagia. Estos componentes aseguran la síntesis adecuada de proteínas, evitan el plegamiento incorrecto y eliminan proteínas mal plegadas, previniendo la acumulación de agregados tóxicos de proteínas en los organismos vivos (19, 20).

Dentro de la red de proteostasis, se puede caracterizar a las chaperonas mediante sus funciones efectivas en el entorno celular, dado que pueden desempeñar roles como sostén, favorecer el plegado, transportadoras o desintegradoras (20). Además, no existe una restricción para que una chaperona particular se adhiera exclusivamente a una actividad, ya que en ocasiones una misma chaperona puede ejecutar múltiples de estas funciones según la perspectiva de (21-25). De acuerdo a las actividades que pueden desplegar las chaperonas se pueden definir como:

- **Chaperonas holdasas**, en su mayoría, actúan de manera independiente del ATP y se asocian con proteínas no nativas durante un período prolongado para mantenerlas estables y evitar que se agrupen. A pesar de no estar directamente involucradas en el proceso de plegamiento de las proteínas, su función es esencial, ya que protegen a aquellas proteínas que son susceptibles a la agregación. Un ejemplo de chaperonas holdasas son las pequeñas proteínas de choque térmico (sHsp, por sus siglas del Inglés).

- **Chaperonas foldasas** desempeñan un papel activo en la reestructuración de las proteínas recién sintetizadas que no han alcanzado su estado nativo, a través de un ciclo que implica la unión alternante a las moléculas de ADP y ATP. Entre los sistemas de chaperonas foldasas más destacados se encuentran las familias de proteínas HSP70/DnaK, HSP60/GroEL y HSP90.
- **Chaperonas translocasas** se dedican al transporte de proteínas recién formadas a través de las membranas. Su relevancia es particularmente alta en organismos procariotas, donde alrededor de un tercio de todas las proteínas se exportan desde el citoplasma y, por lo tanto, necesitan ser trasladadas a través de la membrana interna.
- **Chaperonas disgregasas** tienen la capacidad de desenredar agregados insolubles de proteínas y, en algunos casos, sirven como guía para la degradación de proteínas al interactuar con componentes proteolíticos. Uno de los principales sistemas de chaperonas con actividad disgregasa es la familia de proteínas dependientes de ATP Clp/HSP100.

3.3. Proteínas de choque térmico

Las HSP's son un grupo de chaperonas moleculares que evitan la agregación de proteínas no específicas y ayudan a las proteínas celulares a alcanzar su estructura funcional para mantener la homeostasis (26). Las HSP's son una gran familia de proteínas que permiten que las células se adapten progresivamente al entorno cambiante, lo que influye significativamente en la adaptación térmica y la tolerancia a diferentes formas de estrés (27). La amplia familia de las HSP's se clasifican según el peso molecular, expresado en kiloDalton (kDa), incluyendo así las HSP's pequeñas: HSP10 (10 kDa), HSP22, HSP27 y HSP32; y HSP's de alto peso molecular: HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 y HSP100 (28).

La respuesta celular al choque térmico incluye la activación de factores de choque térmico, una mayor expresión de las HSP's, un aumento de los niveles de oxidación de aminoácidos y Glucosa, reducción del metabolismo de los ácidos grasos y estimulación de los sistemas inmunológico y endocrino a través de la secreción extracelular de HSP (26). Las HSP son ubicuas en casi todos los organismos procarióticos y eucariotas. Entre ellas, las HSP70 desempeñan funciones internas en el control de la calidad de las proteínas y el plegamiento de las mismas, lo que lleva a la prevención de la acumulación de agregados proteicos y la reparación de proteínas mal plegadas (29). Además de ello, su función principal es estabilizar proteínas inestables mediante interacciones controladas, promoviendo su ensamblado adecuado y evitando la desnaturalización. Es por ello que estas proteínas desempeñan un papel fundamental en la autodefensa celular y son esenciales para mantener la homeostasis en condiciones de estrés. Son altamente conservadas y se encuentran en todos los organismos eucariotas (30). Las HSP's no solo están relacionadas

con la tolerancia al calor y la supervivencia celular en situaciones de lesión y estrés oxidativo; además, pueden desempeñar un papel crucial en la protección contra la apoptosis celular (31).

3.3.1. Proteínas de choque térmico 70 (HSP70)

Estas proteínas con actividad de chaperonas restauran la conformación nativa de proteínas parcialmente desnaturalizadas después de la exposición a formas proteotóxicas de estrés y son fundamentales para el plegamiento y el tráfico intracelular de proteínas sintetizadas *de novo* en condiciones normales (32). En los vertebrados, existen dos formas principales de expresión de las HSP70's: varios miembros exhiben patrones de expresión constitutivos, mientras que otros son inducidos por diversas tensiones que interrumpen el plegamiento adecuado de las proteínas y están regulados por el factor de choque térmico 1 (HSF1) (33). Las historias evolutivas de las HSP70, y especialmente de las formas inducibles, son bastante complejas con eventos de evolución convergente y duplicación de genes (34). Las HSP's están estrechamente asociadas con la respuesta celular a una variedad de factores estresantes, y no están simplemente vinculadas al estrés por calor, como inicialmente se creyó. Normalmente están presentes en el citoplasma, las mitocondrias, el núcleo y el retículo endoplásmico, mientras que durante y después del estrés por calor se localizan principalmente en el núcleo. En condiciones normales, las HSP70's participan en el plegamiento postraducciona l y el transporte de proteínas celulares a través de las membranas y ahora se asume que participan en la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (33, 35).

La adición de anticuerpos para HSP70's en embriones tempranos cultivados *in vitro* suprime el proceso de formación de blastocistos tanto en ganado vacuno como en ratones. Bajo estrés térmico, las HSP70's desempeñan un papel vital al preservar la estabilidad del citoesqueleto, regular el ciclo celular y la respuesta inmune, prevenir la apoptosis celular y contribuir a la termotolerancia de las células. Durante el estrés por calor, las HSP's se pueden encontrar en el espacio extracelular, a través de mecanismos que involucran a los lisosomas a través de partículas unidas a membranas o por fuga pasiva de células necróticas después de la alteración de sus membranas (33, 35).

Desde otra perspectiva, la HSP70 es esencial en procesos celulares relacionados con el estrés, de modo que las variaciones de las secuencias de sus genes pueden fijarse en respuesta al entorno. Se ha evidenciado que existen variantes genéticas de las HSP70's se asocian con la tolerancia al calor en el ganado, se considera que el denominado alelo A tiene un efecto positivo, especialmente observándose en el genotipo AA mayor resistencia al estrés térmico. Esto sugiere que HSP70's podría usarse como marcador genético para

mejorar la termotolerancia del ganado bovino mediante la selección asistida por marcadores (36). Por otro lado, en diferentes razas de bovinos, se han identificado polimorfismos en los genes de las HSP70's, y algunos de estos polimorfismos se asocian con una mayor viabilidad celular en condiciones de calor (37).

3.4. Proteína de choque térmico HSPA1A

3.4.1. Generalidades

HSPA1A, también llamada HSP70.1 o HSP72, es un miembro de la familia de proteínas HSP70, codificada por el gen HSPA1A. La función principal de la HSPA1A, una proteína HSP70 inducible, es proteger las células del estrés térmico actuando como acompañante de las proteínas objetivo para su degradación o interacción; asiste en el proceso adecuado de la conformación de proteínas recién creadas y en la reestructuración de proteínas que han perdido su estructura natural o también cuando se han plegado de manera incorrecta debido a situaciones de estrés. Esto previene la aparición de grupos de proteínas dañadas y da soporte a la estabilidad y el funcionamiento de las proteínas presentes en las células (38).

3.4.2. Características de la HSPA1A

La proteína en cuestión es ampliamente preservada a lo largo de la evolución, lo que enfatiza su significancia crítica en los sistemas biológicos, formando un sistema primario para autodefensa intracelular. Su característica más destacable es su capacidad de respuesta, ya que su expresión aumenta de manera notable en situaciones de estrés, particularmente cuando se trata de estrés debido a la temperatura. Además, esta proteína no trabaja sola, sino que colabora estrechamente con co-chaperonas, como Hsp40 y Hsp90, desempeñando un papel fundamental en la facilitación de procesos celulares y moleculares esenciales. Su habilidad para ajustarse a condiciones cambiantes y su participación en redes de interacciones la convierten en un componente esencial en la maquinaria molecular de los organismos vivos (39-42).

3.4.3. Estructura de la HSPA1A

La estructura de la HSPA1A se compone de dos dominios esenciales: uno en el extremo aminoterminal, con actividad de ATPasa, y el extremo carboxiterminal, capaz de interactuar con el sustrato sujeto a procesamiento (**Figura 1**). Esta proteína tiene la capacidad de unir y liberar repetidamente el ATP, lo que le permite desempeñar funciones relacionadas con el plegamiento y desplegamiento de proteínas. Además, se ha observado que la HSPA1A se

encuentra también en la membrana plasmática, particularmente en la superficie de las células de varios tipos de tumores (43-45).

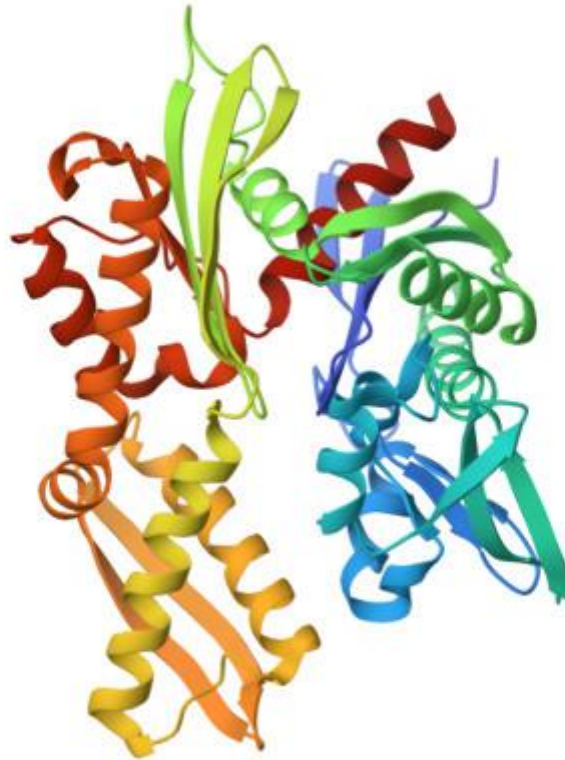


Figura 1. Modelo estructural de la proteína HSPA1A. Recuperado de: (<https://www.rcsb.org/structure/2e8a>).

3.4.4. Funciones de la HSPA1A

La HSPA1A unida a una membrana desempeña funciones biológicas importantes, ya que activa el sistema inmunológico, media la endocitosis independiente de Clatrina, facilita la entrada viral y regula la supervivencia de las células tumorales. Además, la HSPA1A desempeña un papel crucial en la célula al funcionar como una chaperona, manteniendo el equilibrio de las proteínas y promoviendo la supervivencia en situaciones de estrés o en células cancerosas. Su capacidad para interactuar con fragmentos hidrofóbicos de proteínas mal plegadas, impulsada por el ATP y su dominio de unión a nucleótidos (NBD) que se integra en su estructura, aseguran que las proteínas recién sintetizadas o con plegamientos defectuosos logren su correcta funcionalidad. Además, esta proteína actúa como un escudo contra el estrés térmico, evitando la agregación de proteínas debida al

calor y preservando la estabilidad de las proteínas celulares. Al mismo tiempo, desempeña un papel central en la regulación de la respuesta celular al estrés al activar rutas de señalización que favorecen la supervivencia celular. Finalmente, su capacidad para facilitar el transporte de proteínas a través de membranas celulares y orgánulos resulta esencial en procesos vitales como la translocación de proteínas en el retículo endoplásmico y la mitocondria (43, 44, 46-48).

3.4.5. Aplicación de la proteína HSPA1A en biotecnología

La biotecnología de proteínas se enfoca en aislar, producir y mejorar proteínas específicas a partir de diversas fuentes naturales, como plantas, animales y microorganismos, para su uso en diversas aplicaciones (49). La proteína HSPA1A ha demostrado presentar algunas aplicaciones dentro de la biotecnología para los animales y humanos. La variación genética en los genes HSP y el papel central de HSP70 en la tolerancia térmica sugieren su utilidad como marcador genético para mejorar la tolerancia al calor a través de la selección asistida por marcadores (36).

La proteína HSPA1A, también conocida como HSP70.1, juega un papel clave en la protección y preservación de células y estructuras celulares, especialmente en situaciones de estrés como la criopreservación. En bovinos han demostrado que la expresión de la proteína HSP70.1 en linfocitos está relacionada con el estrés térmico. Además, se ha encontrado polimorfismo en el gen HSP70.1 en diversas razas bovinas, como Angus y Brahman (*Bos indicus*), con implicaciones en la adaptación al calor (36). La criopreservación de embriones, que implica congelar y descongelar células y tejidos, puede someter a las células a estrés. En este contexto, HSPA1A juega un papel crucial a la hora de proteger estas células y garantizar su viabilidad y desarrollo. Además, ayuda a reducir el riesgo de daño celular durante la congelación y descongelación, cuando las células pueden verse comprometidas por los cambios de temperatura y la formación de cristales de hielo. Además, en la criopreservación para la transferencia de embriones y la preservación de la diversidad genética en bancos de genes, HSPA1A puede desempeñar un papel importante en la preservación de la integridad genética de los embriones almacenados al prevenir daños al ADN y otras estructuras genéticas (50).

Además, en otros modelos animales se ha demostrado que la hipertermia y la inducción de HSP70.1 pueden reducir la replicación de patógenos en especies como el langostino jumbo o langostino tigre (*Penaeus monodon*) y Artemia (*Artemia franciscana*), sugiriendo un papel crucial de las HSP's en la respuesta inmune, lo que indican que el aumento de temperatura influye en la dinámica de las infecciones, con un mayor número de langostinos infectados a temperaturas más altas, pero menor mortalidad (51).

Por otro lado, la proteína HSPA1A (HSP70) es conocida por su papel en la protección y respuesta celular ante el estrés, incluyendo situaciones de enfermedades infecciosas y sepsis. En este contexto, la expresión o variaciones en la proteína HSPA1A en un individuo podrían influir en su susceptibilidad y respuesta ante la sepsis. Los biomarcadores moleculares, como la expresión de HSPA1A u otros genes relacionados con la respuesta al estrés, podrían ayudar a identificar pacientes con mayor riesgo o distintos perfiles de respuesta ante esta enfermedad compleja (52).

3.5. Proteína de choque térmico HSPA2

3.5.1. Generalidades

En los mamíferos la proteína HSPA2, relacionada con el choque térmico, desempeña un papel fundamental en la espermatogénesis, siendo un componente esencial para garantizar una fertilización exitosa de los ovocitos (53). Inicialmente, se consideraba que HSPA2 era específica de los tejidos testiculares, la cual adicionalmente pertenece a la familia de proteínas HSPA no inducibles por estrés. Sin embargo, se ha descubierto que esta proteína también se encuentra presente en ciertos tejidos somáticos humanos, incluyendo los epitelios multicapa (54). Es importante resaltar que HSPA2 es un miembro relativamente poco caracterizado de la familia HSPA, también conocida como HSP70.2. Originalmente se ha identificado como específica de los testículos y se encontró en niveles más elevados en los espermatozoides paquitenos de roedores, su expresión no es inducida por estrés térmico, y desempeña un papel crucial en la fertilidad (55).

