

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biotecnología

“Producción de eritropoyetina humana en *Neurospora crassa*”

TESIS
Que para obtener el grado de
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA
Adrián Guerrero Guzmán
Matrícula: 2233803884
Correo: adriangg5@gmail.com

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Ulises Carrasco Navarro
ASESORES:
Dr. Francisco José Fernández Perrino
Dra. María Eugenia Hidalgo Lara

JURADO:
Presidente:
Dr. Francisco José Fernández Perrino
Secretaría:
Dra. María Eugenia Hidalgo Lara
Vocal:
Dr. Christian Jesús Mora Pérez
Vocal:
Dr. Juan Gabriel Vigueras Ramírez

Iztapalapa, Ciudad de México a 16 de diciembre del 2025

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Sistema Nacional de Posgrados (SNP) de la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECITHI) y además cuenta con apoyo de dicha Secretaría, con número de referencia 001465”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de **Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios** del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Ulises Carrasco Navarro. El trabajo fue financiado por el SECITHI con el número de registro CF-2023-I-1001.

Ciencia y Tecnología

Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación

A María del Carmen Ortega

Esto solo se pudo gracias a su trabajo, amor y compasión
Siempre la recuerdo y llevo en mi corazón

Agradecimientos

A mi casa de estudios, que ha sido mi hogar desde la licenciatura y que se ha convertido en un pilar clave para mi desarrollo académico y personal.

Al Dr. Ulises Carrasco Navarro, por su guía, paciencia y amistad durante estos dos años. No solo ha mostrado ser un académico excepcional, pero también una gran persona.

Al Dr. Ernesto Favela Torres por darme la confianza de formar parte de este proyecto.

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino por integrarme a su laboratorio y ayudarme con la revisión detallada de la escritura de esta tesis desde el primer trimestre.

A la Dra. María Eugenia Hidalgo Lara por su asesoría y confianza.

A la Dra. María Fernanda Cerón Moreno, a la Dra. Wylma Dolores Pérez Pérez, al Dr. Christian Jesús Mora Pérez y al Dr. Héctor Chávez Velazco por su asesoría en la parte experimental y la paciencia ante mi inexperiencia en el laboratorio.

Al Laboratorio de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud por poner a nuestra disposición espacio de trabajo y equipo de laboratorio.

A mi hermano y amigos que me acompañaron durante la maestría.

A mis padres sin los cuales habría sido imposible estudiar el posgrado. Gracias por motivarme a seguir mis sueños desde pequeño, por las herramientas que me han dado para seguir adelante en la vida y por su eterno apoyo incondicional.

A mi novia, que me da fortaleza, me motiva a seguir adelante y me acompaña en los momentos difíciles.

Índice de Contenido

1. Resumen 1

2. Abstract 3

3. Introducción 4

3.1. Eritropoyetina 4

3.1.1 Estructura *4*

3.1.2. Mecanismo de acción *5*

3.1.3. Regulación *6*

3.1.4. Usos *7*

3.2. Patrones de glicosilación 7

3.3. *Neurospora crassa* 8

3.3.1. Uso como modelo biotecnológico *8*

3.3.2. Reproducción asexual *8*

3.3.3. Reproducción sexual *10*

3.3.4. Ciclo circadiano *12*

3.4. Cultivo en estado sólido 12

4. Antecedentes 14

4.1. Sistemas de producción de eritropoyetina 14

4.1.1. Primeras fuentes de EPO *14*

4.1.2. Panorama actual *14*

4.1.3. Producción en Pichia pastoris *15*

4.1.4. Producción en células humanas *16*

4.2. Sistemas de cultivo sólido con *Neurospora crassa* 17

4.2.1. Producción de invertasa *17*

4.2.2. Producción de proteasas *18*

4.2.3. Producción de celulasas y hemicelulasas *18*
5. Justificación 20
6. Hipótesis 21
7. Objetivos 22
7.1. Objetivo general 22
7.2. Objetivos específicos 22
8. Materiales y métodos 23
8.1. Diseño *in-silico* 23
8.2. Manejo de cepas 23
8.2.1. Escherichia coli TOP 10 y DH5α *23*
8.2.1.1. Manejo de E. coli 23
8.2.2. Neurospora crassa #9717 ..... *24*
8.2.2.1. Manejo de N. crassa 24
8.3. Conservación de genes y plásmidos 26
8.4. Extracción de ADN 27
8.4.1. Mega Prep *27*
8.4.2. Extracción de ADN genómico de Neurospora crassa *28*
8.5. Amplificación y purificación de secuencias de interés 29
8.5.1. Amplificación de genes por PCR de punto final *29*
8.5.2. Electroforesis de ADN *30*
8.5.3. Purificación de ADN *31*
8.6. Construcción del vector 32
8.6.1. In-Fusion *32*
8.6.2. Confirmación de construcciones *33*
8.7. Transformación de cepas de *Escherichia coli* 34
8.7.1. Preparación de células competentes *34*

8.7.2. Transformación por choque térmico *34*
8.7.3. Transformación por choque térmico para In-Fusion *35*
8.7.4. Selección de transformantes *35*
8.8. Transformación de *Neurospora crassa* 36
8.8.1. Preparación de muestras *36*
8.8.2. Electroporación de conidios *36*
8.8.3. Confirmación de transformantes *37*
8.9. Cultivo en medio sólido 38
8.9.1. Diseño experimental *38*
8.9.2. Acondicionamiento de soporte sólido *38*
8.9.3. Acondicionamiento de unidades experimentales *39*
8.9.4. Inoculación de unidades experimentales *39*
8.9.5. Incubación de unidades experimentales *39*
8.9.6. Recuperación de extractos extracelulares *39*
8.9.7. Cuantificación de biomasa por gravimetría *40*
8.9.8. Análisis de pH *40*
8.9.9. Cuantificación de proteína extracelular por método de Bradford *40*
8.10. Expresión e identificación de secreción de rhEPO por SDS-PAGE 41
8.10.1. Preparación de muestras *41*
8.10.2. Preparación de geles de poliacrilamida *42*
8.10.3. Electroforesis *43*
8.10.4. Tinción y visualización de geles *43*
8.11. Reactivos y medios de cultivo 44
8.11.1. Medios de cultivo *44*
8.11.2. Para extracción de ADN *46*

8.11.3. Para preparar células competentes *47*

8.11.4. Para SDS-Page *47*

9. Resultados y discusión 49

9.1. Diseño *in-silico* 49

9.1.1. Biobricks *49*

9.1.1.1. SigGla 49

9.1.1.2. EPO 50

9.1.1.3. pMF272 50

9.1.2. Diseño del gen sintético *52*

9.1.2.1. Gen SigGla – EPO – HisTag 52

9.1.3. Diseño del vector de expresión *54*

9.1.3.1. pMF272_SigGla-rhEPO-HisTag 55

9.1.4. Diseño de oligonucleótidos *56*

9.2. Amplificación de secuencias de interés 56

9.2.1. PCR *56*

9.2.2. Purificación por columna *57*

9.2.3. Cuantificación de ADN *58*

9.3. Construcción del vector 59

9.3.1. Choque térmico *60*

9.3.2. Resiembra de posibles transformantes *60*

9.3.3. Confirmación de transformantes *61*

9.4. Transformación de *Neurospora* crassa 61

9.4.1. Cultivo de N. crassa *61*

9.4.1.1. Pruebas de auxotrofía 61

9.4.1.2. Siembra de N. crassa y recolección de conidios 64

9.4.2. Electroporación de conidios *64*

9.4.3. Obtención de cultivo monospórico *66*

9.4.3.1. Resiembra de posibles transformantes 66
9.4.3.2. Cepas monospóricas y homocariontes 66
9.4.4. Confirmación de transformantes *68*
9.5. Cultivo en medio sólido 69
9.5.1. Biomasa *69*
9.5.2. pH *70*
9.5.3. Proteína extracelular *71*
9.6. Producción de eritropoyetina 72
9.6.1. SDS-PAGE *72*
10. Conclusión 75
11. Referencias 76

Índice de Figuras

Figura 1. Modelo de la eritropoyetina humana realizado con el programa BIOVIA Discovery Studio Visualizer a partir de la estructura con el número de acceso en UniProt, P01588 (Cheetham, 1998). 4

Figura 2. Receptor de eritropoyetina en células CPE, cascada de señalización JAK2/STAT3/STAT5 y regulación negativa del receptor EPO-R. Adaptado de Tóthová et al., 2021. 5

Figura 3. Inducción del gen EPO por el complejo HIF-2/HNF-4/p300 en condiciones de hipoxia. 6

Figura 4. Horquilla formada por el complejo HIF/HNF-4/p300 durante la inducción del gen EPO. Adaptado de Stockmann & Fanderey (2006). 6

Figura 5. Formación de conidios, adaptado de Ruger & Corrochano, 2020. 9

Figura 6. Ciclo de vida de *Neurospora crassa*. Adaptado de Metzenberg & Glass (1990). 11

Figura 7. Proceso de meiosis y mitosis durante la formación de ascosporas en *Neurospora crassa* (Raju, 2009). 11

Figura 8. Ciclo de conservación y manejo de cepas de *E. coli*. 24

Figura 9. Ciclo de conservación y manejo de *Neurospora crassa* #9717 previo a la electroporación de conidios. 26

Figura 10. Ciclo de conservación y manejo de *N. crassa* posterior a la electroporación de conidios. 26

Figura 11. Diagrama de los cultivos y del flujo de trabajo: 1. Cultivo en estado sólido, 2. Preparación de muestras y 3. Análisis por SDS-PAGE. 38

Figura 12. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos correspondiente al péptido señal de la glucoamilasa-1 con una longitud de 225 pb. 49

Figura 13. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos correspondiente a la eritropoyetina humana madura con una longitud de 483 pb. 50

Figura 14. Mapa genético del plásmido pMF272. 51

Figura 15. Región y secuencia del plásmido pMF272 donde hibrida el oligo pMF272 R... 52

Figura 16. Región y secuencia del plásmido pMF272 donde hibrida el oligo pMF272 F. .. 52

Figura 17. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos correspondientes al gen *SigGla – EPO – HisTag* con una longitud de 726 pb. 53

Figura 18. Mapa genético del plásmido pMF272_SigGla – rhEPO – HisTag. 55

Figura 19. Región y secuencia de la construcción donde se lleva a cabo la reacción de In-Fusion. 55

Figura 20. Región y secuencia de la construcción donde se lleva a cabo la reacción de In-Fusion. 55

Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de ADN de interés amplificados por PCR. 57

Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de ADN de interés, tras su purificación por columna. 58

Figura 23. Cultivo de *E. coli* DH5α tras a la transformación por choque térmico. 60

Figura 24. Sembrado de posibles transformantes sobre medio SOC agar adicionado con ampicilina a una concentración de 100 μg/mL. 60

Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. 61

Figura 26. Pruebas de auxotrofía de *Neurospora crassa* #9717 63

Figura 27. 1) Cultivos de *N. crassa* #9717 en bisel. 2) Cultivo de *N. crassa* #9717 en matraz Erlenmeyer. 3) Suspensión de conidios utilizada para la electroporación. 64

Figura 28. Cultivo de *N. crassa* posterior a la electroporación de conidios. 65

Figura 29. Siembra de *N. crassa* tras la electroporación. 66

Figura 30. Cepas monospóricas y homocariontes de *N. crassa* transformadas con el gen *SigGla – EPO – HisTag*. 67

Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de extracción de ADN genómico de cepas transformadas de *N. crassa*. 68

Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR punto final de controles y cepas transformadas. 69

Figura 33. Gráfica de biomasa seca por gramo de soporte (espuma de poliuretano, EPU) en función del tiempo de cultivo. 70

Figura 34. Gráfica de la variación de pH en los extractos recolectados en función del tiempo de cultivo. 71

Figura 35. Gráfica de la producción de proteína extracelular (mg) por gramo de soporte (EPU) en función del tiempo de cultivo. 72

Figura 36. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. 74

Índice de Tablas

Tabla 1. Conservación de piezas biológicas. 27

Tabla 2. Componentes para cada reacción de PCR de punto final I. 30

Tabla 3. Protocolos en el termociclador para cada reacción de PCR de punto final I. 30

Tabla 4. Componentes de cada reacción In-Fusion. 32

Tabla 5. Componentes para cada reacción de PCR de punto final II. 33

Tabla 6. Protocolos en el termociclador para cada reacción de PCR de punto final II. 33

Tabla 7. Secuencias y uso de los oligonucleótidos. 56

Tabla 8. Cuantificación de ADN en Nanodrop. 58

Tabla 9. Cálculo de la concentración de ADN en muestras. 58

1. Resumen

La eritropoyetina (EPO) es una hormona de carácter glicoproteico, cuya función biológica es inducir la hematopoyesis. Estructuralmente está compuesta por una cadena de 165 residuos de aminoácidos, con dos puentes disulfuro, tres N-glicosilaciones y una O-glicosilación, con un peso molecular de 34 kDa. La EPO, es una molécula de alto interés farmacológico para el tratamiento de anemias secundarias debidas al fallo renal crónico, a quimioterapia u otras causas. La EPO ha sido utilizada terapéuticamente desde su exitosa clonación y expresión en células ováricas de hámster chino (CHO, por sus iniciales en inglés) desde 1985. Desde esta fecha, el sistema de expresión preferido (las células CHO) se ha conservado inalterado a pesar de que se han probado otros sistemas de expresión, como las células renales de cría de hámsteres (BHK) y las células humanas de fibrosarcoma (HT1080). Todos estos sistemas de expresión, basados en células de mamífero, se siguen utilizando debido a la naturaleza estructural de la EPO; sin embargo, estos sistemas implican altos costos de producción y un riesgo de contaminación considerablemente mayor que con otros cultivos celulares.

Por lo tanto, este proyecto propone al hongo filamentoso *Neurospora crassa* como una alternativa para la expresión heteróloga de proteínas glicosiladas, utilizando como modelo a la eritropoyetina humana. Se seleccionó *N. crassa* debido a sus bajos requerimientos nutricionales, su capacidad de sintetizar modificaciones postraduccionales, su capacidad de secreción de proteínas y su capacidad de fotoregulación de genes, que, en conjunto ofrecen el potencial para establecer un sistema de producción de glicoporteínas eficaz y accesible.