3.5.2. Características de la HSPA2

La proteína HSPA2 es altamente conservada, exhibiendo una estructura característica de la familia HSP70. Su expresión se encuentra principalmente focalizada en los testículos, aunque también se ha detectado en otros tejidos. A diferencia de algunas proteínas de choque térmico, su expresión no se ve influenciada por el estrés térmico. Además, se ha descubierto que la HSPA2 está presente en tejidos somáticos humanos, incluyendo los epitelios multicapa, y su función en estas células no se comprende completamente. Investigaciones recientes han revelado que la HSPA2 favorece la proliferación de células normales derivadas del epitelio bronquial humano y está presente en varios tipos de células neoplásicas malignas. Sin embargo, su importancia en estos contextos, como en las células cancerosas de pulmón, mama o cuello uterino, sigue siendo objeto de estudio, ya que las células cancerosas parecen perder la HSPA2 en condiciones de estrés proteotóxico, lo que puede estar relacionado con la fosforilación del HSF1, el principal regulador de la expresión de los genes HSPA (55-59).

3.5.3. Estructura de HSPA2

La HSPA2 tiene un dominio de unión a nucleótidos (NBD) y un dominio de unión a sustrato (SBD) unidos por un enlace hidrofóbico (**Figura 2**). El NBD tiene afinidad por Adenosina y controla la forma de la proteína. El SBD se une a péptidos hidrofóbicos con carga positiva. Esta característica es común en proteínas y aumenta en proteínas desnaturalizadas o recién traducidas (60).

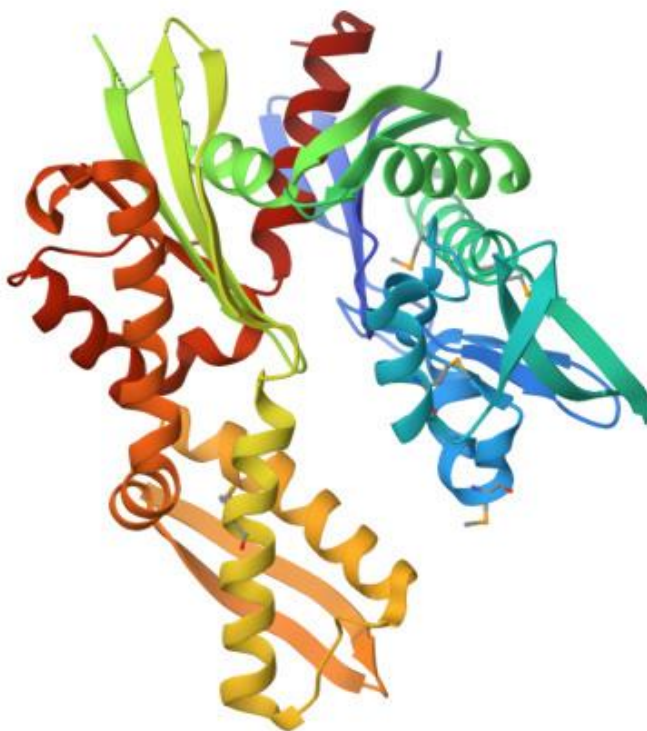


Figura 2. Modelo estructural de la proteína HSPA2. Recuperado de: (<https://www.rcsb.org/structure/4FSV>).

La HSPA2 se encarga de unir péptidos en una conformación extendida mediante enlaces de hidrógeno y contactos hidrofóbicos. Su función depende de cambios conformacionales regulados por la hidrólisis de ATP. Esto permite la unión y liberación de péptidos, afectando la estabilidad de proteínas. Las proteínas HSP40 influyen en la velocidad de hidrólisis de ATP y la actividad de la HSPA2. Su flexibilidad y modularidad le permiten realizar diversas funciones, aunque comprender sus mecanismos sigue siendo desafiante y requiere estudios estructurales y cinéticos (61, 62).

3.5.4. Funciones de la HSPA2

Esta proteína desempeña un papel esencial en la espermatogénesis y la fertilidad masculina al favorecer y mantener la calidad de los espermatozoides. La función principal de HSPA2 en los testículos radica en mantener de manera adecuada el plegamiento y el funcionamiento de las proteínas relacionadas con el proceso de formación de los espermatozoides. Conforme los espermatozoides se desarrollan, HSPA2 contribuye a evitar el inapropiado plegamiento o la unión incorrecta de las proteínas esenciales, asegurando así la producción de espermatozoides que sean funcionales y saludables. Asimismo, HSPA2 también tiene un papel relevante en resguardar a los espermatozoides frente al estrés celular y en prepararlos para llevar a cabo la fertilización (55, 58, 60, 63).

3.5.5. Aplicación de la proteína HSPA2 en biotecnología

Dentro de las aplicaciones de la proteína HSPA2, se ha podido hallar que la proteína de choque térmico es un factor clave en el estudio de la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía. En el que se señala que los cambios en la expresión de genes y proteínas son cruciales para el desarrollo de esta enfermedad. Además, HSPA2 se destaca como un regulador clave en los procesos de la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía y se relaciona con la elevación de la concentración de la proteína β -amiloide y la proteína Tau asociada a microtúbulos (64).

Además, está relacionada con el cáncer y se ha estudiado como un posible objetivo terapéutico. Dado que el control del plegamiento y desplegado de proteínas es esencial para regular la actividad de las proteínas en las células, incluidas aquellas implicadas en la proliferación y supervivencia celular en el cáncer. Al ser desplegadas, las chaperonas pueden corregir estructuras proteicas tridimensionales y así controlar la calidad de las proteínas en la célula (65).

Finalmente, como ya se indicó la proteína HSPA2 está relacionada con la espermatogénesis y es esencial para el éxito de la fertilización de los ovocitos en mamíferos. Esta proteína se encuentra en el plasma seminal y se ha investigado como un posible biomarcador de la salud reproductiva masculina. Su detección o ausencia en el plasma seminal podría indicar el estado de la espermatogénesis y la capacidad de fertilización de los espermatozoides. Estos hallazgos tienen implicaciones en aplicaciones de reproducción asistida y pueden ser relevantes para evaluar la infertilidad masculina y el éxito del tratamiento reproductivo, lo que sugiere un posible uso de HSPA2 como biomarcador en biotecnología reproductiva (53).

La evaluación del uso de las HSP's en biotecnología de la reproducción se encuentra limitada por la carencia de acceso a estas moléculas desde las fuentes originales,

problemática que puede ser resuelta mediante la aplicación de herramientas de biología molecular para la generación de modelos de expresión para la obtención de estos péptidos recombinantes.

3.6. Producción de proteínas recombinantes

La primera consideración fundamental en el proceso de obtención de una proteína mediante y las técnicas de recombinación genética se relaciona con la adecuada elección del sistema de expresión. Un sistema de expresión está constituido por un organismo anfitrión y un vector de expresión que contiene todos los elementos genéticos necesarios para llevar a cabo los pasos de transcripción y traducción del gen de interés en el mencionado organismo anfitrión, así como su replicación y segregación. La selección del sistema de expresión más apropiado dependerá de una serie de factores, que abarcan desde el origen biológico y las propiedades específicas de la proteína deseada, hasta las características de crecimiento del organismo anfitrión, los niveles de expresión deseados y la ubicación celular de la proteína. Además, se deben tener en cuenta las posibles modificaciones postraduccionales y su influencia en la actividad biológica de la proteína, así como los aspectos regulatorios que pueden surgir en el contexto de su posterior aplicación. Por último, pero no menos importante, se debe considerar el aspecto económico en todo el proceso (66). Uno de los modelos de expresión más económico, sencillo, mejor conocido y para el cual se tiene una amplia diversidad de vectores o elementos genéticos de expresión es el basado en la utilización de la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*).

3.7. *Escherichia coli* como biofábrica

E. coli se emplea ampliamente en la industria biotecnológica para la producción de proteínas recombinantes con fines diagnósticos, terapéuticos o vacunales, mediante procedimientos relativamente económicos, ya que ha sido exhaustivamente caracterizada desde el punto de vista genético y fisiológico (67).

E. coli es el principal hospedero en sistemas procarióticos, ampliamente utilizado en laboratorios y la industria debido a su conocimiento en fisiología y genética, lo que facilita la clonación y cultivo. Su rápido crecimiento y alta producción de proteínas heterólogas lo convierten en una biofábrica. Se han manipulado genéticamente cepas de *E. coli* para eliminar genes relacionados con la patogenicidad, lo que las hace seguras para fermentaciones a gran escala. Estos sistemas usan vectores plasmídicos con elementos esenciales, como origen de replicación, promotor, sitio de unión al ribosoma, secuencia codificante, terminadores de transcripción y marcadores de resistencia a antibióticos para

garantizar la replicación y expresión del gen clonado. También pueden incluir un gen regulador para modular los niveles de expresión (68, 69).

Aunque los sistemas procarióticos son comunes debido a su facilidad y bajo costo, a veces son limitados para producir proteínas eucarióticas debido a la falta de modificaciones postraduccionales esenciales, como la formación de puentes disulfuro y glicosilaciones. Además, las proteínas expresadas en bacterias pueden formar agregados insolubles llamados cuerpos de inclusión, lo que requiere técnicas adicionales para su purificación y puede resultar en pérdida de rendimiento y aumento de costos. Por lo tanto, en algunos casos, se utilizan sistemas de expresión eucarióticos, como levaduras, baculovirus/células de insectos, células de mamíferos, protozoos, hongos filamentosos y células de plantas, especialmente cuando se requieren modificaciones postraduccionales para la actividad biológica. También se han desarrollado sistemas de expresión libres de células para proteínas integrales de membrana altamente tóxicas para los hospederos (66, 70).

4. Materiales y métodos

4.1. Descripción del estudio

Las actividades del proyecto de investigación se llevaron a cabo en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la universidad de Cuenca, donde se diseñaron y se obtuvieron las construcciones genéticas para producir las proteínas bovinas de choque térmico HSPA1A y HSPA2 en *E. coli*; para lo cual se utilizó material genético del biobanco perteneciente al laboratorio.

4.2. Actividades experimentales

4.2.1. Actividad experimental 1: Diseño de primers u oligonucleotidos y construcciones genéticas

4.2.1.1. Materiales

4.2.1.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio

- Software libre SerialCloner versión 2.6.1
- Información digital de la secuencia codificante de la HSPA1A, Genbank ID: NM_203322.3
- Información digital de la secuencia codificante de la HSPA2, Genbank ID: NM_174344.1

4.2.1.2. Procedimiento

Paso 1. De la base de datos del Genbank de la National Library of Medicine (NIH) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), se obtuvo información digital de las secuencias codificantes de referencia, mediante el número de identificador NM_203322.3 y NM_174344.1, de las proteínas HSPA1A y HSPA2, respectivamente. De igual forma se consiguió las secuencias de las proteínas HSPA1A (NP_976067.3) y de la HSPA2 (NP_776769.1).

Paso 2. La información digital de las secuencias fue revisada manualmente y se generó un archivo en el procesador de texto Writer del paquete de ofimática LibreOffice versión 7.5.8 (<https://es.libreoffice.org/descarga/libreoffice/>).

Paso 3. En cada una de las secuencias codificantes se analizó mediante el software SerialCloner versión 2.6.1 (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) si las enzimas de restricción NdeI y BamHI no cortasen las secuencias, para ser incluidas en los oligonucleotidos a diseñar y así amplificar la secuencia codificante de HSPA1A (HSPA1A-For: GCATATGGCGAAAAACATGGCTATC y HSPA1A-Rev: CGGATCCTTAATCCACCTCCTCAAATGGTGG) y de HSPA2 (HSPA2-For: GCATATGTCTGCCCGCGGCCCGG y HSPA2-Rev: TTAGTCCACTTCTCGATGGTCCGTCCC), en los cuales se incluyó el sitio de restricción

para la enzima NdeI (CATATG) en los primers sentido (For) de ambas proteínas y para BamHI (GGATCC) únicamente en el primer antisentido de HSPA1A.

Paso 4. Se seleccionaron las regiones de los extremos de las secuencias codificantes para identificar la longitud de los oligonucleotidos con una temperatura media de hibridación TM similar, de igual manera con el uso del software SerialCloner.

Paso 5. Con el mismo software se simuló el PCR con los oligonucleotidos modificados con las enzimas restricción, el producto de PCR se empleó para simular la clonación el vector pGEM-T (Promega) y posterior subclonación con las enzimas restricción NdeI/BamHI en el vector pET15b (Novagen). Y adicionalmente, se simularon los mapas de restricción para validar la clonación y subclonación.

Paso 6. Con el diseño concluido se procedió a la gestión y adquisición del servicio de síntesis de los oligonucleótidos a la empresa Macrogen (Corea).

4.2.2. Actividad experimental 2: Amplificación de secuencias codificantes mediante PCR

4.2.2.1. Materiales

4.2.2.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio

- Set de micropipetas y sus puntas estériles
- Microtubos Eppendorf de varios volúmenes
- Tubos de PCR
- Cooler
- Refrigerador (4 °C)
- Congelador (-20 °C)
- Cabina de PCR
- Vórtex
- Picofuga
- Termociclador
- Cristalería de laboratorio
- Platina de calentamiento y agitación magnética
- Potenciómetro (pH metro)
- Autoclave
- Equipo de filtración (Ø 0,22 nanometros).
- Vórtex
- Balanza analítica
- Cámara de electroforesis horizontal
- Horno de microondas
- Transiluminador UV

- Fotodocumentador UV (ChemiDoc XRS+ System, BioRad)
- Computadora de escritorio e impresora

4.2.2.1.2. Materiales biológicos

- Muestras de ADN bovino perteneciente al biobanco del laboratorio de biología molecular.

4.2.2.1.3. Reactivos y soluciones

- Agua grado biología molecular (Sigma Aldrich, Cat. no.: W4520)
- Enzima *Pfx* ADN polimerasa (Invitrogen, Cat. No.: 11708-039) con la Solución buffer de amplificación 10X, Solución enhancer 10X y la Solución de MgSO₄ a 50 mM.
- Solución de dNTP's a 10 mM de cada uno (dNTP's set, Thermo-scientific, Cat. No.: R0182)
- Oligonucleótido sentido HSPA1A-For (GCATATGGCGAAAAACATGGCTATC) (Macrogen) y oligonucleótido antisentido HSPA1A-Rev (CGGATCCTTAATCCACCTCCTCAAATGGTGG) (Macrogen). Estos oligonucleótidos amplifican un producto de PCR de 1.937 pares de bases (bp).
- Oligonucleótido sentido HSPA2-For (GCATATGTCTGCCCGCGGCCCGG) (Macrogen) y oligonucleótido anti sentido HSPA2-Rev (TTAGTCCACTTCCTCGATGGTCCGGTCCC) (Macrogen). Estos oligonucleótidos amplifican un producto de PCR de 1.900 bp.
- Agarosa (Invitrogen, Cat. No.: 16500-500)
- Solución buffer TAE 1X (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA, pH 8,0) (Sigma Aldrich, Cat. no.: T4661, A6283, EDS, S8045)
- Solución de Bromuro de etidio a 10 mg/ml (Sigma Aldrich, Cat. no.: E7637)
- Solución buffer de carga 6X para ADN (60 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 6 mM de EDTA, pH 8,0; 0,3 % de Azul de bromofenol; 0.3 de Xilencianol y 30 % de Glicerol) (Sigma Aldrich, Cat. no.: T4661, 320331, EDS, S8045, B8026, X1426, G5516)
- Marcador de peso molecular de ADN (Invitrogen, Cat. no.: 10488058)

4.2.2.2. Proceso de amplificación

Una vez obtenidos los primers diseñados, se utilizó material genético bovino del biobanco del laboratorio de Biología Molecular, y se siguió el protocolo descrito por Pawar y colaboradores (1), con las modificaciones que a continuación se describen.

Pasos a seguir:

Paso 1. Para el proceso de amplificación en el ensayo de PCR se elaboró una mezcla (**Tabla 1**) para alcanzar un volumen final de 25 µl por reacción; se agitó en el vortex durante 4 a 6 s y posteriormente se centrifugó por 15 a 20 s en la picofuga.

Tabla 1. Composición de la mezcla de reacción para los ensayos de PCR para la amplificación de secuencias codificantes para HSPA1A y HSPA2.

| Reactivo | Concentración | | Volumen | |
|-------------------------------|---------------|------------|---------------|--------------|
| | inicial | final | de premezcla | por reacción |
| Agua grado biología molecular | No aplica | No aplica | 79,5 µl | 15,9 µl |
| Buffer de amplificación 10X | 10X | 1X | 12,5 µl | 2,5 µl |
| Enhancer 10X | 10X | 1X | 12,5 µl | 2,5 µl |
| MgSO ₄ | 50 mM | 2 mM | 5 µl | 1 µl |
| dNTP's. | 10 mM c/u*** | 0,2 mM c/u | 2,5 µl | 0,5 µl |
| Primer sentido (For)* | 100 µM | 0,8 µM | 1 µl | 0,2 µl |
| Primer antisentido (Rev)** | 100 µM | 0,8 µM | 1 µl | 0,2 µl |
| Enzima Pfx ADN polimerasa | 25 U/µl | - | 1 µl | 0,2 µl |
| Volumen parcial | | | 115 µl | 23 µl |
| Muestra de ADN total | - | - | 10 µl | 2 µl |
| Volumen final | | | 125 µl | 25 µl |

* For, HSPA1A-For o HSPA2-For, respectivamente.

** Rev, HSPA1A-Rev o HSPA2-Rev, respectivamente.

*** c/u, de cada uno de los dideoxinucleotidos trifosfatados.

Paso 2. Al volumen total de las premezclas (115 µl) se le agregaron 10 µl de la muestra de ADN total, las soluciones finales se mezclaron en el vortex, y el contenido se colecto con ayuda de la picofuga, finalmente las mezclas se dividieron en 5 microtubos (200 µl) previamente identificados, quedando un volumen final por reacción de 25 µl, posteriormente se llevaron los microtubos de PCR al termociclador.

Paso 3: En el termociclador las reacciones de PCR para cada proteína (HSPA1A y HSPA2) fueron sometidas a un perfil de temperatura específico para cada proteína (**Tablas 2 y 3**).

Tabla 2. Perfil de temperaturas de amplificación de la secuencia codificante de la HSPA1A.

| Etapa | Desnaturalización inicial | 35 ciclos | | | Extensión final | Almacenamiento |
|-------------------|---------------------------|-------------------|--------------|-----------|-----------------|----------------|
| | | Desnaturalización | Alineamiento | Extensión | | |
| Tiempo (min, ''s) | 5' | 30'' | 25'' | 1'30'' | 5' | ∞ |
| Temperatura (°C) | 94,0 | 94,0 | 58,0 < 68,0 | 68,0 | 68,0 | 4,0 |

| Curva de temperatura de alineamiento | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| No: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| TM (°C) | 58,0 | 58,3 | 58,9 | 59,8 | 61,1 | 62,4 | 63,6 | 64,9 | 66,2 | 67,1 | 67,7 | 68,0 |
| Tubo no.: | 1 | 2 | | 3 | | 4 | 5 | | | | | |

Tabla 3. Perfil de temperaturas de amplificación de la secuencia codificante de la HSPA2.

| Etapa | Desnaturalización inicial | 35 ciclos | | | Extensión final | Almacenamiento |
|-------------------|---------------------------|-------------------|--------------|-----------|-----------------|----------------|
| | | Desnaturalización | Alineamiento | Extensión | | |
| Tiempo (min, ''s) | 5' | 30'' | 25'' | 1'30'' | 5' | ∞ |
| Temperatura (°C) | 94,0 | 94,0 | 58,0 < 68,0 | 68,0 | 68,0 | 4,0 |

| Curva de temperatura de alineamiento | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| No: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| TM (°C) | 58,0 | 58,3 | 58,9 | 59,8 | 61,1 | 62,4 | 63,6 | 64,9 | 66,2 | 67,1 | 67,7 | 68,0 |
| Tubo no.: | | | 1 | 2 | | 3 | | | 4 | | 5 | |

Paso 4: Una vez concluido el proceso de amplificación, las reacciones de PCR fueron resueltas mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1,2 % teñido con Bromuro de etidio.

Paso 5: Las imágenes de los geles fueron fotodocumentadas para su análisis.

Nota: En los ensayos de amplificación de la secuencia codificante de la proteína HSPA2 se ensayaron diferentes temperaturas de hibridación, así como ajustes en la concentración de la Solución Enhancer, para ello se emplearon concentraciones de 2X y 3X teniendo como referencia lo descrito en las **Tablas 1 y 3**.

4.2.3. Actividad experimental 3: Clonación de la secuencia codificante de la HSPA1A y construcción del plásmido de expresión

4.2.3.1. Materiales

4.2.3.1.1. Material físicos y equipos de laboratorio

- Set de pipetas y sus puntas estériles
- Refrigerador (4 °C)
- Congelador (-20 °C)
- Ultracongelador (-80 °C)
- Mechero de alcohol y recipiente con Alcohol etílico

- Palillos estériles y asa de Drigalsky
- Horno de microondas
- Centrífuga
- Microcentrífuga refrigerada
- Vórtex
- Tubos Eppendorf de varios volúmenes
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml
- Bloque de calentamiento
- Balanza analítica
- Autoclave

4.2.3.1.2. Materiales biológicos

- Vector o plásmido de clonación pGEM-T [pGEM-T Easy Vector System I] (Promega, Cat. no.: A1360)
- Vector de expresión pET15b (Novagen, Cat. no.: 69661-3)
- Enzimas de restricción EcoRI, EcoRV, NdeI y BamHI (Thermo-scientific, Cat. no.: ER0271, ER0301, ER0581, ER0051)
- Enzima *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, Cat. no.: 10966-030), con la Solución buffer de reacción de PCR 10X, y la Solución 50 mM de MgCl₂
- Solución de dATP a 10 mM (dNTP´s set, Thermo-scientific, Cat. No.: R0182)
- Enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific, Cat. no.: EL0011)
- Cepa de *E. coli* TOP10 para clonación (Invitrogen, Cat. no.: 10368022)

4.2.3.1.3. Reactivos y soluciones

- Solución 5 M de NaCl (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014)
- Solución de Etanol absoluto fría (Sigma Aldrich, Cat. no.: E7148)
- Solución de Etanol al 70 % fría (Sigma Aldrich, Cat. no.: E7148, W4520)
- Agua grado biología molecular (Sigma Aldrich, Cat. no.: W4520)
- Solución 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0 (Sigma Aldrich, Cat. no.: T1503, W4520)
- Solución 100 mM de IPTG (Thermo Scientific, Cat. no.: R0392)
- Solución 20 mg/ml de X-Gal (Promega, Cat. no.: V394A) en Dimetilformamida (Sigma Aldrich, Cat. no.: D4551)
- Solución 100 mg/ml de Carbenicilina (Sigma Aldrich, Cat. no.: C1389)
- Kit de purificación de plásmidos [GeneJET Plasmid Miniprep Kit] (Thermo Scientific, Cat. no.: K0503)
- Kit de purificación de ADN [GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit] (Thermo Scientific, Cat. no.: K0832)

- Caldo de cultivo LB [1% de NaCl, 1% de Triptona peptona y 0,5% de Extracto de levadura] (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014, T7293, Y1625)
- Placas de agar LB [1 % de NaCl, 1 % de Triptona peptona, 0,5 % de Extracto de levadura y 1,5 % de agar microbiológico] (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014, T7293, Y1625, A1296)
- Caldo de cultivo SOC [2 % Triptona peptona, 0.5 % Extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM de Glucosa] (Sigma Aldrich, Cat. no.: T7293, Y1625, S3014, 746436, M2670, M2643, G7021)

4.2.3.2. Proceso de clonación de la secuencia codificante de la HSPA1A en el vector pGEM-T y subclonación en el vector de expresión pET15b

El producto de PCR de la secuencia codificante de la HSPA1A inicialmente se clonó en el plásmido de manipulación pGEM-T y a partir de esta construcción se subclonó mediante las enzimas de restricción NdeI y BamHI en el vector de expresión pET15b en los mismos sitios de restricción.

Pasos a seguir:

Paso 1. Se precipitó el producto de PCR con la adición de 4 µl de la Solución 5 M de NaCl y 260 µl de la Solución de Etanol absoluto frío a 100 µl de la Solución de la reacción de PCR (ver sección 4.2.2.2.), se mezcló por inversión, y ésta mezcla fue centrifugada a 14.000 x g por 10 min a 4 °C. La pastilla obtenida fue lavada con 500 µl de la Solución de Etanol al 70 %, y se secó a temperatura ambiente protegida de la luz directa y el polvo.

Paso 2. Una vez seca la pastilla fue disuelta en 41,5 µl de agua grado biología molecular, se le adicionó 5 µl de la Solución buffer de reacción de PCR 10X, 2 µl de la Solución 50 mM de MgCl₂, 0,5 µl de la Solución de dATP a 10 mM y 1 µl de la enzima *Taq* DNA polimerasa. Esta mezcla fue incubada en el termociclador por 5 min a 94 °C, posteriormente a 72 °C por 30 min; para la adición de una extensión 3' de Adeninas (A-tailing) al producto de PCR y poder clonarlo en el vector pGEM-T.

Paso 3. Una vez concluido el procedimiento de A-tailing, la reacción se sometió al procedimiento descrito en el **Paso 1**, ajustando previamente el volumen de la solución del producto de PCR con una Solución 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0.

Paso 4. Una vez seca la pastilla fue disuelta en 15 µl de agua grado biología molecular, se tomó 3 µl de la solución del producto de PCR A-tailed, se colocó en tubo Eppendor de 1,5 ml y se le adicionó 5 µl de la Solución buffer de ligación 2X, 1 µl de la Solución del plásmido pGEM-T y 1 µl de la Solución de la enzima T4 DNA ligasa (3 Unidades Weiss/µl). Los reactivos anteriores se mezclaron el vortex por 10 s y el volumen total de la reacción fue colectado con la picofuga, y finalmente la reacción se incubó por 16 h (Toda la noche) en refrigeración (4 °C).

Paso 5. Al siguiente día una vez concluido el periodo de incubación de la reacción de ligación, la mezcla de reacción se usó para transformar la cepa TOP10 de *E. coli* previamente preparada con Ca^{+2} para ser transformada mediante choque térmico.

Paso 6. Para la transformación se tomó un vial con (50 μl) la cepa TOP10 de *E. coli* Ca^{+2} -competente (almacenadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$) y se descongeló en frío, se le adicionó el volumen total (10 μl) de la reacción de ligación, la mezcla se incubó por 30 min en frío, posteriormente se aplicó un choque térmico por 1 min a $42\text{ }^\circ\text{C}$ en el bloque térmico. Para recuperar las bacterias la reacción de transformación se incubó por 2 min en frío, y se le adicionó 45 μl del medio SOC al que previamente se le ajustó la temperatura a $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Paso 7. Para favorecer la recuperación de la cepa bacteriana, a continuación, se dejó en incubación y agitación (200 r.p.m.) a una temperatura de $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 60 min. Una vez concluida el periodo de incubación, se tomaron 250 μl de la suspensión bacteriana y se dispersaron con el asa de Drigalsky en 2 placas de agar LB con 100 $\mu\text{g/ml}$ de Carbenicilina previamente atemperadas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ con la adición y dispersión de 40 μl de la Solución de X-Gal.

Paso 8. Las placas inoculadas con la reacción de transformación se incubaron por 18 h a $37\text{ }^\circ\text{C}$ en estático. Una vez concluido este periodo de incubación las placas fueron revisadas, y se identificó la presencia de colonias blancas y azules. Se seleccionaron 4 colonias blancas, se tomaron con la ayuda de un palillo mondadientes (*toothpick*) estéril y fueron transferidas a un tubo Falcon (15 ml) con 5 ml de caldo LB con 100 μl de Carbenicilina, estos cultivos se incubaron durante toda la noche (16 h) a $37\text{ }^\circ\text{C}$ en agitación constante (200 r.p.m.).

Paso 9. De los cultivos líquidos se obtuvo la biomasa bacteriana mediante centrifugación a $4.500 \times g$ por 15 min a temperatura ambiente. A las muestras de biomasa bacteriana se les extrajo el plásmido con el Kit de purificación de plásmidos (GeneJET Plasmid Miniprep Kit), siguiendo las instrucciones del fabricante. La elusión de los plásmidos se realizó con 50 μl de agua grado biología molecular.

Paso 10. Para verificar la clonación de producto de PCR correspondiente a la secuencia codificante, se realizó un mapa de restricción con el uso de la enzima EcoRI, para lo cual se tomó 8 μl de la solución de los plásmidos de cada una de las clonas y se colocaron en un tubo Eppendorf (0,5 ml), se les adicionó 1 μl de la Solución buffer 10X correspondiente a la enzima y 1 μl de la Solución de la enzima de restricción EcoRI. Finalmente, las mezclas de digestión fueron incubadas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ en estático por 1 h.

Paso 11. Una vez concluida la digestión, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1,2 % teñido con Bromuro de etidio. Las imágenes de los geles fueron fotodocumentadas para su análisis.

Paso 12. De una de los clones positivas a la presencia del producto de PCR se tomó para subclonar la secuencia codificante en el plásmido de expresión pET15b, para lo cual se tomó 8,5 µl de la solución del plásmido (pGEMT-HSPA1A) la clona seleccionada y del pET15b, se colocaron en un tubo Eppendorf (0,5 ml), se les adicionó 1 µl de la Solución buffer 10X correspondiente a la enzima y 0,5 µl de la Solución de la enzima de restricción Ndel. La mezcla de las reacciones de digestión fueron incubadas en las condiciones antes descritas (ver **Paso 10**).

Paso 13. Una vez concluido el tiempo de incubación de la reacción de digestión el material genético fue recuperado siguiendo el procedimiento descrito en el **Paso 1**, para posteriormente disolverlo en 8,5 µl de agua grado biología molecular y realizar la digestión con la enzima de restricción BamHI, siguiendo el procedimiento descrito en el paso anterior (**Paso 12**).

Paso 14. Las muestras de los plásmidos pGEM-T-HSPA1A.1 y pET15b doblemente digeridos (Ndel y BamHI) fueron resueltas mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1,2 % teñido con Bromuro de etidio. Del gel obtenido se recuperaron las porciones del mismo donde se localizaron el inserto (HSPA1A) liberado del pGEM-T-HSPA1A.1 y el vector (pET15b), de ambos fragmentos se recuperó el material genético con el uso el kit de purificación de ADN (GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit) siguiendo las instrucciones del fabricante. El material genético fue precipitado de acuerdo al procedimiento descrito en el **Paso 1**.

Paso 15. Una vez seco el material genético correspondiente a la mezcla del inserto y el vector de expresión éste fue disuelto en 8,5 µl de agua grado biología molecular, y se le adicionó 1 µl de la Solución buffer de ligación 10X y 0,5 µl de la Solución de la enzima ADN ligasa T4. La reacción de ligación se incubó durante toda la noche a 4 °C en estático.

Paso 16. La reacción de ligación se usó para transformar la cepa de *E. coli* TOP10, realizando la selección de las transformantes agar LB con 100 µg/ml de Carbenicilina. Para identificar clones recombinantes se seleccionaron 4 colonias y se aplicó el procedimiento descrito en los Pasos 8, 9, 10 y 11, con el uso de la enzima restricción EcoRV para la realización del mapa de restricción.