Para producir rhEPO, se diseñó una proteína de fusión adicionando una secuencia de secreción proveniente de la glucoamilasa-1, propia del hongo, en el extremo N-terminal, y una cola de histidinas en el extremo C-terminal. Al gen codificante de esta proteína de fusión se le llamó SigGla – rhEPO – HisTag y fue clonado en el vector pMF272 bajo el control del promotor inducible por luz azul *Pccg-1*. Esta construcción se utilizó para transformar la cepa auxótrofa a histidina de *N. crassa* #9717.

Se utilizó una de las seis cepas obtenidas tras la trasformación del hongo, la cepa *N. crassa* EPO 6+, para la producción de eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) por cultivo en

medio sólido. Se realizó una cinética de producción tomando muestras cada 24 h, todas en las mismas condiciones, hasta las 96 h de cultivo. Los extractos extracelulares fueron analizados mediante SDS-PAGE para comparar los secretomas de la cepa transformante y la cepa nativa. Se observó que la cepa *N. crassa* EPO 6+ presenta bandas de 37 kDa (el peso aproximado a la EPO humana) a partir de las 24 h, mientras que la cepa nativa carece de ellas. Esta evidencia indica la secreción de rhEPO; sin embargo, se requiere de purificar la proteína y caracterizarla por espectrometría de masas para asegurar con certeza que se está expresando de forma correcta. Adicionalmente, la espectrometría de masas permitirá conocer los patrones de glicosilación realizados por *N. crassa*, definiendo las siguientes estrategias a seguir para mejorar al sistema de producción propuesto.

Casa abierta al tiempo

2. Abstract

Erythropoietin (EPO) is a 34 kDa glycoprotein hormone that induces hematopoiesis and has pharmaceutical applications in the treatment of secondary anemias. Since its expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells in 1985, mammalian cell systems have remained the standard for EPO production due to structural requirements despite their high costs, large nutritional requirements, contamination risks, and sensitivity to yield stress.

This project aimed to establish *Neurospora crassa* (*N. crassa*), a filamentous fungus, as an alternative system for the heterologous expression of glycoproteins, using human erythropoietin as a model. *N. crassa* was selected due to its low nutritional requirements, its high secretion rates, its capacity to perform N-glycosylation, and its capacity to photo-regulate its genes. Altogether, these qualities suggest *N. crassa* as an accessible and efficient expression system for recombinant glycoprotein production.

To achieve this, we designed a fusion protein by adding a secretion signal sequence from the fungus's glucoamylase-1 to the N-terminus and a histidine tag to the C-terminus. The gene encoding this fusion protein, named SigGla – rhEPO – HisTag, was cloned into the pMF272 vector under the control of the light-inducible promoter *Pccg-1*. The final expression vector was used to transform the auxotroph to histidine strain *N. crassa* #9717.

We used the strain *N. crassa* EPO 6+, one of the six successfully transformed strains, to produce recombinant human EPO (rhEPO) through solid-state fermentation (SSF). The secretome produced in SSF by the wild and mutated strains was analyzed by SDS-PAGE to identify the presence or absence of rhEPO. The analyzed samples corresponded to the extracellular proteins present in the media at 24, 48, 72, and 96 hours of fermentation. It was observed that the *N. crassa* EPO 6+ strain showed bands at 37 kDa (close to the corresponding 34 kDa of human EPO) starting at 24 hours. In contrast, the native strain lacked them, thus suggesting the successful expression of rhEPO by the engineered fungus. Nonetheless, further purification, characterization, and quantification of the protein are required to confirm that the observed protein is rhEPO, determine its glycosylation patterns, and define production yields.

3. Introducción

3.1. Eritropoyetina

La eritropoyetina (EPO), por función, es catalogada como una hormona y es encargada de regular la hematopoyesis, el cual es el proceso de producción y diferenciación de eritrocitos en medula ósea (De los Ríos-Morales *et al*., 2021). A diferencia de otras hormonas, esta no es sintetizada en su sitio de acción, sino que es producida principalmente por los riñones, en las células epiteliales tubulares renales (REPC) y en cantidades mínimas, por las células hepáticas (Gómez, 2020).

3.1.1 Estructura

Estructuralmente, la EPO es una proteína glicosilada con un peso molecular de 34 kDa (Gómez, 2020). Su estructura se compone de una secuencia de 165 aminoácidos, con dos puentes disulfuro entre los residuos de cisteína 7-161 y 29-33, una O-glicosilación en la serina 126 y tres N-glicosilaciones putativas en las asparaginas 24, 38 y 83 (Figura 1) (Jelkmann, 2007a), lo que resulta en un arreglo tridimensional globular compuesto por cuatro α–hélices antiparalelas (Cheetham *et al*., 1998). Como se puede observar, las modificaciones postraduccionales de esta proteína representan una gran parte de su identidad y corresponden aproximadamente al 40% de su peso total, lo que le otorga estabilidad y función biológica (Inoue *et al*., 1995).

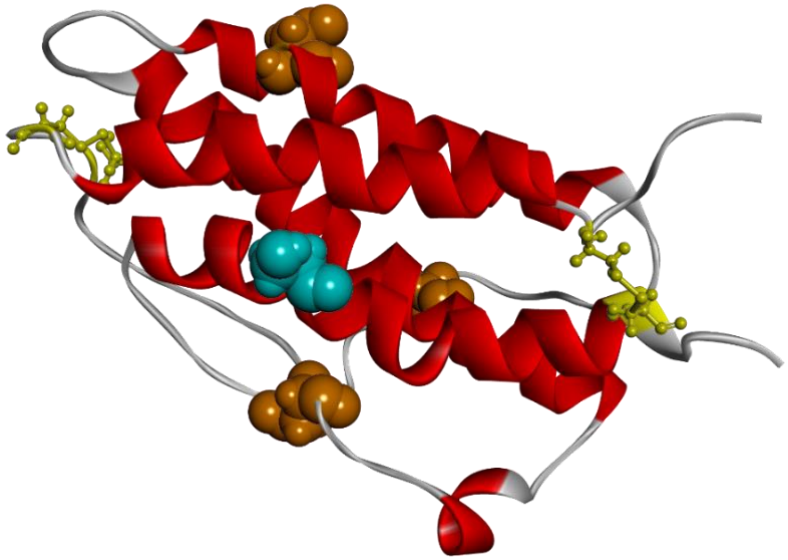


Figura 1. Modelo de la eritropoyetina humana realizado con el programa BIOVIA Discovery Studio Visualizer a partir de la estructura con el número de acceso en UniProt, P01588 (Cheetham, 1998).

En color amarillo se resaltan los puentes disulfuro Cys^{7}-Cys^{161} y Cys^{29}-Cys^{33}. En color naranja se remarcan los residuos Asn^{24}, Asn^{38} y Asn^{83}, lugar de las N- glicosilaciones, y en color azul se identifica al residuo Ser^{126} donde se presenta la O-glicosilación.

3.1.2. Mecanismo de acción

Para iniciar la hematopoyesis, la EPO es reconocida por los receptores de eritropoyetina (EPO-R) en las células precursoras eritroides (CPE). El receptor EPO-R es un receptor de citocinas tipo 1 el cual interactúa, en su forma homodimérica, con la EPO para iniciar la vía de señalización JAK2/STAT3/STAT5. El receptor EPO-R puede ser regulado de forma negativa por varios mecanismos; 1) mediante unión a un sitio de alta afinidad por parte de las proteína SOCS (proteína supresora de la señalización de citocinas) y de la proteína CLINT1, 2) por la unión directa de la proteína SH23B con la cinasa JAK2 (provocando una atenuación de la fosforilación de JAK2, dando por resultado una disminución en la fosforilación del receptor de eritropoyetina), por otra parte, la regulación positiva, se da principalmente por la vía de señalización mediada por la activación de la cinasa JAK2 y el factor de transcripción STAT5, el cual ejerce una fuerte regulación en la eritropoyesis (Eggold & Rankin, 2019; Jelkmann, 2013).

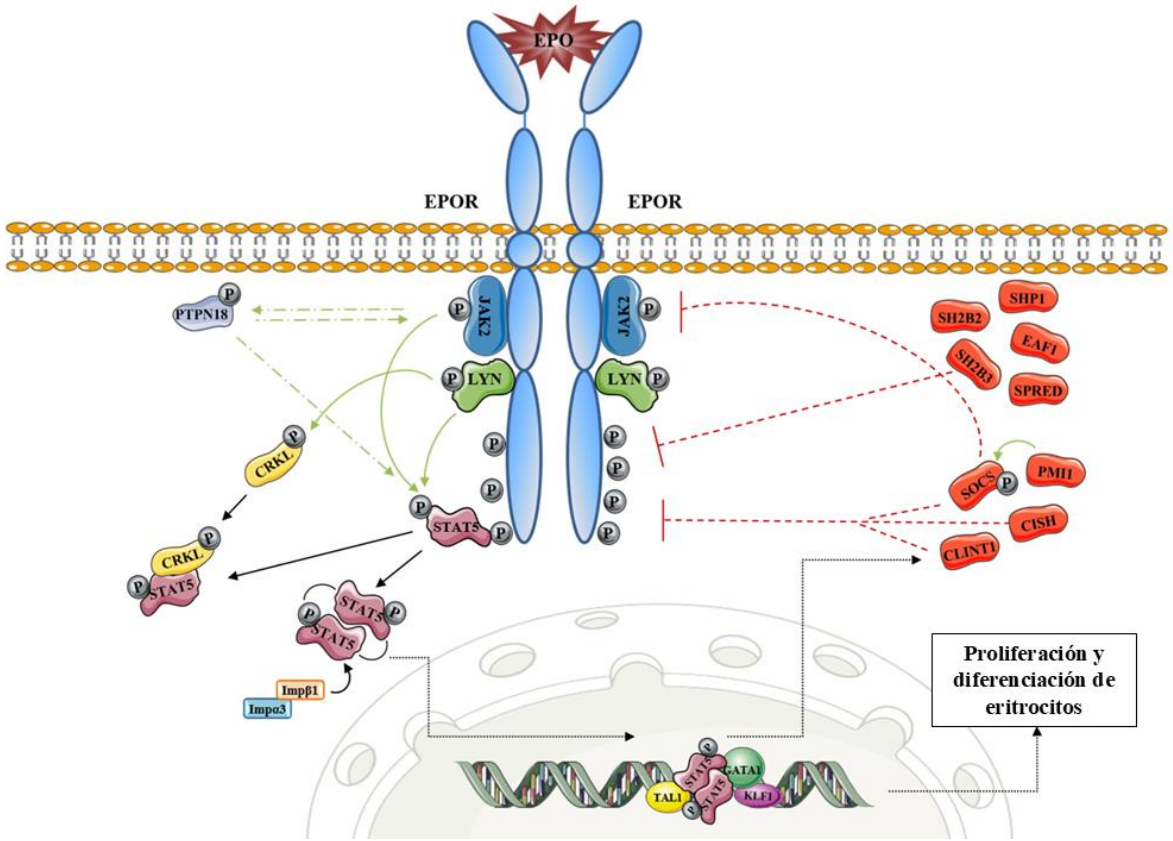


Figura 2. Receptor de eritropoyetina en células CPE, cascada de señalización JAK2/STAT3/STAT5 y regulación negativa del receptor EPO-R. Adaptado de Tóthová et al., 2021.

Casa abierta al tiempo

3.1.3. Regulación

El gen *EPO* se expresa de forma constitutiva en las células REPC, lo que mantiene una concentración estable de EPO en plasma entre 4 y 26 mU/mL (Spivak, 1993). La expresión del gen puede, sin embargo, ser regulada por el factor inducible por hipoxia 2 (HIF-2), un factor de transcripción heterodimérico cuyas subunidades son proteínas del tipo hélice-giro-hélice de la familia PAS (Haase, 2013). En condiciones de hipoxia o anemia, la inducción es tan fuerte que se ha observado un incremento de hasta 1,000 veces la concentración de EPO circulante (Eggold & Rankin, 2019). Este incremento no sólo se debe a la inducción a nivel transcripcional, sino que también se inducen mecanismos que favorecen la estabilidad del mRNA (Spivak, 1993).



Figura 3. Inducción del gen EPO por el complejo HIF-2/HNF-4/p300 en condiciones de hipoxia.
Los factores de transcripción interactúan en una secuencia "Enhacer" río abajo del gen EPO e interaccionan con la secuencia consenso 5´-TACGTGCT-3´río arriba para inducir la transcripción. Adaptado de Bunn, 2013.

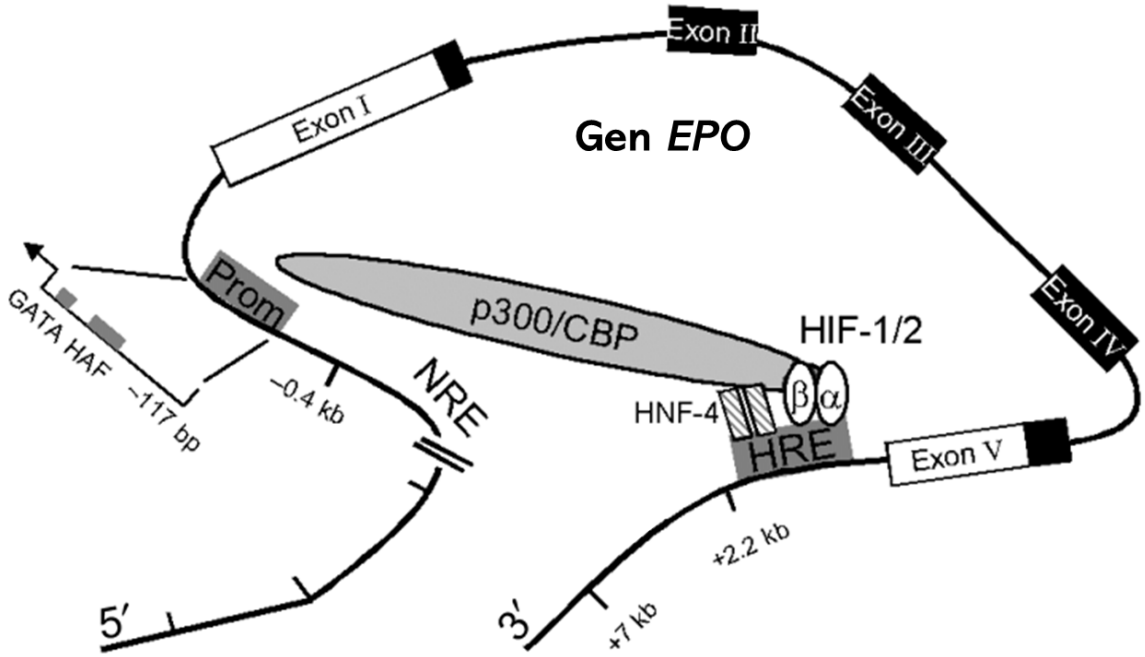


Figura 4. Horquilla formada por el complejo HIF/HNF-4/p300 durante la inducción del gen EPO. Adaptado de Stockmann & Fanderey (2006).