4.2.4. Actividad experimental 4: Generación de cepas de expresión recombinantes con el plásmido pET15b-HSPA1A

4.2.4.1 Materiales

4.2.4.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio

- Set de pipetas y sus puntas estériles
- Refrigerador (4 °C)

- Congelador (-20 °C)
- Ultracongelador (-80 °C)
- Mechero de alcohol y recipiente con Alcohol etílico
- Palillos mondadientes estériles y asa de Drigalsky
- Centrífuga
- Microcentrífuga refrigerada
- Vórtex
- Tubos Eppendorf de varios volúmenes
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml
- Bloque de calentamiento
- Cristalería de laboratorio
- Incubadora bacteriológica con agitador
- Balanza analítica
- Autoclave
- Potenciómetro (pHmetro)
- Sonicador (Qsonica, Modelo Q125)
- Cámara de electroforesis vertical
- Platina de calentamiento
- Fotodocumentador (Molecular Imager Gel Doc XR+ Imaging System, Bio-Rad)
- Software de adquisición y análisis de imagen (Image Lab Versión 5.2.1, Bio-Rad)

4.2.4.1.2. Materiales biológicos

- Cepa de expresión bacteriana *E. coli* Rosetta 2 (DE3) (Novagen, Cat. no.: 71400-3)
- Cepa de expresión bacteriana *E. coli* C41 (DE3) pLysS (Sigma Aldrich Aldrich, Cat. no.: CMC0018)
- Construcción genética pET15b-HSPA1A, Clona 1

4.2.4.1.3.1. Reactivos y soluciones para la obtención y procesamiento de la biomasa

- Solución 1 M de IPTG (Thermo Scientific, Cat. no.: R0392)
- Solución 100 mg/ml de Ampicilina (Fisher BioReagents, Cat. no.: BP1760)
- Solución 100 mg/ml de Carbenicilina (Sigma Aldrich, Cat. no.: C1389)
- Caldo de cultivo LB [1% de NaCl, 1% de Triptona peptona y 0,5% de Extracto de levadura] (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014, T7293, Y1625)
- Placas de agar LB [1 % de NaCl, 1 % de Triptona peptona, 0,5 % de Extracto de levadura y 1,5 % de agar microbiológico] (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014, T7293, Y1625, A1296)
- Caldo de cultivo SOC [2 % Triptona peptona, 0.5 % Extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM de Glucosa] (Sigma Aldrich, Cat. no.: T7293, Y1625, S3014, 746436, M2670, M2643, G7021)

- PBS 10X, pH 7,6 [137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ y 1,76 mM KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014, 746436, P0662; Fisher Scientific, S472)
- DTT o Dithiothreitol (Bio-Rad, Cat. no.: 1610610)
- Solución de lisis (PBS 1X, pH 7, 6 con 2 mM de DTT).

4.2.4.1.3.2. Para la resolución de las proteínas mediante SDS-PAGE

- Agua destilada estéril
- Solución resolving buffer 4X [1.500 mM de Tris-HCl, pH 8,8 y 0,4% de SDS] (Sigma, Cat. no.: T4661, 71725; Fisher, Cat. no.: 7647-01-0)
- Solución stacking buffer 4X [1,500 mM de Tris-HCl, pH 6,8 y 0,4 % de SDS] (Sigma, Cat. no.: T4661, 71725; Fisher, Cat. no.: 7647-01-0)

Solución de Acrilamida/Bis-acrilamida 29:1 al 30 % (Bio-Rad, Cat. no.: 161015)

- Solución al 10 % de Persulfato de amonio [0,1 g/ml de Persulfato de amonio] (Sigma, Cat. no.: A3678)

Solución TEMED [N, N, N', N'-tetrametiletano-1,2-diamina] (Bio-Rad, Cat. no.: 161-08.01))

- Solución buffer para SDS-PAGE [25 mM de Tris base; 1 % de SDS; 191 mM de Glicina] (Sigma, Cat no: T4661, 71725; Bio-Rad, No. cat.: 161-0718)
- Solución buffer de muestras SDS-PAGE 2X [125 mM de Tris-HCl, pH 8,8; 4 % de SDS; 5 % de β-Mercaptoetanol; 20 % de Glicerol; 0,0025 % de Azul de bromofenol] (Sigma, Cat. no.: T4661, 71725, 63689, G5516, B8026; Fisher, Cat. no.: 7647-01-0)
- Marcador de peso molecular para proteínas (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Cat. no.: 26616)
- Solución de tinción con Azul brillante de Coomassie [80 mg/l de Azul de brillante de Coomassie G250 y 35 mM de HCl] (Bio-Rad, Cat. no.: 161-0406; Fisher, Cat. no.: 7647-01-0)

4.2.4.2. Procedimiento

Una vez que se verificó la obtención de las construcciones genéticas, estas se emplearon para transformar las cepas de expresión de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) y C41 (DE3).

Paso 1. Para la transformación de las cepas de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) y C41 (DE3) se procedió a realizar los **Pasos 5-7**, descritos en la sección **4.2.3. Actividad experimental 3**, con la excepción de que se emplearon placas de agar LB con 100 µg/ml de Carbenicilina y 1 % de Glucosa).

Paso 2. Posterior a la incubación de las placas, se seleccionaron al azar 4 colonias bacterianas de las placas de cada una de cepas recombinantes y se inocularon en 50 ml de caldo LB con 100 µg/ml de Ampicilina, los matraces inoculados se incubaron por 3 h a 37 °C en agitación constante (200 r.p.m.), transcurridas 3 h, se le adicionó el inductor (IPTG) para

tener una concentración final de 100 μ M. Nuevamente los cultivos se colocaron en la incubadora en las condiciones antes descritas durante toda la noche (14 h).

Paso 3. Concluido el periodo de inducción, la biomasa bacteriana inducida se cosechó por centrifugación a 4.500 x g por 15 min a temperatura ambiente. La pastilla bacteriana obtenida se resuspendió en 1 ml de la Solución de buffer de lisis, pH 7.6.

Paso 4. La biomasa cosechada se lisó por sonicación (2 pulsos de 30 s, a 75 % de intensidad, con un intervalo de descanso de 30 s).

Paso 5. Para la obtención de la fracción soluble e insoluble, el extracto total de la biomasa lisada fue centrifugado a 20.000 x g por 10 min a 4 °C. Una vez concluida la centrifugación el sobrenadante fue retirado cuidadosamente y colocado en un tubo nuevo, y el sedimento fue resuspendido en 1 ml de Solución de buffer de lisis, pH 7.6.

Paso 6. Una alícuota de 50 μ l del extracto total, la fracción soluble (sobrenadante) e insoluble (sedimento) fueron mezcladas con un volumen similar de la Solución buffer de muestras SDS-PAGE 2X, y sometidas a ebullición durante 5 min en baño María.

Paso 7. Las muestras de las fracciones proteicas fueron resueltas mediante SDS-PAGE discontinuo al 12 %, una vez concluida la resolución (Gel concentrador 60 Voltios/Gel concentrador 120 Voltios, para la preparación del gel ver **Nota 1**), el gel fue retirado del molde y colocado en la Solución de tinción de Azul brillante de Coomassie, calentado varias veces la solución en el horno de microondas, evitando que la solución entre en ebullición, hasta hacer evidente la presencia de las bandas de las proteínas resueltas.

Paso 8. Concluida la tinción del gel, se retiró la Solución de tinción de Azul brillante de Coomassie y el gel se lavó con agua destilada 3 veces para retirar los restos del colorante.

Paso 9. El gel teñido de esta manera fue fdocumentado y se analizó la presencia de la expresión de la proteína HSPA1A.

Nota 1. Preparación del gel para SDS-PAGE

Paso 1. Para la resolución de las muestras de proteínas se preparó un gel discontinuo desnaturizante de poliacrilamida al 12 %, para el gel resolutivo (*Resolving*) se colocaron en un recipiente limpio (Tubo Falcon de 50 ml) los siguientes reactivos, previo al armado de las placas con los aditamentos para formar el gel (Gel casting system):

Tabla 4. Mezcla de reactivos para el gel separador.

| Reactivo: | Número de geles (Volumen del reactivo): | |
|---|---|----------------|
| | Un gel (ml) | Dos geles (ml) |
| Agua destilada estéril | 2.625 | 5.250 |
| Solución resolving buffer 4X | 1.875 | 3.750 |
| Solución de Acrilamida/bis-acrilamida (29:1) al 30% | 3.000 | 6.000 |

| | | |
|---|-------|--------|
| Solución al 10% de Persulfato de amonio | 0.025 | 0.050 |
| Solución TEMED | 0.002 | 0.005 |
| Volumen total | 7.027 | 15.055 |

Paso 2. Se mezclaron cuidadosamente los reactivos, evitando en lo posible la formación de espuma y de la misma manera se transfirieron a los moldes de los geles, hasta la marca previamente colocada para definir la longitud del gel. Se adicionó un poco de agua destilada estéril para evitar la evaporación del agua del gel y el ingreso de Oxígeno, y se esperó el tiempo suficiente para permitir la polimerización del gel.

Paso 3. Una vez polimerizado el gel resolutivo se procedió a la preparación del gel concentrador (*Stacking*), para lo cual se adicionaron en un recipiente limpio (Tubo Falcon de 50 ml) los siguientes reactivos:

Tabla 5. Mezcla de reactivos para el gel concentrador.

| Reactivo: | Número de geles (Volumen del reactivo): | |
|---|---|----------------|
| | Un gel (ml) | Dos geles (ml) |
| Agua destilada estéril | 1.445 | 2.890 |
| Solución stacking buffer 4X | 0.625 | 1.250 |
| Solución de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) al 30% | 0.375 | 0.750 |
| Solución al 10% de Persulfato de amonio | 0.050 | 0.100 |
| Solución TEMED | 0.005 | 0.010 |
| Volumen total | 2.500 | 5.000 |

Paso 4. Se mezclaron los reactivos con excepción del TEMED. Se procedió a retirar el agua adicionado al gel resolutivo, se colocaron los peines para formar los pozos en un formato de gel preparativo. Se adicionó al gel concentrador, se mezcló cuidadosamente para evitar la formación de espuma y rápidamente se transfirió a los moldes de los geles. Se adicionó un poco de agua destilada estéril y se esperó el tiempo suficiente para permitir la polimerización del gel.

Paso 5. Una vez preparados los geles, se colocaron en la cámara de electroforesis, se adicionó la Solución buffer de electroforesis SDS-PAGE, y se procedió a cargar las muestras.

4.2.5. Actividad experimental 5: Cultivos de producción

4.2.5.1. Materiales

4.2.5.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio

- Set de pipetas y sus puntas estériles

- Refrigerador (4 °C)
- Congelador (-20 °C)
- Ultracongelador (-80 °C)
- Mechero de alcohol y recipiente con Alcohol etílico
- Palillos mondadientes estériles
- Centrífuga
- Tubos Eppendorf de varios volúmenes
- Tubos Falcon de 50 ml
- Cristalería de laboratorio
- Balanza analítica
- Autoclave
- Incubadora bacteriológica con agitador

4.2.5.1.2. Materiales biológicos

- Cepa de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) recombinante para la expresión de HSPA1A, en placas de agar LB con 100 100 µl/ml de Carbenicilina y 1 % de Glucosa

4.2.5.1.3. Reactivos y soluciones

- Solución 1 M de IPTG (Thermo Scientific, Cat. no.: R0392)
- Solución 100 mg/ml de Ampicilina (Fisher BioReagents, Cat. no.: BP1760)
- Caldo de cultivo LB [1% de NaCl, 1% de Triptona peptona y 0,5% de Extracto de levadura] (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014, T7293, Y1625)
- Placas de agar LB [1 % de NaCl, 1 % de Triptona peptona, 0,5 % de Extracto de levadura y 1,5 % de agar microbiológico] (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014, T7293, Y1625, A1296)

4.2.5.2. Procedimiento

Una vez identificado que la cepa de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) transformada con el plásmido pET15b-HSPA1A fue la que expresó de manera significativa la proteína HSPA1A, se procedió a la realización de los cultivos de producción.

Paso 1. En un matríz (1 l) con 500 ml de Caldo de cultivo LB con 100 µl/ml de Ampicilina se inocularon 4 colonias, siguiendo el procedimiento descrito en el **Paso 2**, del apartado **4.2.4.2.**, para la obtención de un primer Lote en el que el cultivo se realizó a 37 °C.

Paso 2. Siguiendo el procedimiento descrito en el **Paso 2**, del apartado **4.2.4.2.** se obtuvo el Lote 2, con la excepción de que la temperatura empleada para el cultivo fue de 30 °C.

Paso 3. Una vez concluido el cultivo de cada lote se procedió a la colecta de la biomasa inducida mediante centrifugación (En tubos Falcon de 50 ml, previamente pesados e identificados) a 4.500 x g, por 15 min a temperatura ambiente.

Paso 4. Una vez colectada la totalidad de la biomasa, se volvió a pesar los tubos para estimar la cantidad de biomasa (Peso húmedo) obtenida por litro de cultivo.

Paso 5. La biomasa colectada de ambos lotes se almacenó en congelación (-80 °C) hasta su procesamiento para obtener la fracción soluble.

4.2.6. Actividad experimental 6: Fraccionamiento de la biomasa inducida

4.2.6.1. Materiales

4.2.6.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio

- Cristalería de laboratorio
- Balanza analítica
- Potenciómetro (pHmetro)
- Set de micropipetas de varios volúmenes y sus puntas estériles
- Platina de agitación y balas magnéticas
- Incubadora bacteriológica con agitador
- Sonicador (Qsonica, Modelo Q125)
- Vortex
- Microcentrífuga refrigerada
- Refrigerador (4 °C)
- Ultracongelador (-80 °C)

4.2.6.1.2. Materiales biológicos

- Biomasa bacteriana inducida de ambos lotes, almacenada en congelación a -80 °C

4.2.6.1.3. Reactivos y soluciones

- PBS 10X, pH 7,6 [137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ y 1,76 mM KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014, 746436, P0662; Fisher Scientific, S472)
- DTT o Dithiothreitol (Bio-Rad, Cat. no.: 1610610)
- Solución de lisis (PBS 1X, pH 7,6 con 2 mM de DTT)
- Tritón X-100 (Acros organics, Cat. no.: 21568-2500)

4.2.6.2. Procedimiento

Paso 1. Para iniciar el procesamiento de la biomasa bacteriana de ambos lotes fue descongelada y se le agregó la Solución buffer de lisis en proporción (3 ml/gramo de biomasa) a la cantidad de biomasa, inmediatamente se mezcló en el vortex para homogenizar la suspensión bacteriana.

Paso 2. A la suspensión bacteriana se le añadió Tritón X100 para tener una concentración final de 1 % (10 µl/ml de la suspensión bacteriana), nuevamente se mezcló en vortex y se procedió al procesamiento de la biomasa en el sonicador.

Paso 3. En el sonicador cada uno de los lotes fueron sometidos para su lisis a 10 pulsos de 30 s, a 75 % de intensidad, con intervalos de descanso de 30 s en frío (4 °C).

Paso 4. Finalmente, el extracto proteico fue centrifugado a 20.000 x g por 10 min a una temperatura de 4 °C, las fracciones solubles o sobrenadantes fueron colectadas y se almacenaron a 4 °C hasta ser empleadas en la purificación por IMAC.

4.2.7. Actividad experimental 7: Purificación por IMAC

4.2.7.1. Materiales

4.2.7.1.1. Materiales físicos y de laboratorio

- Cristalería de laboratorio
- Balanza analítica
- Potenciómetro (pHmetro)
- Set de micropipetas de varios volúmenes y sus puntas estériles
- Platina de agitación y balas magnéticas
- Vortex
- Refrigerador (4 °C)
- Columna plástica (Thermo Scientific, Cat. no.: 89898)
- Soporte universal
- Gradillas y tubos de vidrio
- Refrigerador (4 °C)

4.2.7.1.2. Materiales biológicos

- Fracción proteica soluble de la biomasa inducida de ambos lotes

4.2.7.1.3. Reactivos y soluciones

- H₂O destilada
- Resina HisPur Ni-NTA Superflow Agarose (Thermo Scientific, Cat. no.: 25215)
- PBS 10X, pH 7,6 [137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ y 1,76 mM KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014, 746436, P0662; Fisher Scientific, S472)
- DTT o Dithiothreitol (Bio-Rad, Cat. no.: 1610610)
- Solución 1 M de Imidazol (Acros organics, Cat. no.: 12292-1000)
- Solución buffer de lisis (PBS 1X, pH 7,6 con 2 mM de DTT)
- Solución buffer de lavado (PBS 1X, pH 7,6 con un total de 500 mM de NaCl, 5 mM de Imidazol y 2 mM de DTT)
- Solución buffer de elusión (PBS 1X, pH 7,6 con 500 mM de Imidazol y 2 mM de DTT)

4.2.7.2. Procedimiento

Una vez obtenida la fracción soluble de la biomasa inducida de la cepa de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) para la producción de la proteína HSPA1A, se procedió a la realización de la purificación de dicha proteína por IMAC de ambos lotes.

Paso 1. Una vez preparadas las soluciones necesarias para el proceso de purificación por IMAC, se procedió a la preparación de la columna con 4 ml de la resina (HisPur Ni-NTA Superflow Agarose).

Paso 2. La resina se lavó 2 veces con 4 volúmenes de agua destilada (8 ml), y se procedió al equilibrio de la resina con la adición (2 veces) de 2 volúmenes (4 ml) de la Solución buffer de lisis.

Paso 3. Con la resina equilibrada se continuó con la adición de 2 volúmenes (4 ml) de la fracción proteica soluble de la biomasa inducida. El efluente (No pegado) de la columna fue colectado en un tubo de vidrio, el cual se mantuvo en frío (4 °C).

Paso 4. Se procedió a la realización de los lavados (5 en total) de la resina con 4 volúmenes (8 ml) de la Solución buffer de lavado, cada fracción de lavado fue colectada por separado (Lavado 1, 2, 3, 4 y 5).

Paso 5. Continuando con el proceso de purificación, para eluir la proteína se le adicionó a la resina 1 volumen (2ml) de la Solución buffer de elusión, éste paso se repitió una vez más (Para volumen total de elusión 4 ml).

Paso 6. Para finalizar el proceso, se realizó un lavado final de la resina, agregando 4 volúmenes de agua destilada (8 ml) y de la misma manera se colectó esta fracción.

Paso 7. Una vez concluido el proceso, la resina se almacenó a 4 °C en agua destilada, y en las mismas condiciones fueron almacenadas las fracciones colectadas de la IMAC hasta verificar la purificación de la proteína HSPA1A mediante SDS-PAGE.

4.2.8. Actividad experimental 8: Verificación de la purificación

4.2.8.1. Materiales

4.2.8.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio

- Set de pipetas y sus puntas estériles
- Refrigerador (4 °C)
- Vórtex
- Tubos Eppendorf de varios volúmenes
- Platina de calentamiento
- Tubos Falcon de 15 ml
- Cristalería de laboratorio
- Balanza analítica
- Potenciómetro (pHmetro)

- Cámara de electroforesis vertical
- Fotodocumentador (Molecular Imager Gel Doc XR+ Imaging System, Bio-Rad)
- Software de adquisición y análisis de imagen (Image Lab Versión 5.2.1, Bio-Rad)

4.2.8.1.2. Materiales biológicos

- Fracciones obtenidas de la IMAC de ambos lotes

4.2.8.1.3. Reactivos y soluciones

- Agua destilada estéril
- Solución resolving buffer 4X [1.500 mM de Tris-HCl, pH 8,8 y 0,4% de SDS] (Sigma, Cat. no.: T4661, 71725; Fisher, Cat. no.: 7647-01-0)
- Solución stacking buffer 4X [1,500 mM de Tris-HCl, pH 6,8 y 0,4 % de SDS] (Sigma, Cat. no.: T4661, 71725; Fisher, Cat. no.: 7647-01-0)

Solución de Acrilamida/Bis-acrilamida 29:1 al 30 % (Bio-Rad, Cat. no.: 161015)

- Solución al 10 % de Persulfato de amonio [0,1 g/ml de Persulfato de amonio] (Sigma, Cat. no.: A3678)

Solución TEMED [N, N, N', N'-tetrametiletano-1,2-diamina] (Bio-Rad, Cat. no.: 161-08.01))

- Solución buffer para SDS-PAGE [25 mM de Tris base; 1 % de SDS; 191 mM de Glicina] (Sigma, Cat no: T4661, 71725; Bio-Rad, No. cat.: 161-0718)
- Solución buffer de muestras SDS-PAGE 2X [125 mM de Tris-HCl, pH 8,8; 4 % de SDS; 5 % de β -Mercaptoetanol; 20 % de Glicerol; 0,0025 % de Azul de bromofenol] (Sigma, Cat. no.: T4661, 71725, 63689, G5516, B8026; Fisher, Cat. no.: 7647-01-0)
- Marcador de peso molecular para proteínas (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Cat. no.: 26616)
- Solución de tinción con Azul brillante de Coomassie [80 mg/l de Azul de brillante de Coomassie G250 y 35 mM de HCl] (Bio-Rad, Cat. no.: 161-0406; Fisher, Cat. no.: 7647-01-0)

4.2.8.2. Procedimiento

Para verificar que el proceso de purificación por IMAC, las fracciones obtenidas fueron resueltas mediante SDS-PAGE siguiendo los pasos (**Paso 6 a 9**) descritos en la sección **4.2.4.2.**, y una vez identificada la elusión de la proteína HSPA1A se procedió a la diálisis las fracciones de ambos lotes.

4.2.9. *Actividad experimental 9:* Diálisis, cuantificado y almacenado

4.2.9.1. Materiales

4.2.9.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio

- Set de pipetas y sus puntas estériles

- Balanza analítica
- Potenciómetro (pHmetro)
- Refrigerador (4 °C)
- Vórtex
- Tubos Eppendorf de varios volúmenes
- Tubos Falcon de 15 ml
- Cristalería de laboratorio
- Membrana SnakeSkin® Dialysis Tubing-7,000 MWCO (Molecular Weight CutOff)
- Tijeras, Clamps plásticos y Hilo grueso
- Recipientes de plástico
- Platina de agitación y balas magnéticas
- Cámara de electroforesis vertical
- Platina de calentamiento
- Fotodocumentador (Molecular Imager Gel Doc XR+ Imaging System, Bio-Rad)
- Software de adquisición y análisis de imagen (Image Lab 5.2.1, Bio-Rad)
- Jeringas (10 ml) y filtros (Ø de 0,22 µm) (Nest Scientific USA Inc., Cat. no.: 380111)

4.2.9.1.2. Materiales biológicos

- Fracciones eluidas de ambos lotes de las fracciones solubles.
- Proteína sérica bovina (BSA) fracción V, previamente cuantificada

4.2.9.1.3. Reactivos y soluciones

- PBS 10X, pH 7,4 [137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ y 1,76 mM KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014, 746436, P0662; Fisher Scientific, S472)
- Solución de diálisis (PBS 1X, pH 7,4)
- Agua destilada

4.2.9.2. Procedimiento

Las fracciones con la proteína recombinante HSPA1A purificada se procedieron a dializar para colocar a la proteína en una Solución buffer (PBS 1X, pH 7.4) compatible para su posterior uso en ensayos biológicos, una vez preparada fue cuantificada mediante análisis densitométrico de la proteína resuelta mediante SDS-PAGE para tener una estimación de la concentración y los rendimientos volumétricos.

Paso 1. Con la solución de diálisis ya preparada (2.000 ml de PBS 1X, pH 7,4) se procedió a la hidratación y lavado de la membrana de diálisis con agua destilada.

Paso 2. A continuación, se selló un extremo de la membrana con un *clamp* plástico y se procedió a la fracción proteica obtenida del paso de elusión, en donde previamente se había identificado la presencia de la proteína HSPA1A. Se selló el otro extremo de la membrana

de diálisis con otro clamp, y se aseguró ambos extremos con ayuda de una porción de hilo. El mismo procedimiento fue aplicado para la fracción eluida del Lote 2.

Paso 3. Las fracciones proteicas de ambos lotes colocadas en las membranas de diálisis se transfirieron al recipiente con los 2 l de la Solución de diálisis, manteniendo en constante movimiento la solución con ayuda de la platina de agitación y una bala magnética. Después de aproximadamente un intervalo de 8 a 10 h se realizan 2 cambios de la Solución de diálisis con el objetivo de reducir al mínimo la concentración de Imidazol, DTT y ajustar el pH.

Paso 4. Una vez concluido el dializado de los lotes de la proteína HSPA1A, se retiraron las fracciones proteicas de las membranas de diálisis y se colocaron en tubos Falcon de 15 ml.

Paso 5. Para iniciar el proceso de cuantificación, las fracciones dializadas fueron resueltas mediante SDS-PAGE siguiendo los pasos (**Paso 6 a 9**) descritos en la sección **4.2.4.2.**, junto a las muestras de la curva de calibración de BSA (50, 100, 200, 300 y 400 µg/ml).

Paso 6. Con la imagen del gel se procedió al procesamiento y análisis para estimar la concentración de la proteína HSPA1A de ambos lotes siguiendo las instrucciones del software de adquisición y análisis de imágenes (Image Lab 5.2.1, Bio-Rad). Los valores de concentración y los volúmenes de las fracciones dializadas de la HSPA1A de ambos lotes se estimó el rendimiento volumétrico.

Paso 7. Ambos lotes de la proteína HSPA1A obtenidos se mantuvieron almacenados en refrigeración después de ser esterilizados por filtración.

5. Resultados y discusión

5.1. Amplificación y clonación de las secuencias codificantes de las proteínas HSPA1A y HSPA2

De acuerdo al diseño realizado, la secuencia codificante de HSPA1A una vez amplificada se clonaría en el vector pGEM-T y se subclonaría en el pET15b con las enzimas NdeI y BamHI, para el caso de la HSPA2, el producto de PCR se clonaría directamente en el pET15b una vez digerido el inserto con la enzima NdeI y el vector de expresión con BamHI, modificando los extremos con una enzima de alta fidelidad (*Pfx* ADN polimerasa) para hacerlos romos y posteriormente digerir el plásmido con la enzima NdeI.

Una vez disponibles los oligonucleótidos diseñados, se usó material genético bovino (*Bos taurus*) del biobanco del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca (**Tabla 1**), para la realización de los ensayos de PCR's para amplificar los marcos abiertos de lectura (ORF) o secuencias codificantes siguiendo los perfiles de temperatura de amplificación descritos en las **Tabla 2** y **3**. Una vez resueltas las reacciones de amplificación en las que para ambas secuencias codificantes se evaluaron diferentes temperaturas de hibridación, se obtuvo como resultado un producto de PCR con un tamaño de 1.937 bp para la proteína HSPA1A, mientras que para la proteína HSPA2 no hubo resultados favorables en su amplificación (Ver **Figura 3**).

Para el caso de la secuencia de la proteína HSPA2 se realizaron ensayos adicionales de PCR con modificaciones en la temperatura de hibridación e incrementos de las concentraciones de la solución Enhancer (2X y 3X). Sin embargo, a pesar de los cambios realizados se obtuvieron resultados similares al observado en la **Figura 3B**, no se logró obtener un amplicón del tamaño esperado (1.900 bp). Se considera que tres parámetros que pueden explicar la imposibilidad de amplificar el ORF de la HSPA2, una temperatura alta de hibridación de los primers que poseen un porcentaje alto de Guanina/Citosina en su composición, por otro lado, un amplicón de una longitud relativamente grande (1,9 kbp) lo que reduce la eficiencia de amplificación, o como en este caso la hace inviable. Finalmente, el primer sentido (HSPA2-For) contiene una secuencia adicional que lo modifica para colocar en el extremo 5' el sitio de restricción para la enzima NdeI, situación que puede causar inconvenientes durante el proceso de amplificación de la secuencia.

Con los resultados hasta aquí obtenidos, el proceso de clonación y subclonación se realizó únicamente con la secuencia codificante de la proteína HSPA1A.

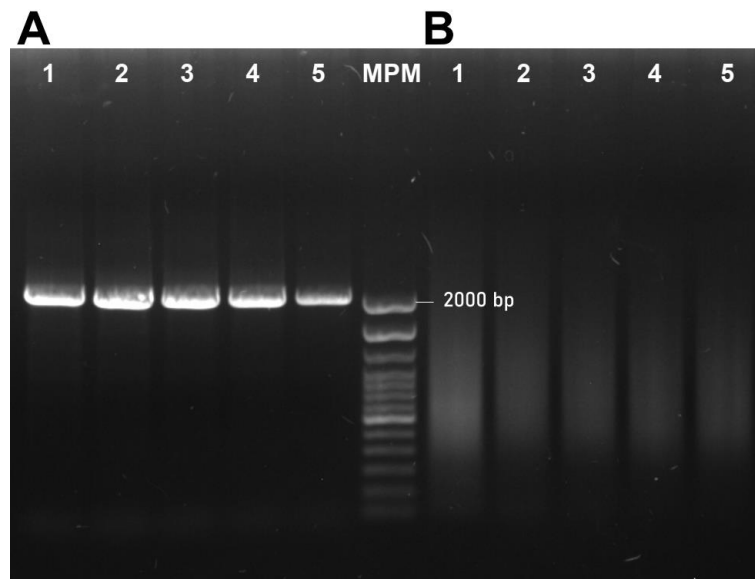


Figura 3. Electroforesis de las reacciones de amplificación de las secuencias codificantes de HSPA1A y HSPA2. **A).** Productos de PCR de la secuencia codificante de la proteína HSPA1A con un peso similar al esperado (1.937 pb). Carriles 1, 2, 3, 4 y 5, reacciones de PCR con diferentes TM's; Carril MPM, marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Invitrogen, Cat. no.: 10488058) y **B)** Reacciones de PCR de la secuencia codificante de HSPA2 (Carriles 1, 2, 3, 4, y 5, reacciones con diferentes TM's), resueltas en gel de agarosa-TAE al 1.2 % teñido con Bromuro de etidio en las que no se observa el amplicón con el tamaño esperado de 1.900 bp.

El producto de PCR de la secuencia codificante de la HSPA1A obtenido se clonó siguiendo las instrucciones del fabricante en el plásmido de manipulación pGEM-T posterior a ser modificado (A-tailing). De las cuatro clonas seleccionadas, se logró evidenciar en las transformantes 1 y 2 mediante un mapa de restricción con enzima EcoRI la clonación del producto de PCR (Ver **Figura 4**). De las transformantes se seleccionó la clona 1, de la cual se movilizó al plásmido de expresión pET15b el inserto correspondiente a la secuencia codificante de la HSPA1A con las enzimas de restricción NdeI y BamHI.

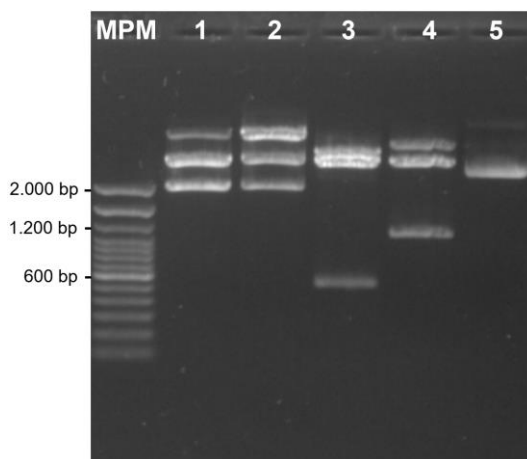


Figura 4. Electroforesis de las reacciones de digestión de los plásmidos de las clonas seleccionadas de las transformantes obtenidas con las reacciones de ligación del pGEM-T con el producto de PCR de la HSPA1A. Carril MPM, marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Invitrogen, Cat. no.: 10488058); Carriles 1, 2, 3 y 4, reacciones digestión de los plásmidos con enzima EcoRI (Carriles 1 y 2, clonas positivas a la presencia del inserto; 3 y 4, negativas) y Carril 5, muestra de plásmido (Clona 1) sin digerir, resueltas en gel de agarosa-TAE al 1.2 % teñido con Bromuro de etidio.