Casa abierta al tiempo

3.1.4. Usos

Desde 1988 (Winearls, 1998), se ha utilizado eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) para tratar a pacientes con insuficiencia renal crónica, pero se ha adoptado la terapia con rhEPO para tratar en general a pacientes con anemia secundaria, ya sea provocada por cáncer, artritis reumatoide o por el tratamiento con 3´-azidotimidina en pacientes con SIDA (Jiménez *et al*., 1991; Çelik *et al*., 2007).

3.2. Patrones de glicosilación

Las O- y N- glicosilaciones son modificaciones postraduccionales que ocurren en el aparato de Golgi y retículo endoplasmático, por lo que los sistemas procariotas son incapaces de llevarlas a cabo (Sethuraman & Stadheim, 2006). Estas modificaciones son esenciales para dar estabilidad, forma y función biológica a las glicoproteínas y la secuencia específica de monómeros de glicanos que las componen depende del tipo de célula, especie (Lee *et al*., 2012) y estímulos ambientales (Jelkmann, 2007b). En el caso de la rhEPO (como fármaco glicosilado), los patrones de glicosilación afectan directamente a su farmacocinética. La presencia de residuos no humanos como el Ácido N-glicolilneuramínico (AcNeu5Gc) y la galactosa-α-1,3-galactosa (α-Gal) producen respuestas inmunitarias, reduciendo el tiempo de vida en suero de la rhEPO y, por ende, disminuyendo su efecto terapéutico (Dammen-Brower *et al*., 2022). Algo similar ocurre con los residuos de manosa, los cuales, a pesar de que por sí solos no representan un riesgo para la salud, debido a su alta frecuencia en los sitios de glicosilación provocan respuestas inmunitarias. Este es un fenómeno recurrente en la expresión heteróloga en levaduras que hipermanosilan las proteínas, llegando a incorporar hasta 100 residuos de manosa por sitio de N-glicosilación (Hamilton *et al*., 2003). Por otro lado, hay residuos y estructuras que favorecen la estabilidad de las glicoproteinas, tal como es el caso del ácido síalico. La ausencia de extremos sialilados en los glicanos se asocia con una disminución significativa del tiempo de vida en suero de la EPO. Una molécula de EPO no sialilada tiene una vida media plasmática de 10 min mientras que el de una EPO sialilada es de entre 5 y 11 h. Esto se debe a que la EPO no sialilada es eliminada del sistema circulatorio por medio de los receptores de asialoglicoproteína (ASGPR) del hígado (Dammen-Brower *et al*., 2022).

Aunado a los patrones de glicosilación, la cantidad de glicanos enlazados a una molécula afecta directamente su estabilidad y especificidad, las cuales son inversamente proporcionales. Tal es el caso de la darbepoetin-α, comercializada bajo el nombre de Aranesp, que es una variación de la EPO en la que se mutaron los residuos de las posiciones 30 y 88 para adicionar dos sitios nuevos de N-glicosilación (Asp^{33} y Asp^{88}). Se comprobó que las nuevas glicosilaciones prolongaron la vida media en suero de la molécula a 25 h, aproximadamente tres veces más que el tiempo de vida media en suero de la EPO, pero también se disminuyó su afinidad por los EPO-R (Jelkmann, 2007b).

3.3. *Neurospora crassa*

Neurospora crassa es un hongo filamentoso del filo Ascomycota que, fisiológicamente, se caracteriza por tener hifas septadas y polinucleadas. Su reproducción sexual es heterotálica y por ascosporas, mientras que la reproducción asexual se realiza mediante conidios (Ruger-Herreros & Corrochano, 2020). Es un hongo saprótrofo, que se puede encontrar principalmente en climas tropicales y subtropicales, pero que también puede aparecer en bosques de coníferas de zonas nórdicas. Una peculiaridad de su estilo de vida es que crece abundantemente en zonas forestales devastadas por incendios, ya que las altas temperaturas y el suelo rico en nutrientes estimulan la germinación y proliferación del hongo (Kuo *et al*., 2014).

3.3.1. Uso como modelo biotecnológico

Desde 1843, *N. crassa* ha sido utilizado como modelo de estudio para la genética mendeliana gracias a sus bajos requerimientos nutricionales, su crecimiento rápido, su ciclo de vida corto y su genética haploide. A lo largo de la historia, su uso como modelo biotecnológico ha cambiado en función del descubrimiento de modelos más estables y simples, como *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. Actualmente *N. crassa* se posiciona como un atractivo modelo para el estudio de sistemas eucariontes multicelulares en los ámbitos de epigenética, expresión génica y regulación, fotobiología y estudios relacionados con el ciclo circadiano (Roche *et al*., 2014).

3.3.2. Reproducción asexual

La reproducción asexual en *N. crassa* puede llevarse a cabo de dos formas: por macroconidios, que es la forma usual, o por microconidios, que se presentan bajo

condiciones de estrés ambiental como el incremento de humedad o temperatura y la limitación de nutrientes (Maheshwari, 1999).

Los macroconidios de *N. crassa* poseen una pared celular de color naranja brillante, provocado por la presencia de carotenoides (Baker *et al*., 2012). En su interior pueden contener entre uno y cinco núcleos (Russo *et al*., 1992). Estos conidios son una diferenciación de la hifa, que forma una estructura aérea con extremos ramificados llamados proconidios. Cada proconidio presentará una serie de constricciones a lo largo de su estructura dando forma a los conidios polinucleados, que, al madurar, serán esparcidos por corrientes de aire. Este proceso es regulado por factores ambientales como la luz, teniendo una estrecha relación con el ciclo circadiano del hongo, y llega a durar entre 12 y 24 h tras su inducción (Ruger -Herreros & Corrochano, 2020).

Por otro lado, los microconidios se diferencian de sus contrapartes por ser esporas uninucleadas de menor tamaño, carecer de carotenoides en su pared celular y presentar una menor viabilidad que los macroconidios (Ruger & Corrochano, 2020).

La conidiación es inducida y regulada por factores ambientales (Figura 5), como la exposición de la hifa al aire, la escasez de sustrato o cambios en la temperatura, pero, por encima de estos, destaca la regulación mediada por la luz. Esta la llevan a cabo las proteínas WC-1 y WC-2, que actúan como fotorreceptores de luz azul. Tras la fotoestimulación, estas proteínas interaccionan entre sí para formar el complejo WCC (por sus siglas en inglés, complejo de cuello blanco) el cual actúa como factor de transcripción activador para el gen *fl*, que participa activamente en la estimulación de la conidiación (Ruger-Herreros & Corrochano, 2020).

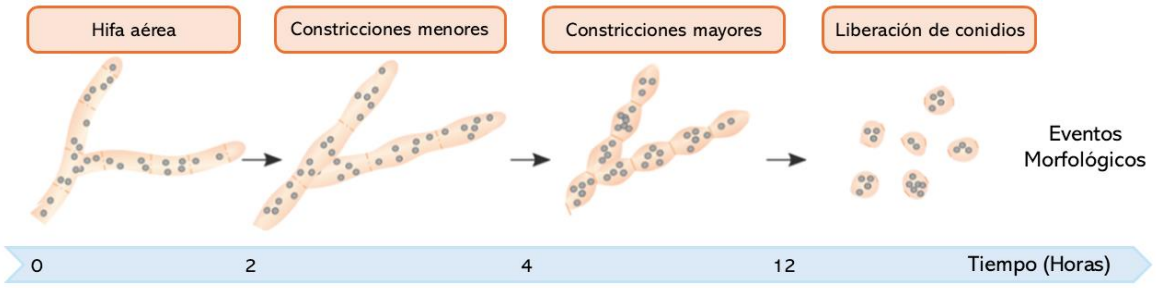


Figura 5. Formación de conidios, adaptado de Ruger & Corrochano, 2020.

3.3.3. Reproducción sexual

La reproducción sexual en *N. crassa* se produce mediante la formación de ascas y ascosporas dentro de una estructura especializada llamada peritecio (Figura 6). Dentro del peritecio pueden formarse entre 200 y 400 ascas, cada una con ocho ascosporas haploides polinucleadas, que son expulsadas por el ostíolo del peritecio (Raju, 2009).

Al ser un mecanismo de reproducción sexual heterotálica, solo se llevará a cabo cuando haya entrecruzamiento de hifas de sexo opuesto (*mat A* y *mat a*) o bien masculinas y femeninas (Raju, 2009). Para lograr la fertilización, es necesaria la presencia de un protoperitecio, que alberga el ascogonio (estructura de reproducción de tipo *mat a*). Para facilitar la interacción con la contraparte *mat A*, el ascogonio expone hifas especializadas llamadas tricóginas. Las tricóginas son afines a los conidios *mat A*, que transfieren su núcleo a la tricógina durante la fertilización. Tras la fertilización se induce la maduración del peritecio y la formación de las ascas. Los núcleos *mat A* son traslocados a hifas ascógenas, hifas en forma de gancho compuestas por tres células; aquellas que contengan ambos núcleos (tipo *mat A* y *mat a*) serán las que se desarrollen en ascas. Es importante mencionar que la maduración de las ascas es la única etapa en la que hay células diploides, puesto que *N. crassa* se encuentra en estado vegetativo únicamente en forma haploide. Una vez presente la célula ascógena binucleada, ambos núcleos haploides se fusionan para formar un único núcleo diploide (cariogamia) (Brun *et al*., 2021). Este núcleo diploide inmediatamente sufre un proceso de meiosis y posterior mitosis, resultando en ocho núcleos totales, cuatro del tipo *mat A* y cuatro *mat a*, los cuales, por medio de invaginaciones de la pared de la hifa, darán lugar a ocho ascosporas definidas (Figura 7) (Raju, 2009).

Casa abierta al tiempo

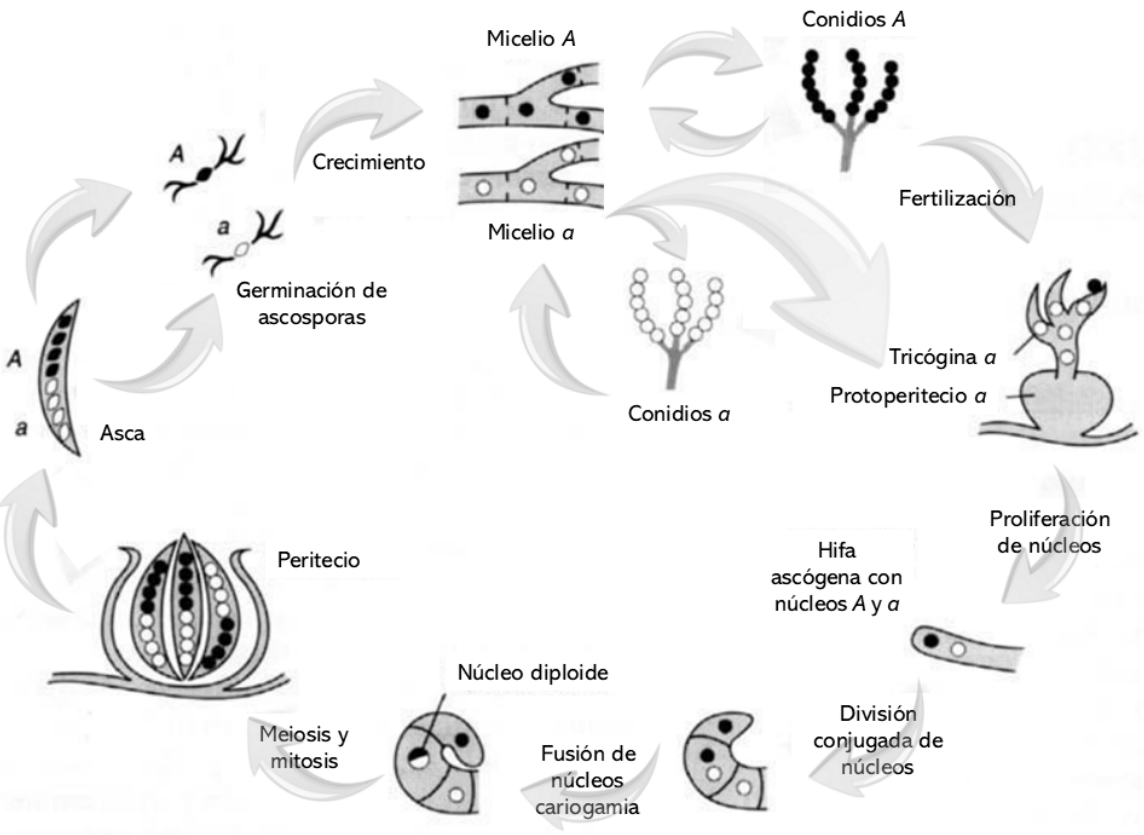


Figura 6. Ciclo de vida de *Neurospora crassa*. Adaptado de Metzenberg & Glass (1990).

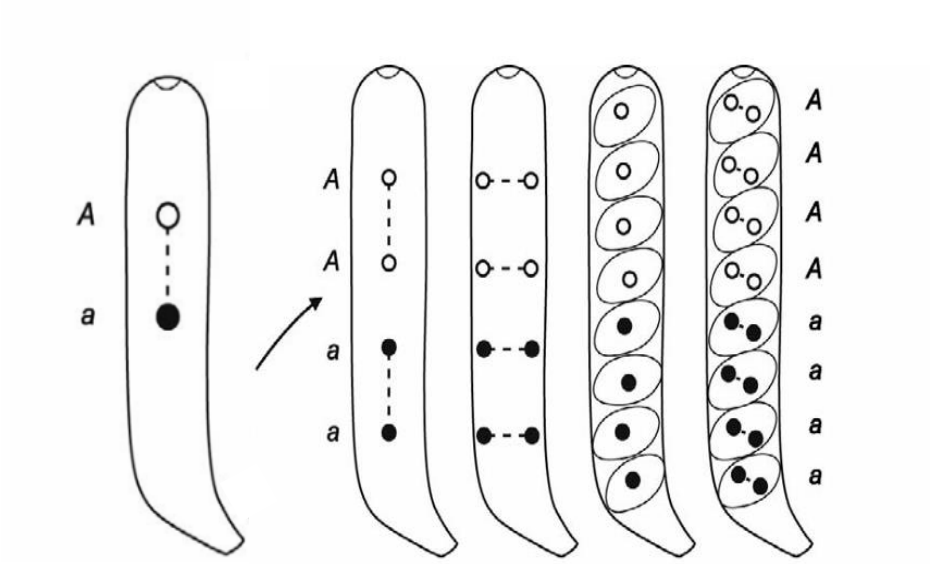


Figura 7. Proceso de meiosis y mitosis durante la formación de ascosporas en *Neurospora crassa* (Raju, 2009).
La célula transiciona de ser diploide heterocarionte a ser haploide homocarionte.

Casa abierta al tiempo

3.3.4. Ciclo circadiano

Los ciclos circadianos son mecanismos de regulación que se presentan en todos los organismos eucariontes y en organismos multicelulares en todos los tejidos. Se componen de tres elementos: un mecanismo de recepción de señales, un reloj interno y un mecanismo de respuesta (Baker *et al*., 2012). Los principales estímulos que afectan este ciclo son la luz y los cambios de temperatura (e incluso la disponibilidad de nutrientes). Sin embargo, el reloj interno sigue su función aún en ausencia de estímulos, dando lugar a ciclos de aproximadamente 24 h (Jankowski *et al*., 2020).

El descubrimiento del uso de carotenógenos como receptores de luz para la regulación del ciclo circadiano en *N. crassa* y su relación con la expresión génica dio inicios a la fotobiología en hongos y lo ha posicionado como el organismo modelo para estudios de esta índole en eucariontes. Aproximadamente el 6% de los genes de *N. crassa* son regulados por la luz azul, y entre ellos destacan los que controlan la reproducción asexual del hongo (Roche *et al*., 2014).

3.4. Cultivo en estado sólido

El cultivo en estado sólido (SSC, por sus iniciales en inglés) se define como aquel en el que el microorganismo, generalmente una bacteria, levadura o un hongo filamentoso, crece en la superficie de una matriz sólida con bajas cantidades de líquido (Lizardi-Jiménez & Hernández-Martínez, 2017). En ese sistema, la humedad proviene de una fase líquida absorbida en la matriz.

Todo SSC está compuesto por cuatro elementos principales; 1) la matriz sólida, que funciona como andamio para el crecimiento microbiano, 2) una fase gaseosa que fluye a través del soporte sólido, 3) una fase acuosa que provee de humedad y, en algunos casos, nutrientes. y 4) el microorganismo que crece en la superficie o en la porosidad del soporte (Yaffetto, 2022).

Los tipos de soporte en un SSC pueden ser de dos tipos: naturales o inertes. El soporte natural es aquel que, además de actuar como andamio, sirve como fuente de carbono para el microorganismo. El medio natural más común en los SSC es el de los residuos agroindustriales como el rastrojo de maíz. Por otro lado, el soporte inerte es aquel que se compone de un material no metabolizable por el microorganismo y, por lo tanto, debe ir

acompañado de una fase acuosa rica en nutrientes y adicionada con alguna fuente de carbono. Un material ampliamente utilizado es la espuma de poliuretano, acompañada de una solución de glucosa, sacarosa u otra fuente de carbono (Krishna, 2005; Singhania et al., 2009).

La principal ventaja del cultivo en estado sólido sobre el cultivo en líquido es la reducción de costos, derivada del tipo de sustrato utilizado y de los mayores rendimientos obtenidos. Otras ventajas son la disminución del consumo de agua, la facilidad del manejo de residuos y el menor riesgo de contaminación; sin embargo, estos sistemas también se ven acompañados de una serie de desventajas, principalmente la dificultad de mantener la humedad y la temperatura constantes durante todo el proceso, lo que, en consecuencia, dificulta su escalamiento (Farinas, 2015; Mattedi *et al*., 2023).

Casa abierta al tiempo

4. Antecedentes

4.1. Sistemas de producción de eritropoyetina

4.1.1. Primeras fuentes de EPO

La existencia de la eritropoyetina como hormona para inducir la producción de eritrocitos fue predicha desde 1906 por Carnot & Deflendere pero fue hasta 70 años después cuando se logró aislar por primera vez (Inoue *et al*., 1995). En 1977, Miyake y colaboradores aislaron ocho mg de EPO pura a partir de la orina de pacientes con anemia aplástica (Bunn, 2013). Esto permitió caracterizar la hormona e iniciar su expresión heteróloga. La clonación de la EPO fue exitosa en 1985, cuando dos equipos de investigación, por separado, (Lin *et al.* 1985; Jacobs *et al.*, 1985) expresaron el gen de la eritropoyetina en células CHO. Tras este acontecimiento en 1989 apareció la "Epoetin alfa", la primera forma comercial de rhEPO producida en masa dentro de los Estados Unidos de América (Kalantar-Zadeh, 2017).

4.1.2. Panorama actual

Como se ha comentado previamente, la eritropoyetina es una glicoproteína compleja, por lo que requiere sistemas de expresión eficaces para su síntesis adecuada. Los modelos más utilizados para la producción de eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) son las células CHO, seguidas por las células renales de cría de hámsteres (BHK) y las células humanas de fibrosarcoma (HT1080) (Lee *et al*., 2012).

A primera vista, si se pensara en un sistema de expresión rápido se consideraría utilizar sistemas de expresión procariontes, como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, los cuales están ampliamente caracterizados y estandarizados. Sin embargo, estos sistemas no son viables porque carecen de la capacidad para realizar N-glicosilaciones (Sethuraman & Stadheim, 2006). Por otro lado, sistemas eucariontes unicelulares, como *Pichia pastoris* (también conocida como *Komagataella pastoris*) tampoco producen los resultados deseados, al presentar patrones de glicosilación distintos a los de las células de mamíferos. Se ha observado que *P. pastoris* hipermanosila la proteína, causando inmunogenicidad y, por ende, reduciendo su tiempo de vida en la sangre. Una respuesta a esta desventaja en el uso de levaduras es la humanización de cepas, un proceso de ingeniería genética donde se

apagan genes endógenos y se adicionan genes humanos buscando producir perfiles farmacocinéticos de la rhEPO semejantes a los de la eritropoyetina humana (Hamilton *et al*., 2003; Çelik *et al*., 2007).

A pesar del uso favorecido de células CHO para la producción comercial de rhEPO, los patrones de glicosilación de estas también difieren de los de la eritropoyetina humana (hEPO), ya que estos son específicos de la especie, del tipo de célula y del tipo de tejido, dando lugar a múltiples isoformas de la hormona (Lee et al., 2012). Una de las principales diferencias entre la rhEPO y la hEPO es la presencia de ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), que, al igual que la hipermanosilación, provoca una respuesta del sistema inmune humano y reduce el tiempo de vida de la hormona (Dammen-Brower et al., 2022).

Algunas estrategias que se han estudiado para promover la producción de isoformas más eficientes de la rhEPO son: el mejoramiento de su estructura mediante ingeniería proteica, el mejoramiento de los sistemas de expresión y la optimización de las condiciones de cultivo (Lee *et al*., 2012).

4.1.3. Producción en Pichia pastoris

Maleki y colaboradores diseñaron un sistema de producción de rhEPO utilizando *P. pastoris* X-33 como hospedero, clonaron el cDNA de la eritropoyetina en el vector pPICZαA bajo acción del promotor Paox1. En ese proyecto se logró obtener transformantes capaces de producir rhEPO a una tasa de 130-150 mg/L de cultivo cuando se estabilizaba el medio a un pH de 6.0 durante la fase de inducción con metanol. La purificación de la proteína se realizó mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel, consiguiendo una pureza del 80%. Finalmente, se utilizó el análisis por SDS-PAGE y Western blot para determinar el peso molecular de la rhEPO, lo que corroboró un peso molecular de 33 kDa (Maleki *et al*., 2010).

Continuando con los esfuerzos por conseguir mejores sistemas de producción en *P. pastoris*, Soyaslan & Calık propusieron mejorar el rendimiento mediante un sistema en lote con metanol y otro alimentado con sorbitol, además de un control de pH específico para cada fase del cultivo. Se utilizó *P. pastoris*-E17 Mut^+ en un cultivo en cuatro fases: una fase en lote con glicerol (GB), una segunda fase en lote alimentada con glicerol (GFB), una tercera fase de transición con metanol (MT) y, finalmente, una última fase de producción

Casa abierta al tiempo

alimentada con sorbitol (PP). Se observó que la mayor densidad celular y mayor tasa de producción de rhEPO se lograron cuando las fases GB y GFB se mantuvieron a pH de 5 y las fases MT y PP a un pH de 4.5, obteniéndose un rendimiento de 81.4 g/L de medio y una producción de rhEPO de 160 mg/ L de medio (Soyaslan & Çalık, 2011).

Los sistemas presentados logran un incremento considerable en las tasas de producción de rhEPO en *P. pastoris*, comparado con lo reportado previamente en la literatura: 5 mg/L (Maleki *et al*., 2010), un incremento de aproximadamente 30 veces sobre la capacidad inicial. Sin embargo, previo a establecer este hongo como el sistema predilecto de producción de rhEPO hay una serie de consideraciones que se tienen que hacer: en este caso, solamente se analizó el peso molecular de la hormona y su tasa de producción, más no se realizó un estudio para identificar el patrón de glicosilación de la rhEPO, el cual es el principal impedimento para adoptar estos sistemas de expresión. Como se mencionó previamente, *P. pastoris* tiende a hipermanosilar las proteínas, lo que da lugar a moléculas con un periodo de vida en sangre corto (Lee *et al*., 2012).

En respuesta a esta incertidumbre en el patrón de glicosilación de la rhEPO, Teh y colaboradores realizaron la caracterización de la proteína mediante la desglicosilación y análisis posterior por SDS-PAGE y Western blot. La síntesis heteróloga de la rhEPO se realizó en una cepa de *P. pastoris* X-33 transformada con el vector de expresión pPICZαA y un inserto que codifica la proteína de fusión rhEPO-His. La desglicosilación de la rhEPO se llevó a cabo con enzimas glicolíticas (PNGasas) y endoglicosidasas (Endo H). Se observó que las glicosilaciones variaban entre el 30 y el 70% del peso total de la eritropoyetina, patrón que no corresponde al peso canónico del 40%. Este incremento en el peso molecular de la hormona corresponde a la hipermanosilación y la hiperglicosilación, fenómenos ya mencionados que se presentan en levaduras. Sin embargo, también se observaron moléculas con un peso menor que el deseado, lo que indica que no se llevaron a cabo modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, sulfatación o sialilación de aminoácidos (Teh *et al*., 2011).

4.1.4. Producción en células humanas

Otra alternativa al uso de células CHO o BHK, es el uso de líneas celulares humanas. Un ejemplo de esto es el trabajo de Chin y colaboradores (2019) quienes utilizaron células

embrióticas de riñón 293 deficientes en *GLUL* (HEK293 GLUL$^{-/-}$) para la producción de rhEPO. El uso de estas células elimina la posibilidad de presentar estructuras no humanas como la adición de ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) o la Galactosa-alfa-1,3-galactosa (α-Gal) durante el proceso de glicosilación, en comparación con las células CHO que sí las presentan. Adicionalmente, las células HEK293 han demostrado ser un modelo humano de fácil manipulación, que permite una producción heteróloga estable y una síntesis rápida. En este estudio, aquellas células transfectadas con un vector bicistrónico que expresa GLUL y rhEPO alcanzaron una tasa de producción putativa de eritropoyetina de hasta 92,700 U/mL, o bien de 696 mg/L, durante un periodo de 10 días. La rhEPO resultante fue analizada por espectrometría de masas para determinar su patrón de glicosilación. En este análisis se encontró que los niveles de adición de ácido siálico se mantuvieron semejantes a los producidos por las células CHO. Por otro lado, no se observó la formación de estructuras Neu5Gc o α-Gal, produciéndose una isoforma de la eritropoyetina más aproximada a la estructura canónica encontrada en las células renales de humanos (Chin *et al*., 2019).

4.2. Sistemas de cultivo sólido con *Neurospora crassa*

A partir del año 2000, aumentó el interés por utilizar *N. crassa* para producir compuestos de interés mediante cultivo en sólido. Sin embargo, estos trabajos se han concentrado en la producción de enzimas (lipasas, proteasas, celulasas, entre otras) propias del hongo, y se ha mostrado un bajo interés en la aplicación de este sistema para la producción de proteínas recombinantes.

Debido a que no se ha intentado la producción de proteínas recombinantes por cultivo en medio sólido con *Neurospora*, a continuación, se presentan los estudios que más se acercan al sistema de producción propuesto en este trabajo. Estos nos permiten conocer las metodologías, rendimientos y flujos de trabajo al montar SSC.

4.2.1. Producción de invertasa

En 2024, Mora-Pérez y colaboradores evaluaron el crecimiento de *N. crassa* y la producción de invertasa bajo distintas condiciones de cultivo. Algunas de las condiciones evaluadas en este trabajo fueron las siguientes: 1) Tipo de cultivo: cultivo sólido con soporte inerte (SSC-PUF), con soporte natural (SSC-PS) y cultivo sumergido (SC). 2)

Concentración inicial de fuente de carbono (sacarosa): 1.5, 3 y 5% y 3) Relación de volumen del medio de cultivo por masa del soporte (VCM/MS): 5, 10 y 15 mL/g.

Utilizaron la cepa auxótrofa a histidina *N. crassa* FGSC#9717 (Δmus-51::bar+; mat A his-3). Utilizaron espuma de poliuretano (densidad de 17 kg/m^3) y aserrín de pino (tamaño de partícula de 1.19 a 2.38 mm) como soportes inertes y naturales, respectivamente. En ambos soportes adicionaron una fase líquida conformada por medio mineral Vogel enriquecido con sacarosa como fuente de carbono y con histidina, en una relación de 20 μg de histidina por cada 15 g de sacarosa.