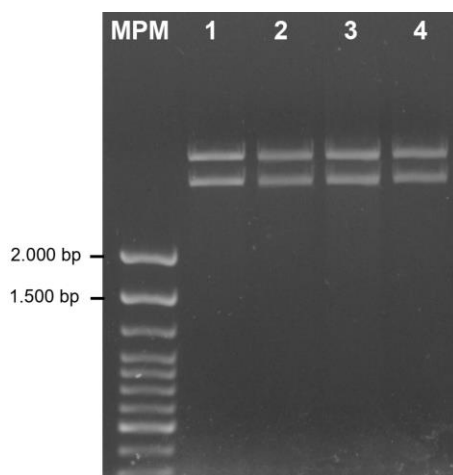


Figura 5. Electroforesis de las reacciones de digestión de los plásmidos de las clonas seleccionadas de las transformantes obtenidas con las reacciones de ligación del pET15b con la secuencia codificante de la HSPA1A. Carril MPM, marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Invitrogen, Cat. no.: 10488058); Carriles 1, 2, 3 y 4, reacciones digestión de los plásmidos con enzima EcoRV (Todas las clonas positivas), resueltas en gel de agarosa-TAE al 1.2 % teñido con Bromuro de etidio.

De las transformantes obtenidas con la reacción de ligación del inserto liberado con las enzimas de restricción NdeI-BamHI de la Clona 1 (pGEM-T-HSPA1A) y vector de expresión pET15b también digerido con ambas enzimas se seleccionaron 4 clonas, y a las muestras

de plásmidos se les realizó un mapa de restricción con la enzimas EcoRV, como se observa en la Figura 5, las cuatro clonas seleccionadas fueron positivas a la presencia del inserto, correspondiente a la secuencia codificante de la HSPA1A.

5.2. Generación y evaluación de las cepas de *E. coli* C41 (DE3) y Rosetta 2 (DE3) recombinantes para la producción de la proteína HSPA1A

Con la muestra de plásmido de la Clona 1 del pET15b-HSPA1A, se transformó mediante choque térmico las cepas de expresión C41 (DE3) y Rosetta 2 (DE3). De las transformantes obtenidas con ambas cepas se seleccionó una colonia la cual se cultivó en 50 ml de medio LB con 100 µg/ml de Carbenicilina para evaluar la expresión de la proteína HSPA1A posterior a la adición del inductor IPTG. Como se observa en la **Figura 6**, la presencia de una cantidad importante de la proteína es identificable en las fracciones proteicas de la cepa Rosetta 2 (DE3), tanto en la insoluble como la soluble.

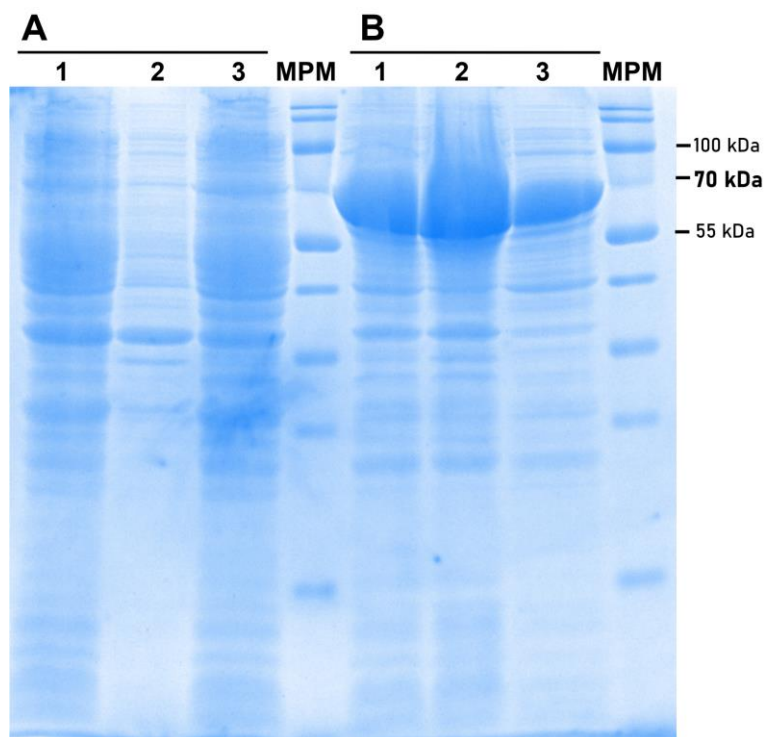


Figura 6. SDS-PAGE de las fracciones proteicas de las cepas de *E. coli* C41 (DE3) y Rosetta 2 (DE3) transformadas con el plásmido pET15b-HSPA1A e inducidas. **A).** Fracciones proteicas de la cepa C41 (DE3); Carril 1, fracción total; Carril 2: fracción insoluble y Carril 3, fracción soluble. Carriles MPM, marcador de peso molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Cat. no.: 26616). **B).** Fracciones proteicas de la cepa Rosetta 2 (DE3); Carril 1, fracción total; Carril 2: fracción insoluble y Carril 3, fracción soluble.

5.3. Producción de la proteína HSPA1A

Una vez identificado que la cepa bacteriana Rosetta 2 (DE3) fue la que produjo en mayor cantidad la proteína HSPA1A, se realizaron con ella los cultivos de producción, para los cuales se prepararon 2 lotes, en los que los cultivos se incubaron a dos temperaturas diferentes, el Lote 1 se incubó a 37 y el 2 a 30 °C.

Una vez concluida la colecta de la biomasa bacteriana inducida de ambos lotes, se estimó la cantidad (Peso húmedo) obtenida, siendo mayor (4,20 g/l) la del cultivo incubado a 37 °C (Lote 1) con respecto (3,14 g/l) a la que logró cosecharse del cultivo incubado a 30 (Lote 2). La biomasa colectada de ambos lotes fue fraccionada mediante sonicación y centrifugación (Ver **Figura 7**), las fracciones solubles fueron sometidos a purificación IMAC de manera manual.

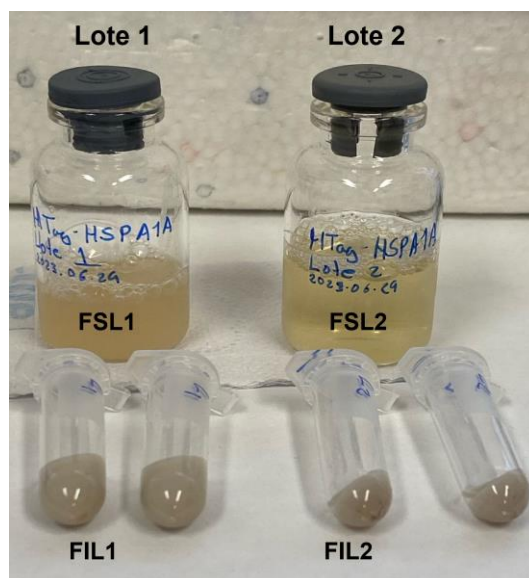


Figura 7. Material obtenido del fraccionamiento de la biomasa bacteriana inducida en los cultivos de Rosetta 2 (DE3) recombinante incubados a 37 y 30 °C. Lote 1: FSL1, fracción soluble y FIL1, fracción insoluble. Lote 2: FSL2, fracción soluble y FIL2, fracción insoluble.

Las fracciones obtenidas de la purificación IMAC fueron resueltas mediante SDS-PAGE para verificar el proceso e identificar la fracción colectada con la proteína recombinante HSPA1A purificada (**Figura 8**). Se pudo observar que la proteína recombinante se obtuvo en la fracción correspondiente a la elusión como se esperaba, con menor presencia de proteínas contaminantes en el Lote 1 (**Figura 8A**, Carril 7) en comparación con la fracción obtenida del proceso de purificación de la fracción soluble de la biomasa del Lote 2 (**Figura 8A**, Carril 7).

Las fracciones eluidas de ambos lotes se dializaron (7.000 Da de MWCO) en Solución PBS 1X, pH 7.4; con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de Imidazol y DTT para tener una composición de la solución donde se encuentra la proteína compatible con el uso que se le dará.

Finalmente, a los lotes de proteína recombinante HSPA1A pura les fue estimada la cantidad de proteína obtenida mediante cuantificación por densitometría, empleándose como referencia una curva de concentración de BSA fracción V y el uso del software Image Lab versión 5.2.1 (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como resultado final, se logró obtener un rendimiento de aproximado de 112 mg/l de proteína pura en el Lote 1 y para el caso del Lote 2 el rendimiento volumétrico fue 18,67 veces menor (6 mg/l).

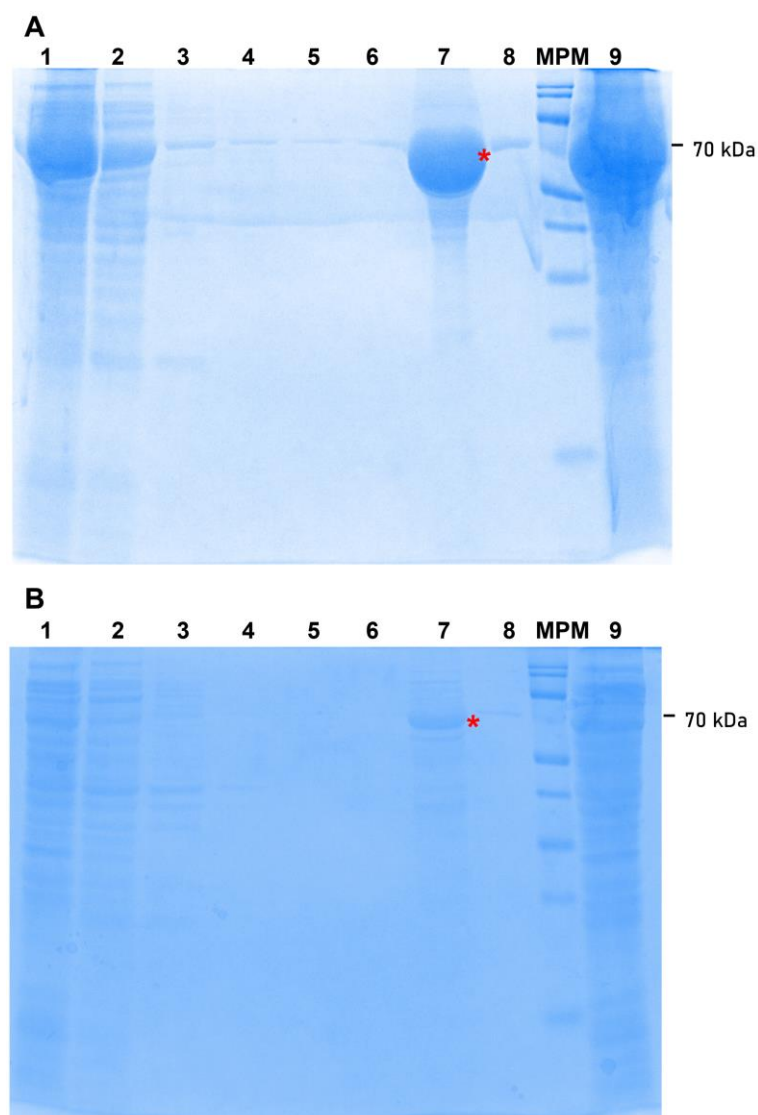


Figura 8. SDS-PAGE de las fracciones proteicas obtenidas la purificación IMAC de los Lotes 1 y 2 de los cultivos de producción de la HSPA1A. **A).** Fracciones proteicas de la purificación del Lote 1; Carril 1, fracción no

pegada; Carril 2, 3, 4, 5 y 6, fracciones colectadas de los lavados 1, 2, 3, 4, y 5; Carril 7, fracción eluida; Carril 8, fracción del lavado de la resina; Carril MPM, marcador de peso molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Cat. no.: 26616). y Carril 9, fracción soluble sometida a purificación. **B**). Fracciones proteicas de la purificación del Lote 2; Carril 1, fracción no pegada; Carril 2, 3, 4, 5 y 6, fracciones colectadas de los lavados 1, 2, 3, 4, y 5; Carril 7, fracción eluida; Carril 8, fracción del lavado de la resina; Carril MPM, marcador de peso molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Cat. no.: 26616). y Carril 9, fracción soluble sometida a purificación. * Proteína HSPA1A.

Con los resultados descrito se evidencia que fue posible obtener en un modelo bacteriano de expresión una cantidad importante de la proteína recombinante HSPA1A de origen bovino, siguiendo de manera general a lo descrito por Pawar y colaboradores (1), sin embargo, con el diseño propuesto no fue posible la amplificación de la secuencia codificante de la HSPA2 y por tanto la producción de dicha proteína (**Anexo 9**).

Por otro lado, con respecto a la condiciones de la producción de la HSPA1A, existen estudios como el de Brijaldo (71), en el que se reporta la obtención de las proteínas recombinantes del plasma seminal bovino, como Espermadhesinas (SFP) y Osteopontina (OPN) con cultivos a diferentes temperaturas: 20, 30 y 37 °C; donde se observó que temperaturas de 20 y 30 °C no favorecen la producción de éstas proteínas, siendo así que las condiciones más favorables para una mayor expresión de dichas proteínas recombinantes fue la temperatura de 37 °C. Dato similar a lo encontrado en el presente trabajo, en el que la producción de la proteína HSPA1A con la cepa bacteriana Rosetta 2 (DE3) cultivada a una temperatura de 37 mostró un rendimiento 18,67 veces mayor al obtenido cuando la cepa recombinante se cultivó a 30 °C.

Finalmente, de manera similar a lo descrito por Schütz y colaboradores (72), el costo de producción de proteínas recombinantes en *E. coli* por litro de cultivo oscila alrededor de los \$ 60,00 USD, un valor similar a lo estimado en el presente trabajo. Por tanto, la inversión por mg de proteína pura obtenido el presente trabajo (Lote 1) es de alrededor de \$ 0,54 USD, con contraste con el valor comercial de la misma proteína ofertada a nivel internacional (Sigma Aldrich Aldrich, Cat. no.: H8285-50UG, \$ 453,25 USD por 50 µg lo que equivale a \$ 9.065,00 USD por mg. Dato revisado el 27 de noviembre de 2023). Más allá del costo del producto, un aspecto importante para el que el presente trabajo aporta, es la disponibilidad de un insumo para el desarrollo de futuras investigaciones relacionadas con las herramientas biotecnológicas aplicables a la reproducción animal.

Conclusiones

En los ensayos de amplificación de las secuencias codificantes de las proteínas HSPA1A y HSPA2 únicamente se logró la amplificación de la secuencia de HSPA1A, la cual se clonó en el plásmido pGEM-T-HSPA1A y posteriormente se subclonó en el vector de expresión pET15b, con las construcciones genéticas del plásmido de expresión se transformaron las cepas bacterianas de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) y C41 (DE3). Al evaluar la expresión de la proteína recombinante HSPA1A, se observó una importante cantidad de la proteína en los extractos de la biomasa de la cepa Rosetta 2 (DE3), por lo que con esta cepa se realizaron cultivos de producción a 2 temperaturas diferentes (30 y 37 °C).

De la biomasa fraccionada de los cultivos de producción se logró obtener la proteína HSPA1A mediante la purificación por IMAC, con mayor rendimiento en el cultivo realizado a 37 °C (± 112 mg/l) en contraste con el incubado a 30 °C, del cual adicionalmente, se obtuvo la proteína con presencia de una mayor cantidad de proteínas contaminantes.

Recomendaciones

De acuerdo a la experiencia obtenida durante el desarrollo del trabajo de investigación y al no obtener resultados favorables a pesar de las modificaciones realizadas en la concentración de la solución Enhancer y temperatura de hibridación en la amplificación de la proteína HSPA2, se sugiere que se rediseñen los oligonucleótidos o primers, debido a que la secuencia codificante de la proteína es de gran tamaño; por lo que podría amplificarse en dos segmentos, es decir, el extremo amino (N) y el extremo carboxilo (C) para posteriormente realizar un PCR-overlapping para unir ambos segmentos y generar la secuencia completa.