En este estudio, se concluyó que los cultivos SSC-PUF y SSC-PS permitieron un mayor crecimiento del hongo y una mayor producción de la enzima invertasa que el cultivo SC. Observaron que los cultivos más eficientes fueron aquellos con una concentración inicial de fuente de carbono en el medio de 1.5% de sacarosa y recomiendan trabajar con una relación VCM/MS de 5 mL/g ya que no se observó una diferencia significativa entre las distintas condiciones de esta relación probadas.

4.2.2. Producción de proteasas

En 2020, Zheng y colaboradores realizaron un cultivo sólido para la producción de una enzima proteasa alcalina proveniente de una nueva cepa de *N. crassa* (CGMCC3088) y diseñaron un modelo matemático que predijera las condiciones óptimas de humedad, pH y temperatura para obtener la mayor cantidad de proteína soluble y la mayor actividad enzimática. En este estudio utilizaron okara, un subproducto del procesamiento de las habas de soja, como soporte natural y agua como fase líquida. Determinaron las siguientes condiciones óptimas de cultivo: 21 mL de agua por cada 10 g de okara seco, pH inicial de 5.0 y una temperatura de incubación de 30 °C. Adicionalmente, trabajaron con un tiempo de incubación de 72 h. En estas condiciones de cultivo lograron obtener una concentración de proteína soluble en el medio extracelular de 9.99 mg/g y una actividad enzimática de 1959.82 U/g.

4.2.3. Producción de celulasas y hemicelulasas

En 2009, Dogaris y colaboradores utilizaron la cepa *N. crassa* DSM 1129 para producir endoglucanasa, exoglucanasa, β-glucosidasa, xilanasa y β-xilosidasa. En este trabajo, compararon los efectos de dichas enzimas en la actividad enzimática en función de la

Casa abierta al tiempo

fuente de carbono (soporte natural), la humedad y el pH inicial. Los soportes que evaluaron fueron paja de trigo, salvado de trigo, mazorca de maíz (olote), tallo de sorgo y un soporte compuesto (mezcla de paja y salvado de trigo). Las condiciones de humedad fueron de 60, 70, 80 y 87.5% (p/p) y las de pH inicial fueron 4, 5, 6 y 7. Todos los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 2.5 g de masa seca del soporte adicionado con medio mineral Toyama como la fase líquida y fueron incubados con 1 mL de suspensión de conidios (5.8×10^7 con/mL).

Concluyeron que el sustrato natural, individual, que permitía una mayor actividad enzimática era la paja de trigo, sin embargo, la actividad enzimática aumentaba entre un 60-70% cuando se utilizaba una mezcla de paja y salvado de trigo en relación 25:5 (p/p). El pH inicial no afectó significativamente a la actividad enzimática de las enzimas exoglucanasa, xilanasa y β-xilosidasa, pero sí afectó a la de la endoglucanasa y la β-glucosidasa, presentando una mayor actividad enzimática a pH 5. Finalmente, la condición óptima de humedad inicial fue del 70%. Bajo estas condiciones lograron alcanzar la mayor actividad enzimática de cada enzima, sin embargo, estas las alcanzaron a diferentes tiempos de cultivo; a los dos días alcanzaron la mayor actividad de la exoglucanasa (1.08 U/g), a los 6 días alcanzaron la mayor actividad de la xilanasa (297.8 U/g) y a los 8 días alcanzaron la mayor actividad de la endogluconasa (492.8 U/g), β-glucosidasa (26.7 U/g) y β-xilosidasa (0.132 U/g).

Casa abierta al tiempo

5. Justificación

Los sistemas de producción de fármacos basados en células de mamíferos, como lo son las células CHO o BHK, se han conservado como los preferidos a nivel industrial debido a su capacidad de sintetizar proteínas con alta similitud a las encontradas en humanos. Sin embargo, estos modelos de producción traen consigo una serie de desventajas, como sus altos costos de producción, el riesgo de contaminación por virus o priones y la incapacidad para controlar los patrones de glicosilación (Pauwels et al., 2007). Se ha observado que las células CHO presentan distintas estructuras en los glucanos que son adicionadas en los sitos de glicosilación, resultando en la producción de isoformas de la misma proteína, cada una con actividad biológica o eficiencia distintas (Sethuraman & Stadheim, 2006). Estas desventajas pueden remediarse mediante el uso de otros sistemas de expresión.

En este proyecto se propone utilizar el hongo filamentoso *Neurospora crassa* como sistema de expresión heteróloga eficiente y accesible, tomando como modelo la eritropoyetina humana recombinante. Se eligió *N. crassa* debido a sus bajos requerimientos nutricionales (a diferencia de las células CHO, no requiere de medios adicionados con hormonas, vitaminas y factores de crecimiento y es capaz de crecer en presencia de solamente una fuente de carbono y minerales), su rápido crecimiento (al tener un ciclo de vida de entre 2 y 3 semanas), su genoma totalmente caracterizado y su galería de técnicas estandarizadas para su manipulación genética (Raju, 2009; Honda et al., 2020). Aunado a esto, el uso de un hongo filamentoso trae consigo los beneficios de bajos costos de producción, facilidad de escalamiento, estandarización de procesos industriales y altos rendimientos de producción y secreción de biomoléculas (Liu et al., 2023).

6. Hipótesis

Si se transforma *Neurospora crassa* con un vector de expresión con el gen de la eritropoyetina humana, se expresará la hormona recombinante.

Casa abierta al tiempo

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

1. Establecer a *N. crassa* como modelo de expresión heteróloga para la síntesis de proteínas glicosiladas.

7.2. Objetivos específicos

1. Diseñar *in-silico* un vector de expresión para la síntesis y secreción de eritropoyetina humana.
2. Construir *in-vitro* el vector diseñado.
3. Transformar *N. crassa* con el vector de expresión diseñado.
4. Producir eritropoyetina humana recombinante por cultivo en medio sólido.
5. Identificar la secreción de eritropoyetina humana recombinante.

8. Materiales y métodos

8.1. Diseño *in-silico*

Se utilizaron las bases de datos NCBI y Ensembl para obtener las secuencias de los genes de interés y el visualizador web Benchling para el diseño *in-silico* de oligonucleótidos, gen sintético y vector de expresión.

8.2. Manejo de cepas

A lo largo del proyecto se trabajaron con 2 microorganismos principales, *Escherichia coli* y *N. crassa*. *E. coli* se utilizó para la construcción del vector de expresión y para la creación de una galería biológica para conservar los genes y plásmidos de interés. Se seleccionaron las cepas TOP 10 y DH5α debido a que son cepas diseñadas para favorecer la incorporación y preservación de ADN exógeno (Kasap *et al.*, 2008). Adicionalmente, se trabajó con la cepa auxótrofa a histidina *N. crassa* #9717 perteneciente al *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC). En las secciones siguientes se detalla el manejo y uso de cada una de estas cepas.

8.2.1. Escherichia coli TOP 10 y DH5α

- Propagadas en medio Luria-Bertani e incubadas a 37 °C durante al menos 12 h.
- Conservadas en medio Luria-Bertani con glicerol al 40%, almacenadas a -20 °C.

8.2.1.1. Manejo de E. coli

El manejo de las cepas de *E. coli* TOP 10 y DH5α y sus correspondientes transformantes se llevó a cabo como se describe a continuación y el proceso es ilustrado en la figura 8.

1. Propagación de la cepa: se inocularon 100 µL del conservado en glicerol en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de caldo Luria-Bertani (LB) y se incubó con agitación (215 rpm) a 37 °C, durante 6-8 h.
2. Preparación de células ultracompetentes (Sección 6.9.1.).
3. Transformación de células por choque térmico (Sección 6.9.2.).
4. Obtención de cultivos puros: A partir de cada colonia aislada, se tomó un inoculo y se propagó por superficie en cajas de Petri con 30 mL de medio LB agar al 2% (p/v). Se incubaron a 37 °C durante 24 h.

5. Propagación en medio líquido: Se tomó un inoculo de cada cultivo por superficie y se sembró en matraces Erlenmeyer con caldo LB.
6. Preparación de conservados en glicerol: En tubos Eppendorf de 1.5 mL, se adicionó una parte de la suspensión de bacterias a una parte de glicerol al 80% (v/v) y se almacenaron a -20 °C.

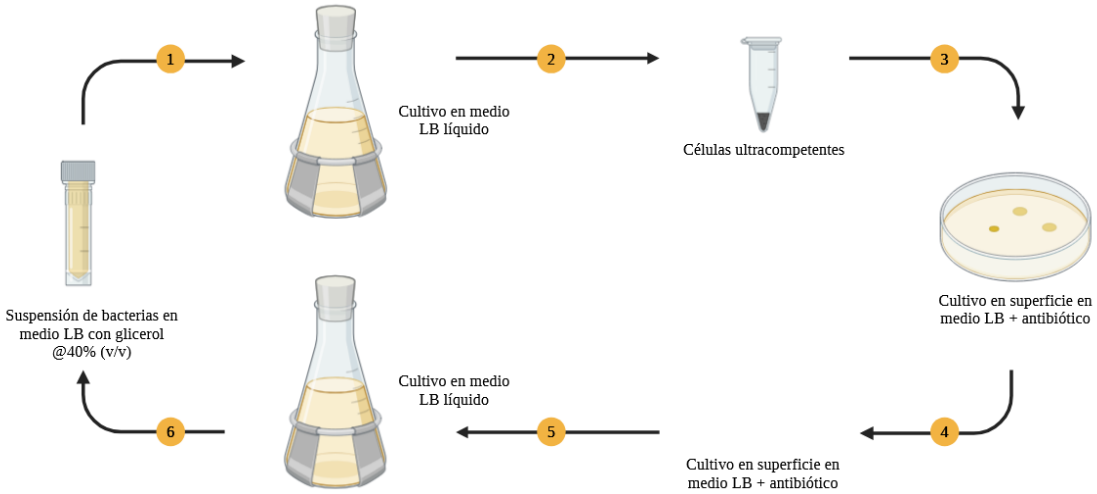


Figura 8. Ciclo de conservación y manejo de cepas de *E. coli*.

8.2.2. *Neurospora crassa* #9717

- Propagada en medio mineral Vogel (MMV) o medio Vogel agar (MVA) enriquecido con histidina al 0.02% (p/v). Incubación a 30 °C con ciclos de luz/oscuridad de 12 h.
- Conservada a largo plazo: En liofilizados en agrolita, almacenados a temperatura ambiente.
- Conservada a mediano plazo (6 meses): En cultivo en superficie en tubo inclinado con Medio Vogel Agar (MVA) enriquecido con histidina al 0.02% (p/v). Almacenada en refrigeración a 4 °C.
- Conservada a corto plazo (72 h): En suspensión de conidios en solución de Tween 80 al 0.05% (p/v). Almacenada en refrigeración a 4 °C.

8.2.2.1. Manejo de *N. crassa*

El manejo de la cepa de *N. crassa* #9717, y de la cepa transformante, se llevó a cabo como se describe a continuación y el proceso es ilustrado en las figuras 9 y 10.

1. Se preparó una suspensión de conidios a partir del liofilizado de agrolita, adicionando directamente a la ampolleta 3 mL de solución de Tween 80 al 0.05% (p/v).
2. Se inoculó en bisel sobre MVA enriquecido con histidina al 0.02% (p/v) con 100 μL de la suspensión de conidios previamente preparada (x 5 tubos).
3. Se incubaron los tubos durante 96 h a 30 °C con ciclos de fotoestimulación intermitente (luz blanca/oscuridad) de 12 h. De un tubo, se recolectaron las esporas con 10 mL de solución de Tween 80 al 0.05% (p/v) y el resto de los tubos fueron almacenados a 4 °C.
4. Se inocularon 5×10^7 conidios totales en un matraz Erlenmeyer con 50 mL de MVA enriquecido con histidina al 0.02% (p/v) (x 3 matraces).
5. Se incubaron los matraces durante 96 h a 30 °C con ciclos de fotoestimulación intermitente (luz blanca/oscuridad) de 12 h. Se recolectaron las esporas de dos matraces con 30 mL de solución de Tween 80 al 0.05% (p/v).
6. Se prepararon liofilizados.
7. Se transformó mediante electroporación de conidios.
8. Se sembraron las transformantes por estriado sobre medio MVA sin histidina.
9. Se obtuvo un cultivo monospórico y homocarionte.
10. A partir de una colonia aislada, se sembró en bisel sobre MVA (x 2 tubos, 12 tubos totales).
11. Se incubaron los tubos durante 96 h a 30 °C con ciclos de fotoestimulación intermitente (luz blanca/oscuridad) de 12 h cada uno. De un tubo, se recolectaron las esporas con 10 mL de solución de Tween 80 al 0.05 % (p/v) (x 6, 1 tubo por cepa); el resto de los tubos fue almacenado a 4 °C.
12. Se inocularon 5×10^7 conidios totales en un matraz Erlenmeyer con 50 mL de MVA (x 2 matraces por cepa)
13. Se incubaron los matraces durante 96 h a 30 °C con ciclos de fotoestimulación intermitente (luz blanca/oscuridad) de 12 h. Se recolectaron las esporas con 30 mL de solución de Tween 80 al 0.05% (p/v).
14. Se prepararon liofilizados.

Todos los ciclos de fotoestimulación se realizaron con una tira de led RGB con irradiancia de 0.1 a 1 mW/cm².

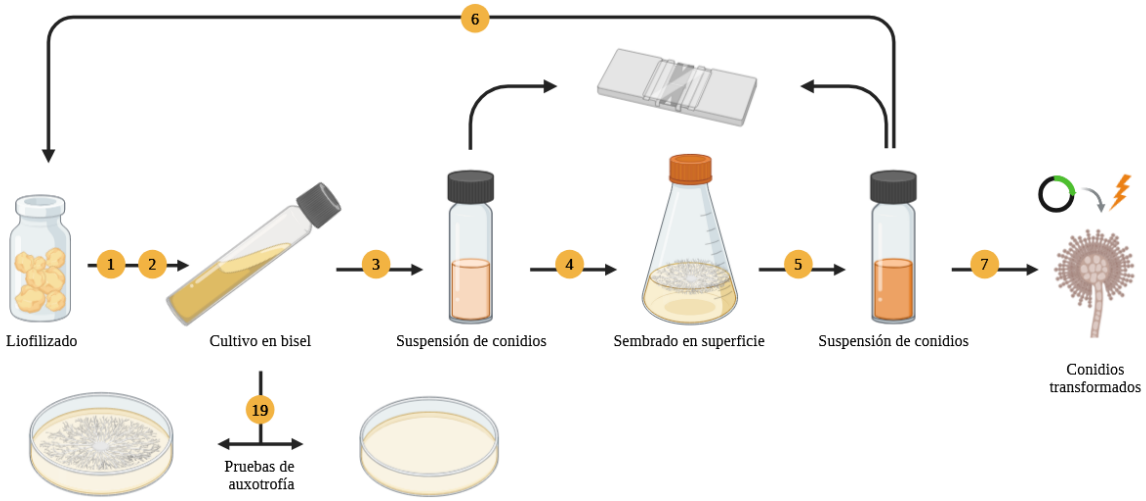


Figura 9. Ciclo de conservación y manejo de *Neurospora crassa* #9717 previo a la electroporación de conidios.

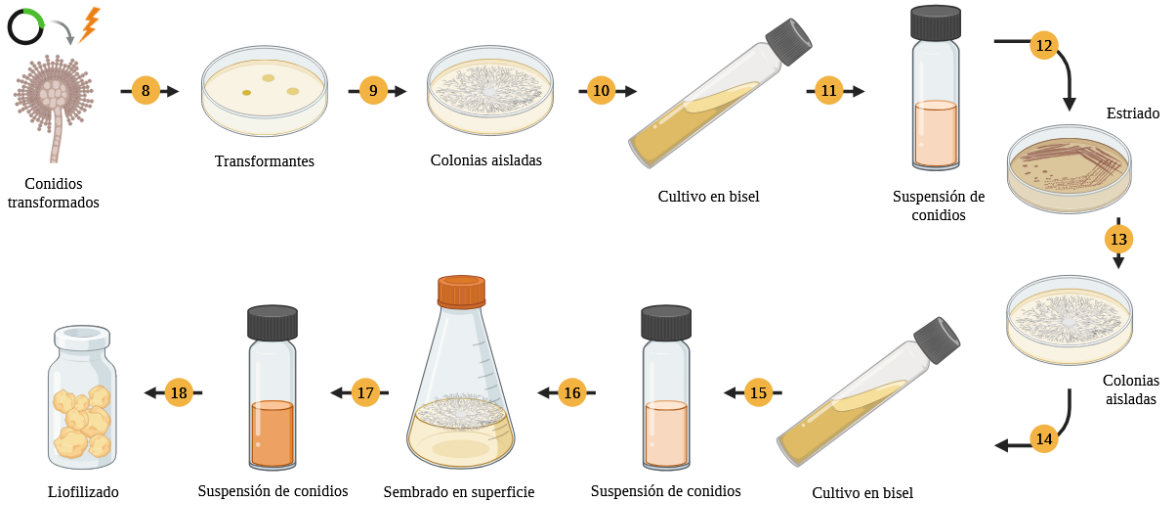


Figura 10. Ciclo de conservación y manejo de *N. crassa* posterior a la electroporación de conidios.

8.3. Conservación de genes y plásmidos

A continuación, se presenta una tabla con los métodos de conservación de cada uno de los genes y vectores utilizados en este proyecto.

Tabla 1. Conservación de piezas biológicas.

Pieza biológica	Método de conservación
Vector pMF272	En gliceroles de *E.coli* TOP 10
Secuencia SigGla – rhEPO – HisTag	En gliceroles de *E.coli* TOP 10
Construcción pMF272_SigGla – rhEPO – HisTag	En gliceroles de *E.coli* DH5α

8.4. Extracción de ADN

En esta sección se detallan los protocolos empleados para extraer ADN plasmídico (Mega Prep) y ADN genómico y fueron adaptados según lo descrito por Cerón-Moreno (2020). El Mega Prep se utilizó para la obtención de las piezas biológicas necesarias para construir el vector de expresión (Sección y 6.5), confirmar transformantes (Sección 6.6) y aislar el vector de expresión para la transformación de *Neurospora* (Sección 6.8). La extracción de ADN genómico se realizó para poder identificar cepas de *N. crassa* transformadas con el gen *SigGla – rhEPO – HisTag* mediante un análisis por PCR de punto final (Sección 6.8).

8.4.1. Mega Prep

1. Se sembraron 50 mL de medio LB líquido con 100 µL de suspensión de *E. coli.*
2. Se incubó a 28 °C con agitación, durante 20 h.
3. Se transfirieron alícuotas de 1 mL de la suspensión a tubos Eppendorf de 1.5 mL nuevos y estériles.
4. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 1-5 min.
5. Se desechó el sobrenadante.
6. Este proceso se repitió hasta agotar los 50 mL de la suspensión preparada.
7. Se resuspendió el pellet celular con 100 µL de agua estéril y 350 µL de TENS.
8. A cada tubo se le adicionó RNAsa a una concentración final de 100 µg/µL seguido de la adición de 100 µL de acetato de sodio 3 M, pH 5.2.
9. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 4 min.
10. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 mL.
11. Se adicionaron 600 µL de isopropanol frio y se mezcló por inversión.
12. Se refrigeró a -20 °C durante 30 min.
13. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 4 min.
14. Se desechó el sobrenadante.

15. Se adicionó 1 mL de etanol frio al 70%.
16. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 min.
17. Se desechó el sobrenadante.
18. Se repitió una segunda vez el lavado con etanol frio.
19. Se dejó secar el botón durante 10 min.
20. Se resuspendió en 100 µL de agua inyectable libre de nucleasas.
21. Se etiquetó y almacenó a -20 °C.

8.4.2. Extracción de ADN genómico de Neurospora crassa

1. Se sembraron 25 mL de Medio Mineral Vogel con 100 µL de una suspensión de conidios de *N. crassa*.
2. Se incubó con agitación (200 rpm) a 30 °C durante 48 h.
3. Se transfirieron alícuotas de 1 mL de la suspensión a tubos Eppendorf de 1.5 mL nuevos y estériles.
4. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min.
5. Se desechó el sobrenadante.
6. El proceso se repitió hasta obtener un botón celular de aproximadamente un tercio del volumen del tubo o hasta agotar el cultivo.
7. Se dejó secar la biomasa.
8. Se adicionaron perlas de vidrio en la superficie del botón celular.
9. Se congeló a -80 °C durante 15 min.
10. Finalizado el tiempo, se adicionaron 800 µL de buffer de extracción y se dio vórtex hasta homogeneizar.
11. Se incubó a 68 °C durante 30 min.
12. Se dio vórtex.
13. Se adicionaron 100 µL de acetato de potasio 2.5 M, con pH 4.2.
14. Se mezcló por inversión y se enfrió a -20 °C durante 30 min.
15. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min.
16. Se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos y a cada uno se le adicionó isopropanol frío en una relación de volumen 1:1.
17. Se dejó precipitar toda la noche.
18. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min.

19. Se desechó el sobrenadante.
20. Se resuspendió el pellet en 400 µL de Buffer Tris-EDTA pH 8.
21. Se adicionaron 40 µL de acetato de sodio 3 M, con pH 7.
22. Se incubó durante 1 h a 68 °C y 300 rpm.
23. Se adicionó 1 mL de etanol absoluto frío y se centrifugó a 1,500 rpm durante 5 min.
24. Se desechó el sobrenadante.
25. Se repitió el lavado con etanol.
26. Se resuspendió el ADN en 100 µL de Buffer Tris-EDTA pH 8.
27. Se adicionó 1 µL de RNAse a 10 mg/mL.
28. Se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente.
29. Se adicionaron 300 µL de buffer Tris-EDTA pH 8.
30. Se adicionaron 300 µL de CIA (Cloroformo-alcohol isoamílico, 24:1).
31. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min.
32. Se conservó la fase superior y se transfirió a un tubo nuevo.
33. Se adicionaron 60 µL de acetato de sodio 3 M y pH 5.2 y 700 µL de etanol absoluto frío.
34. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min.
35. Se desechó el sobrenadante.
36. Se dejó secar el pellet.
37. Se resuspendió en 30 µL de agua inyectable libre de nucleasas.

8.5. Amplificación y purificación de secuencias de interés

Con el objetivo de tener la cantidad suficiente del gen inserto y del vector de clonación, se solicitó la síntesis de gen *SigGla – rhEPO – HisTag* a Integrated DNA Technologies (IDT) y se extrajo pMF272 por la técnica de Mega Prep. Ambas piezas fueron posteriormente amplificadas por PCR punto final (Tabla 2 y 3) y purificadas por columna (Sección 6.5.3.).

8.5.1. Amplificación de genes por PCR de punto final

A continuación, se presentan los componentes y volúmenes de las reacciones llevadas a cabo.

Tabla 2. Componentes para cada reacción de PCR de punto final I.

Reacción/ Componente	Gen *SigGla – rhEPO – HisTag*	pMF272
dNTPs	1.5 µL	2 µL
Primer Forward[1]	1 µL	1 µL
Primer Reverse[2]	1 µL	1 µL
$MgCl_2$	1 µL	1 µL
ADN	1 µL	1 µL
Buffer	10 µL	10 µL
Polimerasa de ADN[3]	0.5 µL	0.5 µL
Agua	34 µL	33.5 µL
Volumen total	50 µL	50 µL

[1, 2] Revisar sección 7.1.3.
[3] *Phusion Hot Start II DNA Polymerase* de Thermo Scientific

A continuación, se presentan los programas del termociclador utilizados durante la amplificación de genes.

Tabla 3. Protocolos en el termociclador para cada reacción de PCR de punto final I.

Paso/Reacción	Gen *SigGla – rhEPO – HisTag*	pMF272
Desnaturalización inicial	98 °C, 5 min	98 °C, 5 min
Desnaturalización	98 °C, 30 s	98 °C, 30 s
Alineamiento	64 °C, 30 s	53 °C, 30 s
Extensión	72 °C, 30 s	72 °C, 4 min
Extensión final	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min
Número de ciclos	x34	x30

Temperatura en tapa del termociclador de 105 °C.

8.5.2. Electroforesis de ADN

Para visualizar todas las muestras de ADN en este proyecto, se utilizaron geles de 30 mL de agarosa al 0.8% y para la purificación de banda se utilizaron geles de 50 mL al 1.5%. En ambos casos, se aplicó un voltaje constante de 90 V durante un intervalo de tiempo de entre

50 y 75 min. Todas las muestras fueron teñidas con el marcador intercalante GelRed y se visualizaron con ayuda de un fotodocumentador (Bio-Rad Gel Doc EZ Imager).

8.5.3. Purificación de ADN

Para purificar los fragmentos amplificados por PCR punto final y separados por electroforesis en gel de agarosa, se utilizó y se siguió el protocolo establecido en el kit comercial "Zimoclean Gel DNA Recovery Kit" (Zimo).

1. Se visualizó el gel de agarosa bajo luz UV y se cortó la banda correspondiente.
2. Se transfirió cada banda por separado a un tubo de 2 mL.
3. A cada tubo se le adicionaron 0.5 μL de buffer ADB (Agarose Disolving Buffer).
4. Se incubó a 55 °C hasta disolución del gel (aproximadamente 20 min).
5. Se homogeneizó periódicamente mediante inversión suave.
6. Se prepararon y etiquetaron las columnas de purificación.
7. Se trasladó el contenido de cada tubo a una columna de purificación.
8. Se dejó reposar durante 1 min.
9. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min.
10. Se desechó el líquido.
11. Se repitió del paso 7 al paso 10 hasta agotar la suspensión de la banda disuelta.
12. Se adicionaron 70 μL de buffer de lavado a cada columna.
13. Se dejó reposar durante 1 min.
14. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min.
15. A cada columna se le adicionaron 10 μL de agua inyectable libre de nucleasas.
16. Se traspasó la columna a un tubo nuevo de 1.5 mL.
17. Se dejó reposar durante 5 min.
18. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min.
19. Se repitió el lavado con agua una segunda y tercera vez.
20. Se etiquetó el tubo con el volumen eluido y se almacenó a -20 °C.

8.6. Construcción del vector

8.6.1. In-Fusion

Se utilizó y se siguió el protocolo establecido en el kit comercial In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech – TaKaRa) para insertar el gen *SigGla – EPO – HisTag* en el vector de clonación pMF272.

1. Se prepararon soluciones del purificado del gen y el plásmido en concentraciones de 40 ng/µL y 20 ng/µL, respectivamente.
2. Se prepararon microtubos estériles para PCR.
3. A cada tubo se le adicionaron:
    a. 2 µL de la solución del vector.
    b. 2 µL de la solución de gen.
    c. 2 µL de la solución 5X In-Fusion HD Enzyme Premix.

    En el orden señalado.
4. Se completó hasta un volumen final de 10 µL con agua inyectable estéril, libre de nucleasas.
5. Se mezcló suavemente con una pipeta.
6. Se incubó durante 15 min a 50 °C.
7. Se traspasó rápidamente a hielo.
8. Inmediatamente, se utilizó la reacción para transformar *E. coli* DH5α por choque térmico (Sección 6.9.3.).

Tabla 4. Componentes de cada reacción In-Fusion.

Componente	Volumen	Concentración
5X In-Fusion HD Enzyme Premix	2 µL	NA
Plásmido	2 µL	20 ng/µL
Inserto	2 µL	40 ng/µL
Agua	Cbp 10 µL	NA

NA: No Aplica.

8.6.2. Confirmación de construcciones

Tras la transformación por choque térmico y la obtención de cultivos puros de las putativas transformantes, se extrajo ADN plasmídico de cada cepa para confirmar la construcción del vector.

Se utilizó la técnica de PCR punto final para identificar la presencia del gen *SigGla – rhEPO – HisTag* y con ello, confirmar una exitosa construcción del plásmido pMF272_SigGla – rhEPO – HisTag.

A continuación, se muestran tablas, indicando el contenido de las reacciones y el protocolo del termociclador utilizado.