Por otro lado, en cuanto a la producción de la proteína HSPA1A en las cepas bacterianas Rosetta 2 (DE3) y C41 (DE3), se pudo evidenciar notablemente una producción mayor en la cepa Rosetta 2 (DE3), sin embargo, esto no quiere decir que no se haya producido la proteína HSPA1A en la cepa C41 (DE3), para contrastar esta hipótesis se recomienda realizar un Western blot para detectar de forma específica la proteína con el uso de anticuerpos anti-Histidinas y así conocer con exactitud si esta cepa C41 (DE3) produjo la proteína.

Finalmente, es importante optimizar la producción y purificación de la proteína HSPA1A en la cepa Rosetta 2 (DE3), lo cual permitirá tener datos fundamentados con respecto a los rendimientos volumétricos y costos de producción, adicionalmente evaluar protocolos de preservación de la proteína, como la liofilización para favorecer su conservación durante periodos de tiempo mayores y menor riesgo de pérdida de la proteína.

Referencias

- 1 Pawar HN, Agrawal RK, Ramneek , Brah GS. Expression, purification and characterization of recombinant Heat Shock Protein 70 (HSP70) from sheep and goat species. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2013; 2(11): 440-452
- 2 Bañuelos Valenzuela R, Sánchez Rodríguez SH. La proteína de estrés calórico Hsp70 funciona como un indicador de adaptación de los bovinos a las zonas áridas. *REDVET*. 2005; VI(3): 1-18
- 3 Chen B, Feder ME, Kang L. Evolution of heat-shock protein expression underlying adaptive responses to environmental stress. *Molecular Ecology*. 2018; 27:3040-3054. DOI: 10.1111/mec.14769.
- 4 Rosyada Z, Ulum M, Tumbelaka L, Solihin D, Purwantara B, Memili E. Implications of sperm heat shock protein 70-2 in bull fertility. *Vet World*. 2022; 15(6):1456-1466. DOI: 10.14202/vetworld.2022.1456-1466.
- 5 Tripathy K, Sodhi M, Kataria RS, Chopra M, Mukesh M. In silico analysis of HSP70 gene family in bovine genome. *Biochem Genet*. 2021; 59(1):134-158. DOI: 10.1007/s10528-020-09994-7.
- 6 Liu P, Yu S, Cui Y, He J, Zhang Q, Lui J, et al. Regulation by HSP70/90 in the different tissues and testis development of male cattle (Cattle-yak and Yak). *Preprint in bioRxiv*. 2018 agosto 16. DOI: 10.1101/393371.
- 7 Jiménez Rosales A. Los retos actuales en la ingeniería de proteínas. *CIENCIA ergo-sum*. 2019; 26(3):1-11. DOI: 10.30878/ces.v26n3a9.
- 8 Quesada D, Gómez G. ¿Proteínas de origen vegetal o de origen animal?: Una mirada a su impacto sobre la salud y el medio ambiente. *Rev Nutr Clin Metab*. 2019; 2(1):79-86. DOI: 10.35454/rncm.v2n1.063.
- 9 Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL. Lehninger principles of biochemistry 5th Ed. 2008. W.H. Freeman. Palgrave Macmillan U.K.
- 10 Allouche D, André I, Barbe S, Davies J, de Givry S, Katsirelos G, et al. Computational protein desing as an optimization problem. *Artificial Intelligence*. 2014; 212:59-79. DOI: 10.1016/j.artint.2014.03.005.
- 11 Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11(8):545-555. DOI: 10.1038/nrm2938.
- 12 Bose D, Chakrabarti A. Substrate specificity in the context of molecular chaperones. *IUBMB Life*. 2017; 69(9):647-659. DOI: 10.1002/iub.1656.

- 13 Buchner J. Molecular chaperones and protein quality control: an introduction to the JBC Reviews thematic series. *J Biol Chem.* 2019; 294(6):2074-2075. DOI: 10.1074/jbc.REV118.006739.
- 14 Clerico EM, Meng W, Pozhidaeva A, Bhasne K, Petridis C, Gierasch M. Hsp70 molecular chaperones: Multifunctional allosteric holding and unfolding machines. *Biochem J.* 2019; 476(11):1653-1677. DOI: 10.1042/BCJ20170380.
- 15 Hiller S, Burmann BM. Chaperone–client complexes: A dynamic liaison. *J Magn Reson.* 2018; 289:142-155. DOI: 10.1016/j.jmr.2017.12.008.
- 16 Nava Ramírez T, Hansberg W. Características comunes de las chaperonas pequeñas y diméricas. *TIP.* 2020; 23(e20200234):1-13. DOI: 10.22201/fesz.23958723e.2020.0.234.
- 17 Rai Sable A, Agarwal K. Plant heat shock protein families: Essential machinery for development and defense. *J Biol Sci Med.* 2018; 4(1): 51-64.
- 18 Hu C, Yang J, Qi Z, Wu H, Wang B, Zou F, et al. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm.* 2022; 3(3):e161. DOI: 10.1002/mco2.161.
- 19 Hipp MS, Kasturi P, Hartl FU. The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 julio; 20(7):421-435. DOI: 10.1038/s41580-019-0101-y.
- 20 Macošek J, Mas G, Hiller S. Redefining molecular chaperones as chaotropes. *Front Mol Biosci.* 2021; 8:683132. DOI: 10.3389/fmolb.2021.683132.
- 21 Bechtluft P, Nouwen , Tans SJ, Driessen AJM. SecB--a chaperone dedicated to protein translocation. *Mol Biosyst.* 2010; 6(4):620-627. DOI: 10.1039/b915435c.
- 22 Sousa R. Structural mechanisms of chaperone mediated protein disaggregation. *Front Mol Biosci.* 2014; 1:12. DOI: 10.3389/fmolb.2014.00012.
- 23 Rosenzweig R, Nillegoba NB, Mayer MP, Bukau B. The Hsp70 chaperone network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 noviembre; 20(11):665-680. DOI: 10.1038/s41580-019-0133-3.
- 24 Haslbeck M, Weinkauf S, Buchner J. Small heat shock proteins: Simplicity meets complexity. *J Biol Chem.* 2019; 294(6):2121-2132. DOI: 10.1074/jbc.REV118.002809.
- 25 Hall D. On the nature of the optimal form of the holdase-type chaperone stress response. *FEBS Lett.* 2020; 594(1):43-66. DOI: 10.1002/1873-3468.13580.
- 26 Abdelnour SA, Abd El-Hack ME, Khafaga AF, Arif M, Taha AE, Noreldin AE. Stress biomarkers and proteomics alteration to thermal stress in ruminants: A review. *J Therm Biol.* 2019; 79:120-134. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2018.12.01.
- 27 Hoter A, Amiri M, Prince A, Amer H, Warda M, Naim HY. Differential glycosylation and modulation of camel and human HSP isoforms in response to thermal and hypoxic stresses. *Int J Mol Sci.* 2018 ; 19(2):402. DOI: 10.3390/ijms19020402.

- 28** Guerrero Fonseca CAR, Guerrero Rojas R. Mecanismos moleculares de las proteínas de choque térmico (HSPs) implicados en el desarrollo neoplásico. *Salud Uninorte*. 2018. DOI: 10.14482/sun.34.2.616.98; 34(2).
- 29** Abbas Raza SH, Hassanin AA, Dhshan M AI, Abdelnour A, Khan , Mei , et al. In silico genomic and proteomic analyses of three heat shock proteins (HSP70, HSP90- α , and HSP90- β) in even-toed ungulates. *Electron J Biotechnol*. 2021; 53:61-70. DOI: 10.1016/j.ejbt.2021.07.002.
- 30** Doberentz E, Gennepet L, Wagner R, Madea B. Expression times for hsp27 and hsp70 as an indicator of thermal stress during death due to fire. *Int J Legal Med*. 2017; 131(6):1707-1718. DOI: 10.1007/s00414-017-1566-x.
- 31** Belhadj Slimen I, Najjar T, A G, Abdrrabba M. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2016; 100(3):401-412. DOI: 10.1111/jpn.12379.
- 32** Zatepina OG, Evgen'ev B, Garbuz G. Role of a Heat shock transcription factor and the major heat shock protein Hsp70 in memory formation and neuroprotection. *Cells*. 2021; 10(7):1638. DOI: 10.3390/cells10071638.
- 33** Stamperna K, Giannoulis T, Dovolou E, Kalemkeridou M, Nanas I, Dadouli K, et al. The Effects of Heat Shock Protein 70 Addition in the Culture Medium on the Development and Quality of In Vitro Produced Heat Shocked Bovine Embryos. *Animals (Basel)*. 2021 noviembre 23; 11(12):3347. DOI: 10.3390/ani11123347.
- 34** Yu ME, Yoshinaga T, Jalufka FL, Ehsan H, Mark Welch DB, Kaneko G. The complex evolution of the metazoan HSP70 gene family. *Sci Rep*. 2021; 11(1):17794. DOI: 10.1038/s41598-021-97192-9.
- 35** Stamperna K, Giannoulis T, Dovolou E, Kalemkeridou M, Nanas I, Dadouli K, et al. Heat shock protein 70 improves *in vitro* embryo yield and quality from heat stressed bovine oocytes. *Animals (Basel)*. 2021; 11(16):1794. DOI: 10.3390/ani11061794.
- 36** Monroy-Pancardo HI. Polimorfismo del locus HSP70 y respuesta al estrés por calor en dos grupos genéticos bovinos, locales adaptados e introducidos. [Tesis de Posgrado]. Región Veracruz. Universidad Veracruzana, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2019. Disponible en: <https://cdigital.uv.mx/handle/1944/49906>.
- 37** Bhat S, Kumar P, Kashyap N, Deshmukh B, Dige MS, Bhushan B, et al. Effect of heat shock protein 70 polymorphism on thermotolerance in Tharparkar cattle. *Vet World*. 2016; 9(2):113-117. DOI: 10.14202/vetworld.2016.113-117.
- 38** Wu S, Pei Q, Ni W, Fu X, Zhang W, Song C, et al. HSHSPA1A Protects cells from thermal stress by impeding ESCRT-0-mediated autophagic flux in epidermal

- thermoreistance. *J Invest Dermatol.* 2021; 141(1):48-58.e3. DOI: 10.1016/j.jid.2020.05.105.
- 39** Scieglinska D, Piglowski W, Chekan M, Mazurek A, Krawczyk Z. Differential expression of HSPA1 and HSPA2 proteins in human tissues; tissue microarray-based immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol.* 2011; 135(4):337-350. DOI: 10.1007/s00418-011-0791-5.
- 40** McCallister C, Kdeiss B, Nikolaidis N. HspA1A, a 70-kDa heat shock protein, differentially interacts with anionic lipids. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 467(4):835-840. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.057.
- 41** Kerekoppa RP, Rao A, Basavaraju M, Geetha GR, Krishnamurthy L, Rao T, et al. Molecular characterization of the HSPA1A gene by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis in Holstein-Friesian crossbred and Deoni cattle raised in India. *Turkish J Vet Anim Sci.* 2015; 39(2):128-133. DOI: 10.3906/vet-1212-3.
- 42** Bilog AD, Smulders L, Olivero R, Labanieh C, Zapanta J, Stahelin RV, et al. Membrane localization of HspA1A, a stress inducible 70-kDa Heat-shock protein, depends on its interaction with intracellular Phosphatidylserine. *Biomolecules.* 2019; 9(4):152. DOI: 10.3390/biom9040152.
- 43** Kampinga HH, Craig EA. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Net Rev Mol Cell Bio.* 2010; 11(8):579-592. DOI: 10.1038/nrm2941.
- 44** Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62(6):670-684. DOI: 10.1007/s00018-004-4464-6.
- 45** Balogi Z, Multhoff G, Jensen TK, Lloyd-Evans E, Yamashima T, Jäättelä M, et al. Hsp70 interactions with membrane lipids regulate cellular functions in health and disease. *Prog Lipid Res.* 2019; 74:18-30. DOI: 10.1016/j.plipres.2019.01.004
- 46** Dugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* 2007; 581(19):3702-3710. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.05.039.
- 47** Nimmervoll B, Chtcheglova LA, Juhasz K, Cremades N, Aprile FA, Sonnleitner A, et al. Cell surface localised Hsp70 is a cancer specific regulator of Clathrin-independent endocytosis. *FEBS Lett.* 2015; 589(19 Pt B):2747-2753. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.07.037.
- 48** Smulders L, Daniels AJ, Plescia CB, Berger D, Stahelin RV, Nikolaidis N. Characterization of the relationship between the chaperone and lipid-binding functions of the 70-kDa Heat-shock protein, HspA1A. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(17):5995. DOI: 10.3390/ijms21175995.

- 49 Guerrero-Olazarán M, Cab-Barrera EL, Galán-Wong LJ, Viader-Salvadó JM. Biotecnología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura. *Avances en Nutrición Acuicola*. 2004; 418-440.
- 50 Cabrera P, Fernández A. Criopreservación de embriones: Una herramienta básica en la reproducción asistida. *Rev Fac Cienc Vet*. 2006; 47(2):59-70.
- 51 Santander Bermeo RE. Efecto de la proteína de choque térmico HSP70 sobre la susceptibilidad del camarón *Penaeus litopenaeus vannamei* al WSSV y sobre la capacidad de los hemocitos para tolerar condiciones de estrés. Tesis de Pregrado, UPSI: Universidad Estatal Península de Santa Elena. 2009. Disponible en: <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/842>.
- 52 Prado-Díaz A, Castillo A, Marcela Rojas D, Chávez-Vivas M. Marcadores moleculares en el diagnóstico y pronóstico de sepsis, sepsis grave y choque séptico. *Rev Fac Med*. 2017; 65(1):145-155. DOI: 10.15446/revfacmed.v65n1.53876
- 53 Nowicka-Bauer K, Malcher A, Włoczkowska O, Kamieniczna M, Olszewska M, Kurpisz MK. Evaluation of seminal plasma HSPA2 protein as a biomarker of human spermatogenesis status. *Reprod Biol*. 2022; 22(1):100597. DOI: 10.1016/j.repbio.2021.100597.
- 54 Sojka DR, Abramowicz A, Adamiec-Organisio M, Karnas E, Mielańczyk Ł, Kania D, et al. Heat shock protein A2 is a novel extracellular vesicle-associated protein. *Sci Rep*. 2023; 13(1):4734. DOI: 10.1038/s41598-023-31962-5.
- 55 Scieglinska D, Krawczyk Z. Expression, function, and regulation of the testis-enriched heat shock HSPA2 gene in rodents and humans. *Cell Stress Chaperones*. 2015; 20(2):221-235. DOI: 10.1007/s12192-014-0548-x.
- 56 Toma-Jonik A, Vydra N, Janus P, Widlak W. Interplay between HSF1 and p53 signaling pathways in cancer initiation and progression: non-oncogene and oncogene addiction. *Cell Oncol (Dordr)*. 2019; 42(5):579-589. DOI: 10.1007/s13402-019-00452-0.
- 57 Sojka DR, Gogler-Pigłowska A, Vydra N, Cortez AJ, Filipczak PT, Krawczyk Z, et al. Functional redundancy of HSPA1, HSPA2 and other HSPA proteins in non-small cell lung carcinoma (NSCLC); an implication for NSCLC treatment. *Sci Rep*. 2019; 9(1):14394. DOI: 10.1038/s41598-019-50840-7.
- 58 Sojka DR, Gogler-Pigłowska A, Klarzyńska K, Klimczak M, Zylicz A, Głowala-Kosińska M, et al. HSPA2 Chaperone contributes to the maintenance of epithelial phenotype of human bronchial epithelial cells but has non-essential role in supporting malignant features of non-small cell lung carcinoma, MCF7, and HeLa cancer cells. *Cancers (Basel)*. 2020; 12(10):2749. DOI: 10.3390/cancers12102749.