Tabla 5. Componentes para cada reacción de PCR de punto final II.

Componente	Cantidad
Máster Mix[1]	5 µL
Primer: EPO_IF_2 F[2]	0.2 µL
Primer: EPO_IF_2 R[3]	0.2 µL
ADN molde	0.2 µL
Agua	4.4 µL
Volumen total	10 µL

[1] Enzima Master Mix (2X) Thermo Scientific™.
[2, 3]Revisar sección 7.1.3.

Tabla 6. Protocolos en el termociclador para cada reacción de PCR de punto final II.

Paso	Condiciones
Desnaturalización inicial	95 °C, 5 min
Desnaturalización	95 °C, 30 s
Alineamiento	64 °C, 30 s
Extensión	72 °C, 40 s
Extensión final	72 °C, 10 min
Número de ciclos	x34

8.7. Transformación de cepas de *Escherichia coli*

Para la preparación de células competentes se siguió el protocolo según lo descrito por Pérez-Pérez (2022) y los dos protocolos de transformación de *E. coli* por choque térmico se adaptaron según lo descrito por Chávez-Velazco (2022).

8.7.1. Preparación de células competentes

1. Se sembró *E. coli* en la superficie de una placa con medio LB.
2. Se incubó a 37 °C durante 10 h.
3. Se seleccionó una colonia aislada y se sembró en 25 mL de medio LB.
4. Se incubó a 37 °C durante 10 h.
5. Se tomaron 2.5 mL (preinóculo) y se sembraron 250 mL de medio LB.
6. Se incubó a 18 °C con agitación a 215 rpm hasta alcanzar una absorbancia de 0.5-0.6 a 600 nm.
7. Se colocó en un baño de hielo durante 10 min.
8. Se centrifugó en frío (4 °C) a 5,000 rpm durante 10 min.
9. Se resuspendió el botón celular en 80 mL de buffer TB frío.
10. Se incubó en hielo durante 10 min.
11. Se centrifugó en frío (4 °C) a 5,000 rpm durante 10 min.
12. El pellet celular se resuspendió en 20 mL de buffer TB más 1.4 mL de DMSO.
13. Se incubó en hielo durante 10 min.
14. El volumen final se repartió en alícuotas de 100 µL en tubos de 1.5 mL.
15. Los tubos fueron inmediatamente sumergidos en nitrógeno líquido.
16. Se almacenaron a -80 °C.

8.7.2. Transformación por choque térmico

1. Se descongelaron células competentes en frío.
2. Se adicionaron 10 µL de plásmido a cada tubo.
3. Se mezcló suavemente con una pipeta.
4. Se dejó incubar en hielo durante 30 min.
5. Se traspasaron los tubos rápidamente al termobloque a 42 °C.
6. Se incubó 1 min.
7. Se traspasaron rápidamente los tubos de regreso al hielo.
8. Se incubó durante 2 min.

9. Se adicionaron 800 μL de medio LB.
10. Se incubó a 37 °C durante 1 h.
11. Se sembró en placas con medio LB agar.

8.7.3. Transformación por choque térmico para In-Fusion

1. Se descongelaron células competentes en frío.
2. Se adicionó el contenido de una reacción de In-Fusion a un tubo de células.
3. Se mezcló suavemente con una pipeta.
4. Se dejó incubar en hielo durante 30 min.
5. Se traspasaron los tubos rápidamente al termobloque a 42 °C.
6. Se incubó durante 1 min.
7. Se traspasaron rápidamente los tubos de regreso al hielo.
8. Se incubó durante 2 min.
9. Se adicionaron 500 μL de medio SOC.
10. Se incubó a 37 °C durante 2 h.
11. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 4 min.
12. Se desecharon 300 mL del sobrenadante.
13. Se resuspendió el botón celular en el volumen sobrante.
14. Se sembró en placas con medio LB agar.

8.7.4. Selección de transformantes

1. En todos los experimentos de transformación por choque térmico se utilizó un control técnico (control negativo), que no recibió inserto, pero fue sometido al mismo tratamiento que las demás muestras.
2. El control se sembró por superficie en una caja de Petri con medio LB sin antibiótico y una con medio LB con antibiótico (el requerido en función del plásmido usado).
3. Las células que sí recibieron el inserto fueron sembradas por superficie en cajas de Petri con medio LB con antibiótico, distribuyendo 100 mL de la suspensión de células en cada caja hasta agotar la suspensión.
4. Se incubaron a 37 °C durante 12 h.
5. Selección:

	Control	Transformantes
Medio con antibiótico	No hay crecimiento (Control de calidad y condiciones de esterilidad)	Crecimiento pobre de células transformadas
Medio sin antibiótico	Crecimiento abundante (Muestra la viabilidad de las células)	No se realiza

6. Las células transformadas exitosamente fueron sembradas en placas nuevas con medio LB + antibiótico.
7. Se incubaron a 37 °C durante 12 h.
8. Se extrajo ADN plasmídico.
9. Se realizó la confirmación de transformación mediante un análisis de PCR punto final (Sección 6.8.).
10. Se analizaron las muestras en un gel de agarosa (Sección 6.5.2.).

8.8. Transformación de *Neurospora crassa*

8.8.1. Preparación de muestras

1. Se sembró en agar en tubos inclinados con medio Vogel agar + Histidina.
2. Se incubaron a 30 °C durante al menos 94 h.
3. A cada tubo se le adicionaron perlas de vidrio estériles y 10 mL de solución de Tween 80 al 0.05% (p/v).
4. Se mezcló en vórtex.
5. Se filtraron las perlas de vidrio y biomasa con ayuda de un embudo y tela Nytal.
6. La suspensión de conidios se recolectó en tubos Falcon de 50 mL estériles.
7. Se calculó la concentración de conidios mediante cuantificación en cámara de Neubauer.
8. Se almacenó la suspensión de conidios a 4 °C.

8.8.2. Electroporación de conidios

Protocolo adaptado por lo descrito por Cano-Domínguez y colaboradores (2008) y Colot y colaboradores (2006).

1. A partir de una suspensión de conidios de *N. crassa* #9717 se tomó una alícuota con 1.25×10^8 conidios totales y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
2. Se centrifugó a 5,000 rpm durante 30 segundos.
3. Se desechó el sobrenadante.
4. Se realizaron dos lavados con sorbitol.
    a. Se adicionaron 500 mL de sorbitol 1 M frío.
    b. Se centrifugó a 5,000 rpm durante 30 segundos.
    c. Se desechó el sobrenadante.
    d. Se repitió.
5. Tras los lavados, los conidios se resuspendieron en 40 µL de sorbitol 1 M.
6. Se adicionaron 10 µg del vector de expresión de la rhEPO.
7. La mezcla se incubó a 4 °C durante 30 min.
8. El contenido del tubo (50 µL) se transfirió a una celda de electroporación fría.
9. Se colocó la celda en el electroporador (Bio-Rad GenePulse Xvell) y se sometió a las siguientes condiciones: 1.5 kV, 600 Ω y 10 µF durante 5 milisegundos.
10. A la celda de electroporación se le adicionaron 950 µL de sorbitol 1 M frío y se mezcló con una pipeta.
11. El contenido de la celda se transfirió a un tubo de vidrio de 50 mL con 25 mL de la solución de recuperación líquida de Vogel.
12. Se incubó con agitación a 30 °C y 100 rpm durante 2 h.
13. Se transfirió la solución a un frasco de vidrio de 100 mL con 25 mL de agar de regeneración.
14. Se homogeneizó mediante agitación suave.
15. El contenido del frasco se vertió en cajas de Petri con medio CA.
16. Las cajas se incubaron a 27 °C durante al menos 24 h (hasta la aparición de colonias).

8.8.3. Confirmación de transformantes

La confirmación de transformantes se realizó por amplificación del gen *SigGla – rhEPO – HisTag,* de igual forma a lo realizado en la sección 6.6.2., con diferencia de que se utilizó como ADN molde el ADN genómico de las cepas transformadas de *Neurospora*.

8.9. Cultivo en medio sólido

Para la producción de eritropoyetina humana recombinante se montó cultivo en medio sólido con una cepa *N. crassa* EPO+. Los protocolos descritos a continuación se adaptaron según lo reportado por Mora-Pérez y colaboradores (2024).

8.9.1. Diseño experimental

Se analizaron los extractos extracelulares de la cepa nativa y transformada en distintos tiempos de cultivo (0, 24, 48, 72 y 96 h). Posteriormente, se cuantificó la proteína extracelular total para realizar un análisis del secretoma mediante SDS-PAGE.

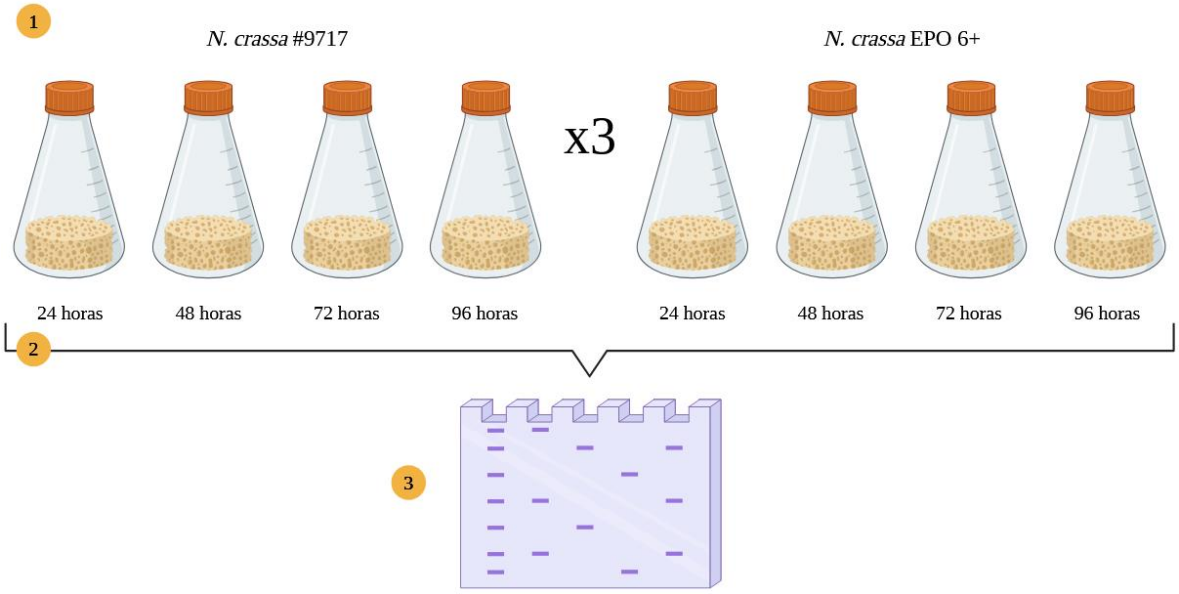


Figura 11. Diagrama de los cultivos y del flujo de trabajo: 1. Cultivo en estado sólido, 2. Preparación de muestras y 3. Análisis por SDS-PAGE.

8.9.2. Acondicionamiento de soporte sólido

1. Se cortaron discos (diámetro de 7 cm y altura de 2 cm) de espuma de poliuretano (EPU) con densidad de 17 kg/m^3.
2. Los discos EPU se lavaron dos veces con agua desionizada caliente (67 °C).
3. Posteriormente se lavaron una vez con agua desionizada a temperatura ambiente.
4. Se dejaron secar en horno a 60 °C durante 24 h.
5. Se pesaron los discos EPU y se registró el peso.
6. Se calculó el volumen requerido de medio de acuerdo con el peso de los discos EPU; por cada gramo de EPU, se adicionaron 5 mL de medio mineral Vogel (MMV) con sacarosa al 10% (p/v)

8.9.3. Acondicionamiento de unidades experimentales

1. Se lavaron y etiquetaron matraces Erlenmeyer (ME) de 250 mL.
2. Se introdujo un disco EPU previamente pesado por ME.
3. Se adicionó el 50% del volumen total de medio al ME.
    a. Se tomó el volumen con una pipeta y se vació el MMV sobre el disco EPU asegurando la absorción del MMV de manera uniforme sobre toda la superficie del disco.
4. Se esterilizó a 121 °C durante 15 min

8.9.4. Inoculación de unidades experimentales

1. Se colocó el 50% del MMV sobrante en tubos de ensayo de 20 mL con tapa.
2. Se esterilizaron a 121 °C durante 15 min.
3. A cada tubo se le agregó un volumen de suspensión correspondiente a un inóculo de 2.61×10^6 conidios.
4. Se mezcló suavemente con una pipeta.
5. A cada unidad experimental se le adicionó el contenido de tubo de ensayo (MMV inoculado).

8.9.5. Incubación de unidades experimentales

1. Los ME inoculados fueron incubados a 30 °C hasta por 120 h, con fotoestímulo intermitente en ciclos de 12 h de luz blanca: 12 h de oscuridad.

8.9.6. Recuperación de extractos extracelulares

1. Se rotularon discos de papel filtro Whatman 41 con un tamaño de poro de 90 mm.
2. Se dejaron secar en estufa a 60 °C durante 24 h.
3. Se colocaron en un desecador durante 15 min.
4. Posteriormente, se pesaron los discos individualmente y se registró el peso de cada uno.
5. Se montó el equipo de filtración.
6. A cada ME se le adicionaron 20 mL de agua desionizada.
7. Se colocó un disco de papel filtro seco, rotulado y previamente pesado en el equipo de filtración (en el embudo Buchner).
8. Con unas pinzas limpias se removió el disco EPU de un ME, asegurando no dejar biomasa ni MMV fermentado dentro del ME.

9. Se colocó el disco EPU sobre el papel filtro y se prendió la bomba de vació.
10. Se auxilió la filtración aplicando presión sobre el EPU con ayuda de una varilla de vidrio limpia.
11. Se apagó la bomba de vacío y se desmontó el matraz Kitasato.
12. Se recolectó el filtrado en un tubo Falcon de 50 mL estéril.
13. Se registró el volumen recuperado.
14. Se repitió el procedimiento con las unidades experimentales correspondientes.
15. Se centrifugaron los extractos a 3,500 rpm durante 10 min. con refrigeración a 4 °C.
16. Posteriormente se transfirieron los extractos a tubos nuevos, decantando el extracto extracelular
17. La biomasa residual en los tubos Falcon se resuspendió en 5 mL de agua desionizada y se regresó al disco EPU filtrado correspondiente.