- 59 Sojka DR, Hasterok S, Vydra N, Toma-Jonik A, Wieczorek A, Gogler-Piğłowska A, et al. Inhibition of the Heat shock protein A (HSPA) family potentiates the anticancer effects of Manumycin A. *Cells*. 2021; 10(6):1418. DOI: 10.3390/cells10061418.
- 60 Nixon B, Bromfield EG, Cui J, De Iulius GN. Heat shock protein A2 (HSPA2): Regulatory roles in germ cell development and sperm function. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2017; 222:67-93. DOI: 10.1007/978-3-319-51409-3_4.
- 61 Shiber A, Ravid T. Chaperoning proteins for destruction: diverse roles of Hsp70 chaperones and their co-chaperones in targeting misfolded proteins to the proteasome. *Biomolecules*. 2014; 4(3):704-724. DOI: 10.3390/biom4030704.
- 62 Morgner N, Schmidt C, Beilsten-Edmands V, Ebong IO, Patel NA, Clerico EM, et al. Hsp70 forms antiparallel dimers stabilized by post-translational modifications to position clients for transfer to Hsp90. *Cell Rep*. 2015; 11(5):759-769. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.03.063.
- 63 Gogler-Piğłowska A, Klarzyńska K, Sojka DR, Habryka A, Głowała-Kosińska M, Herok M, et al. Novel role for the testis-enriched HSPA2 protein in regulating epidermal keratinocyte differentiation. *J Cell Physiol*. 2018; 233(3):2629-2644. DOI: 10.1002/jcp.26142.
- 64 Petyuk VA, Chang R, Ramirez-Restrepo M, Beckmann ND, Henrion MYR, Piehowski PD, et al. The human brainome: network analysis identifies HSPA2 as a novel Alzheimer's disease target. *Brain*. 2018; 141(9):2721-2739. DOI: 10.1093/brain/awy215.
- 65 Finka A, Mattoo RU, Goloubinoff P. Experimental milestones in the discovery of molecular chaperones as polypeptide unfolding enzymes. *Annu Rev Biochem*. 2016; 85:715-742. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060815-014124.
- 66 González A, Fillat MF. Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Rev Educ Bioquímica*. 2018; 37(1):14-27.
- 67 Huerta G, Catalán S, Rodríguez R, Naves D. Producción de proteína y consumo de Glucosa en *Escherichia coli* recombinante. *Fesgro*. 2023; 5(1):622-625.
- 68 Jeiranikhameneh M, Moshiri F, Keyhan Falasafi , Zomorodipour A. Designing signal peptides for efficient periplasmic expression of Human growth hormone in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*. 2017; 27(11):1999-2009. DOI: 10.4014/jmb.1703.03080.
- 69 Rosano GL, Morales ES, Ceccarelli EA. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Sci*. 2019; 28(8):1412-1422. DOI: 10.1002/pro.3668.
- 70 Bhatwa A, Wang W, Hassan YI, Abraham N, Li XZ, Zhou T. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies

to address them for industrial applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021; 9:630551. DOI: 10.3389/fbioe.2021.630551.

- 71** Brijaldo-Villamizar ÁP. Producción de proteínas recombinantes del plasma seminal bovino. Tesis de maestría en Biología Molecular y Biotecnología. Universidad de Pamplona.; 2022 . Disponible en: https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/37370/Ver_Documento_37370.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- 72** Schütz A, Bernhard F, Berrow N, Buyel JF, Ferreira-da-Silva F, Haustraete J, et al. A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production. *STAR Protoc.* 2023; 4(4):102572. DOI: 10.1016/j.xpro.2023.102572.

Anexos

Figura 9. Actividades experimentales.

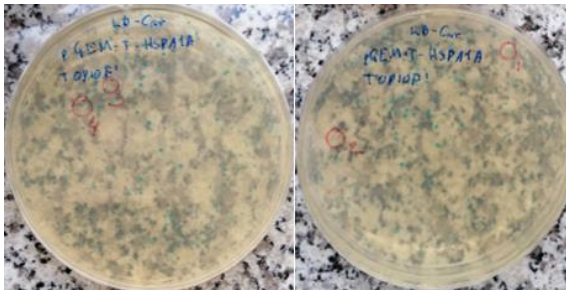
A) Perfil de amplificación para la secuencia codificante de la proteína HSPA1A.

| Laboratorio de Biología Molecular | | 01-FE-MRM-PNPol | | | | | | | | | | |
|---|----------------------------|----------------------|---------------|-------------------------|------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Formato de ensayo: PPA ADN polimerasa | | Versión: 1 | | | | | | | | | | |
| | | Fecha: 2018.01.21 | | | | | | | | | | |
| | | Página: 1 de 2 | | | | | | | | | | |
| A.- Información del ensayo: | | | | | | | | | | | | |
| Ensayo: _____ | | | | | | | | | | | | |
| Fecha: 2018.01.21 | Nombre del programa: _____ | | | | | | | | | | | |
| Nombre: HSPA1A | Tamaño (bp): 1066 | Observaciones: _____ | | | | | | | | | | |
| 1 | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | | | |
| B.- Mezcla de reacción: | | | | | | | | | | | | |
| Reactivo: | Concentración | | Volumen | | | | | | | | | |
| | Inicial: | Final: | de promezcla: | por reacción: | | | | | | | | |
| Agua grado Biología Molecular: | No aplica | No aplica | 74.5 µl | µl | | | | | | | | |
| Ducha de amplificación 10X: | 10X | X | 12.5 µl | µl | | | | | | | | |
| Solución enhancer 10X: | 10X | X | 12.5 µl | µl | | | | | | | | |
| Solución de MgSO ₄ : | 50 mM | mM | 2.5 µl | µl | | | | | | | | |
| Solución de dNTP's: | 2.5 mM | mM | 2.5 µl | µl | | | | | | | | |
| Oligonucleótido: | 10 µM | µM | 1 µl | µl | | | | | | | | |
| Oligonucleótido: | 10 µM | µM | 1 µl | µl | | | | | | | | |
| Oligonucleótido: | 10 µM | µM | 1 µl | µl | | | | | | | | |
| Oligonucleótido: | 10 µM | µM | 1 µl | µl | | | | | | | | |
| Oligonucleótido: | 10 µM | µM | 1 µl | µl | | | | | | | | |
| Oligonucleótido: | 10 µM | µM | 1 µl | µl | | | | | | | | |
| Enzima PPA ADN polimerasa: | 2.5 U/µl | U/µl | 1 µl | µl | | | | | | | | |
| Mixtura de ADN total: | µg/µl | µg/µl | 10 µl | µl | | | | | | | | |
| Volumen final: | | | 125 µl | µl | | | | | | | | |
| C.- Perfil de temperaturas de amplificación: | | | | | | | | | | | | |
| Fase | Duración (min) | Temperatura (°C) | | Módulo de calentamiento | Módulo de enfriamiento | | | | | | | |
| | | Inicio | Fin | | | | | | | | | |
| Desnaturalización | 3 | 94.0 | 94.0 | 3 | 3 | | | | | | | |
| Anillamiento | 1 | 58.0 | 58.0 | 1 | 1 | | | | | | | |
| Extensión | 1 | 68.0 | 68.0 | 1 | 1 | | | | | | | |
| Final | 5 | 68.0 | 68.0 | 1 | 1 | | | | | | | |
| D.- Curva de temperatura de alineamiento: | | | | | | | | | | | | |
| Time | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| TM (°C) | 50.0 | 52.3 | 52.9 | 53.6 | 54.1 | 54.9 | 55.6 | 56.4 | 56.8 | 57.1 | 57.2 | 58.0 |
| Tubo No.1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Tubo No.2 | | | | | | | | | | | | |

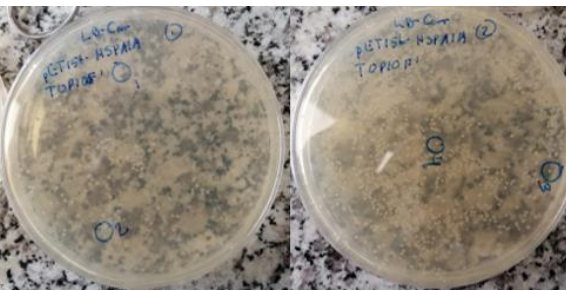
B) Reactivos para amplificación de secuencias codificantes.



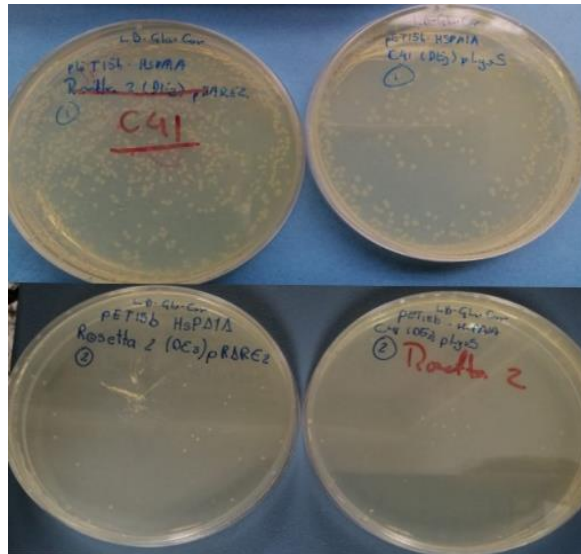
C) Selección de clonas con el plásmido pGEM-T-HSPA1A.



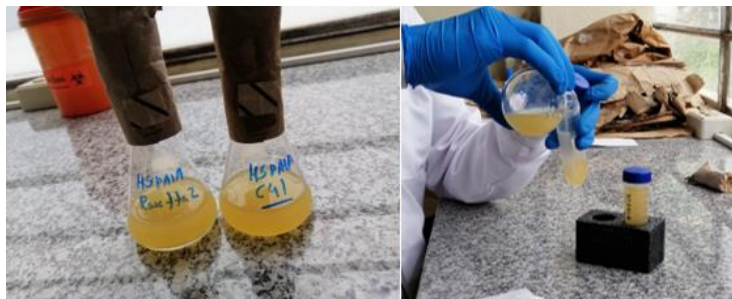
D) Selección de clonas con el plásmido de expresión pET15b- HSPA1A.



E) Placas agar con las cepas bacterianas Rosetta 2 (DE3) y C41 (DE3) recombinantes.



F) Evaluación de la expresión de la proteína HSPA1A en las cepas bacterianas Rosetta 2 (DE3) y C41 (DE3).



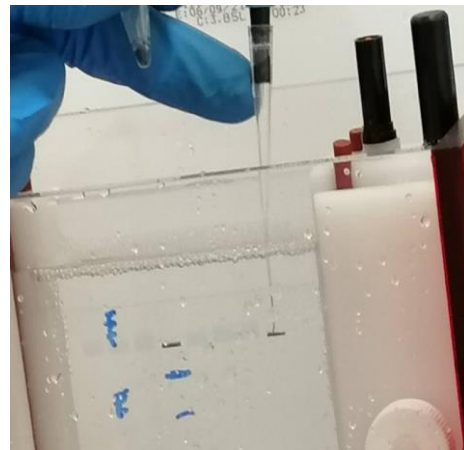
G) Proceso de sonicado de las pastillas bacterianas de las cepas Rosetta 2 (DE3) y C41 (DE3).



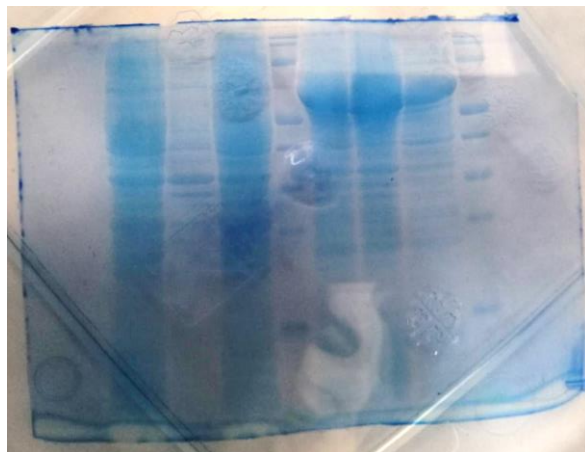
H) Preparación del SDS-PAGE.



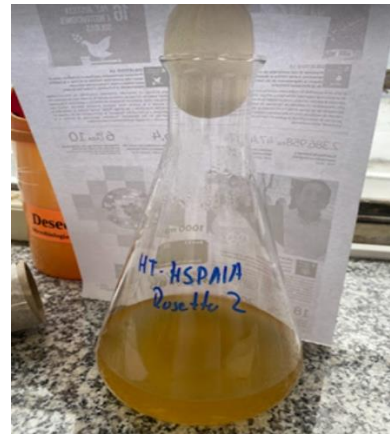
I) Carga de las muestras en el SDS-PAGE.



J) Tinción del SDS-PAGE con Azul brillante de Coomassie.



K) Cultivo de producción con la cepa Rosetta 2 (DE3).



L) Pesaje de la biomasa bacteriana.



M) Fraccionamiento de la biomasa inducida.



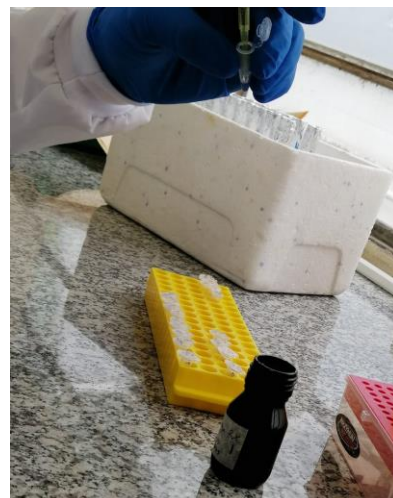
N) Preparación de la columna para la purificación IMAC.



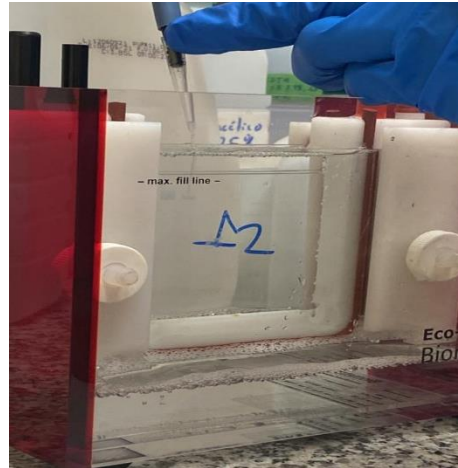
O) Proceso de purificación IMAC.



P) Homogeneización de las muestras con el Buffer de carga para SDS-PAGE.



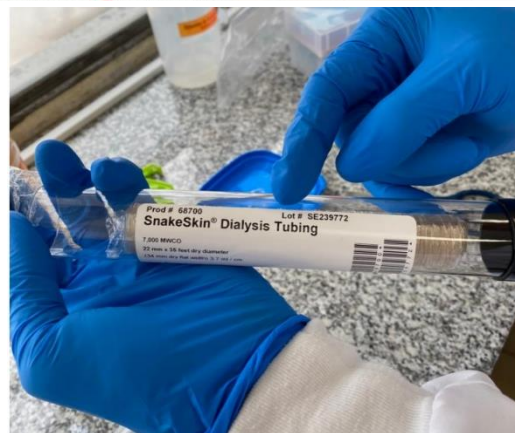
Q) Carga de las muestras correspondientes a las fracciones del Lote 1 y Lote 2 en el SD-PAGE.



R) Colocación del gel en el fotodocumentador para su análisis.



S) Preparación de la membrana de diálisis.



T) Hidratación de la membrana de diálisis en agua destilada.



U) Diálisis de la HSPA1A del Lote 1 (Verde) y del Lote 2 (Azul) en el PBS 1X, pH 7,4.



V) Tinción SDS PAGE de los SDS-PAGE para la cuantificación de la HSPA1A del Lote 1 y 2.



W) Cuantificación de la HSPA1A del Lote 1 y 2 por densitometría mediante el software Image Lab 5.2.1 (BioRad).