8.9.7. Cuantificación de biomasa por gravimetría

1. Posterior a la recuperación de los extractos extracelulares, se colocó el disco EPU fermentado con su papel filtro en una caja de Petri de vidrio (sin tapa).
2. Adicionalmente, se lavó el micelio del ME y del tubo Falcon, y se vertió su contenido sobre el disco EPU fermentado correspondiente.
3. Se secaron el disco EPU fermentado y el papel filtro a 60 °C durante 24 h.
4. Se pesó la masa seca de los discos EPU fermentados, junto con su filtro correspondiente.
5. Se calculó la biomasa.

8.9.8. Análisis de pH

1. Inmediatamente tras la recuperación de los extractos extracelulares, se midió el pH con ayuda de un potenciómetro (Bante PHS-3BW).

8.9.9. Cuantificación de proteína extracelular por método de Bradford

Se adaptó a partir de lo establecido por el protocolo “Bio-Rad Protein Assay”

1. Una vez recolectado el extracto extracelular de todos los ME, se prepararon las diluciones siguientes utilizando agua desionizada:

Muestra según tiempo de extracción (h)	Factor de dilución (FD)
0	1
24	5
48	10
72	20
96	20
120	40

2. Se etiquetaron tubos de ensayo limpios (triplicados para cada muestra).
3. A cada tubo de ensayo se le adicionaron 800 µL de la muestra (dilución correspondiente).
4. A cada tubo se le adicionaron 200 µL de reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate)
5. Se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5 min.
6. Se agitaron individualmente utilizando un Vórtex.
7. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800) a una longitud de onda de 595 nm.
    a. Blanco: 800 µL de agua destilada + 200 µL de reactivo de Bradford
    b. Estándar: 400 µL de BSA + 400 µL de agua destilada + 200 µL de reactivo de Bradford.

8.10. Expresión e identificación de secreción de rhEPO por SDS-PAGE

Se analizaron los extractos extracelulares obtenidos de cultivos sólidos de las cepas *N. crassa* #9717 y *N. crassa* EPO 6+.

8.10.1. Preparación de muestras

1. Posterior a la cuantificación de proteínas totales extracelulares se transfirieron alícuotas correspondientes a 60 µg de proteínas totales a tubos Eppendorf de 1.5 mL.
2. A cada tubo se le adicionó una solución de ácido tricloroacético al 20% en acetona, en una relación volumétrica de 1:1.

3. Los tubos se almacenaron a -20 °C durante 12 h.
4. Se centrifugó a 10,000 rpm con refrigeración a 4 °C durante 10 min.
5. Se desechó el sobrenadante.
6. Se realizaron dos lavados con acetona.
    a. Se adicionó 1 mL de acetona al 80% (v/v) fría.
    b. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min.
    c. Se desechó el sobrenadante.
    d. Se repitió una segunda vez.
7. Se realizó un último lavado con acetona al 100%.
8. Se desechó el sobrenadante.
9. A cada tubo se le adicionaron 20 µL de buffer de carga sin azul de bromofenol.
10. Se re suspendió el pellet de proteínas con ayuda de una pipeta.
11. Los tubos se almacenaron a -20 °C durante, al menos, 12 h.

8.10.2. Preparación de geles de poliacrilamida

1. Se prepararon geles de poliacrilamida con un espesor de 1 mm con base en las siguientes indicaciones:
    a. Región separadora (al 12%):

Componente	Volumen
Agua mili Q	4.28 mL
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	3.29 mL
SDS al 10%	130 µL
Acrilamida/Bisacrilamida al 30% (Bio-Rad)	5.2 mL
Persulfato de amonio al 20%	65 µL
TEMED (Bio-Rad)	13 µL

b. Región concentradora (al 5%):

Componente	Volumen
Agua mili Q	3.4 mL
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	644.4 µL
SDS al 10%	50.7 µL
Acrilamida/Bisacrilamida al 30% (Bio-Rad)	844.6 µL
Persulfato de amonio al 20%	25.4 µL
TEMED (Bio-Rad)	20.21 µL

8.10.3. Electroforesis

1. Se corrieron los geles a 90 Volts durante 15 min y posteriormente a 120 Volts durante 60-90 min.

8.10.4. Tinción y visualización de geles

1. Finalizada la electroforesis, los geles, aun en los moldes de vidrio, fueron enjuagados con agua desionizada.
2. Se retiraron los geles de los moldes y cada gel fue colocado, por separado, en un contenedor de plástico de 40 × 30 × 5 cm.
3. Previo a la tinción, los geles fueron incubados en solución fijadora (hasta cubrir el gel), durante 30 min con agitación.
4. Posteriormente, se realizaron lavados con agua desionizada.
    a. Se desechó la solución fijadora.
    b. Se adicionó agua destilada hasta cubrir el gel.
    c. Se incubó durante 10-15 min con agitación.
    d. El proceso se realizó 5 veces en total.
    e. Se desechó el agua desionizada.
5. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie durante 4.5 h con agitación y fueron visualizados en un fotodocumentador (Bio-Rad Gel Doc EZ Imager).

8.11. Reactivos y medios de cultivo

8.11.1. Medios de cultivo

Medio Luria-Bertani (LB) bajo en sal (Miller, 1972)

Componente	Cantidad
Bactotriptona	1% (p/v)
NaCl	0.5% (p/v)
Extracto de levadura	0.5% (p/v)
***Agar bacteriológico**	2% (p/v)

*Adicionar en caso de desear medio sólido

Medio SOC (Hanahan, 1983)

Componente	Cantidad
Bactotriptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0.5 g
KCl	0.18 g
$MgCl_2$ (1 M)	10 mL
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1 M)	10 mL
***Glucosa (2 M)**	10 mL
Agua desionizada	c.b.p. 1 L
****Agar bacteriológico**	20 g

* La solución de glucosa se esteriliza aparte y se adiciona previo a su uso
**Adicionar en caso de desear medio sólido

Medio Mineral Vogel (MV) (Vogel, 1956)

Componente	Concentración
Sales Vogel	2% (v/v)
Sacarosa	1.5% (p/v)
***Agar bacteriológico**	1.5% (p/v)
****Histidina**	0.02% (p/v)

*Solo para cultivo sólido, se convierte en Medio Vogel Agar (MVA)
**Solamente para el cultivo de cepas auxótrofas a histidina

Medio Modificado Vogel (MMV)

Componente	Concentración
Sales Vogel	13.4% (v/v)
Sacarosa	10% (p/v)
***Histidina**	0.14% (p/v)

*Solamente para el cultivo de cepas auxótrofas a histidina

Sales Vogel (50x)

Componente	Cantidad
$Na_3C_6H_5O_7$ $5H_2O$	150 g
KH_2PO_4	250 g
NH_4NO_3	100 g
$MgSO_4$ $7H_2O$	10 g
$CaCl_2$ $2H_2O$	5 g
Sol. de elementos traza (ver a continuación)	5 mL
Sol. de biotina a 0.1 mg/mL	2.5 mL
Agua desionizada	c.b.p. 1 L

Diluir las sales lentamente con agitación constante, por separado y en el orden dado, en 750 mL de agua destilada. Adicionar 2 mL de cloroformo como agente conservador y aforar a 1 L.

Solución de elementos traza

Componente	Concentración
Ácido cítrico H_2O	5% (p/v)
$ZnSO_4$ $7H_2O$	5% (p/v)
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ $6H_2O$	1% (p/v)
$CuSO_4$ $5H_2O$	0.25% (p/v)
$MnSO_4$ H_2O	0.05% (p/v)
H_3BO_3	0.05% (p/v)
Na_2MoO_4 ·H_2O	0.05% (p/v)

Solución de recuperación Vogel (Colot *et al*., 2006)

Componente	Cantidad
Sales Vogel 50x	20 mL
Extracto de levadura	2% (p/v)

Agar de recuperación – Adaptado de Davis & De Serres (1970)

Componente	Concentración
Sales Vogel (1x)	2% (v/v)
Sorbosa	2% (p/v)
Sorbitol	1 M
Fructosa	0.05% (p/v)
Glucosa	0.05% (p/v)
Agar bacteriológico	1% (p/v)

Se prepararon y esterilizaron dos soluciones por separado, que se mezclan previo a su uso. Solución 1: Sorbosa, sorbitol y agar. Solución 2: Vogel, fructosa y glucosa.

Medio CA – Adaptado de Davis & De Serres (1970)

Componente	Concentración
Sales Vogel (1x)	2% (v/v)
Sorbosa	2% (p/v)
Fructosa	0.05% (p/v)
Glucosa	0.05% (p/v)
Agar bacteriológico	1% (p/v)

Se prepararon y esterilizaron dos soluciones por separado, que se mezclan previo a su uso. Solución 1: Sorbosa y agar. Solución 2: Vogel, fructosa y glucosa.

8.11.2. Para extracción de ADN

CIA (cloroformo alcohol isoamílico)

Componente	Concentración
Cloroformo	24 partes
Alcohol isoamílico	1 parte

TENS

Componente	Concentración
EDTA (pH 8)	1 mM
Tris-HCl	10 mM
NaOH	0.1 N
SDS	0.5% (p/v)

Buffer Tris-EDTA

Componente	Concentración
EDTA	1 mM
Tris-HCl	10 mM 1:1

pH 8

8.11.3. Para preparar células competentes

Buffer TB

Componente	Concentración
Pipes	10 mM
$CaCl_2$	15 mM
KCl	250 mM
$MnCl_2$	55 mM

pH 6.7

8.11.4. Para SDS-Page

Buffer de carga

Componente	Concentración
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	1.25 mL
Glicerol	2.5 mL
SDS al 10%	2 mL
Azul de bromofenol al 0.5%	0.2 mL
Agua milli Q	3.55 mL

Buffer de corrida

Componente	Concentración
Tris base	30.3 g/L
Glicina	144 g/L
SDS	10 g/L

Disolver en agua mili Q.

Solución fijadora

Componente	Concentración
Etanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

Disolver en agua mili Q.

Solución de tinción (Blue Silver Coomassie)

Componente	Concentración
H_3PO_4	10 % (p/v)
$(NH_4)_2SO_4$	10 (p/v)
Metanol	20% (v/v)
***Coomassie**	0.12 (p/v)
Agua milli Q	c.b.

*Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad)

Solución de lavado

Componente	Concentración
EtOH	35% (v/v)

9. Resultados y discusión

9.1. Diseño *in-silico*

Para la producción de rhEPO se decidió crear una proteína de fusión, en la que se adiciona a la eritropoyetina una señal de secreción en su extremo N-terminal y una cola de histidinas en su extremo C-terminal. Al gen codificante de esta nueva proteína de fusión se le llamó gen *SigGla – EPO – HisTag*. Se decidió esta estrategia debido a que la fusión de proteínas recombinantes a secuencias de secreción es una técnica ampliamente utilizada en la biología sintética la cual permite la purificación de la proteína sin necesidad de lisis celular. En *N. crassa*, esta técnica se ha utilizado desde finales del siglo pasado, como reportan Rasmussen-Wilson y colaboradores (1997), aunque actualmente sigue vigente en la investigación de vanguardia como lo demuestra el trabajo de Havlik y cobradores (2017).

9.1.1. Biobricks

9.1.1.1. SigGla

La señal de secreción utilizada, a la cual se le llamó SigGla, corresponde a la fracción del gen endógeno Gla-1 que codifica los primeros 70 aminoácidos de la glucoamilasa-1, tal como se observa en la Figura 12. Se trabajó con este gen debido a las altas tasas de secreción constitutiva que ofrece, ya que, bajo condiciones nativas, la glucoamilasa-1 representa el 17% de las proteínas extracelulares (Havlik et al., 2017).

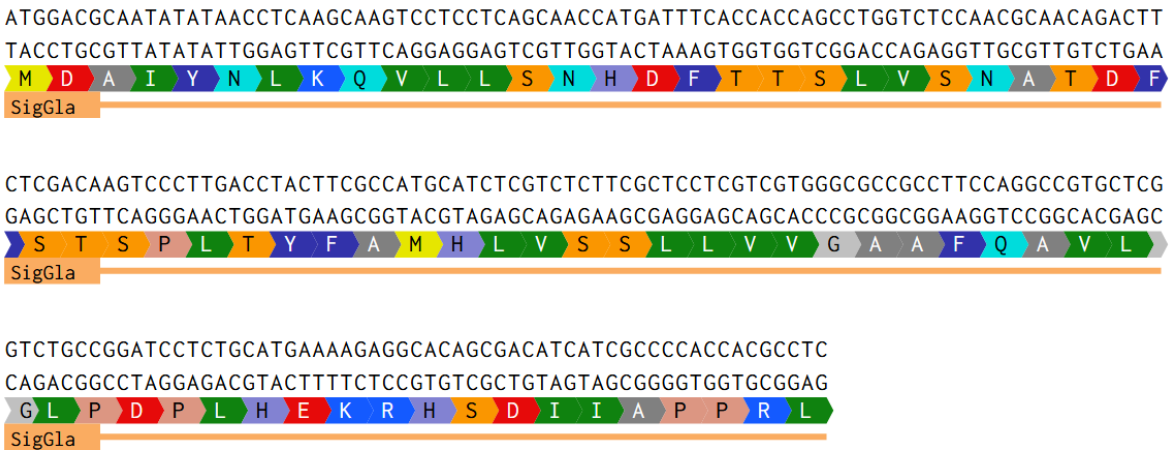


Figura 12. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos correspondiente al péptido señal de la glucoamilasa-1 con una longitud de 225 pb.

9.1.1.2. EPO

Para la producción de proteínas recombinantes, se han empleado diferentes organismos (hosts), entre los que podemos destacar a plantas, bacterias, hongos, células de insectos y de mamíferos (Elliott *et al.*, 2009). Particularmente, la EPO es producida por células CHO, sin embargo, la levadura *P. pastoris* ha sido empelada con éxito en la producción de esta hormona (Çelik *et al*., 2007). Para nuestro estudio, hemos empleado el gen *EPO* humano libre de intrones, con la finalidad de evitar el empalme alternativo del ARN, permitiendo la inmediata síntesis de la EPO funcional en el hongo *N. crassa* (Figura 13).

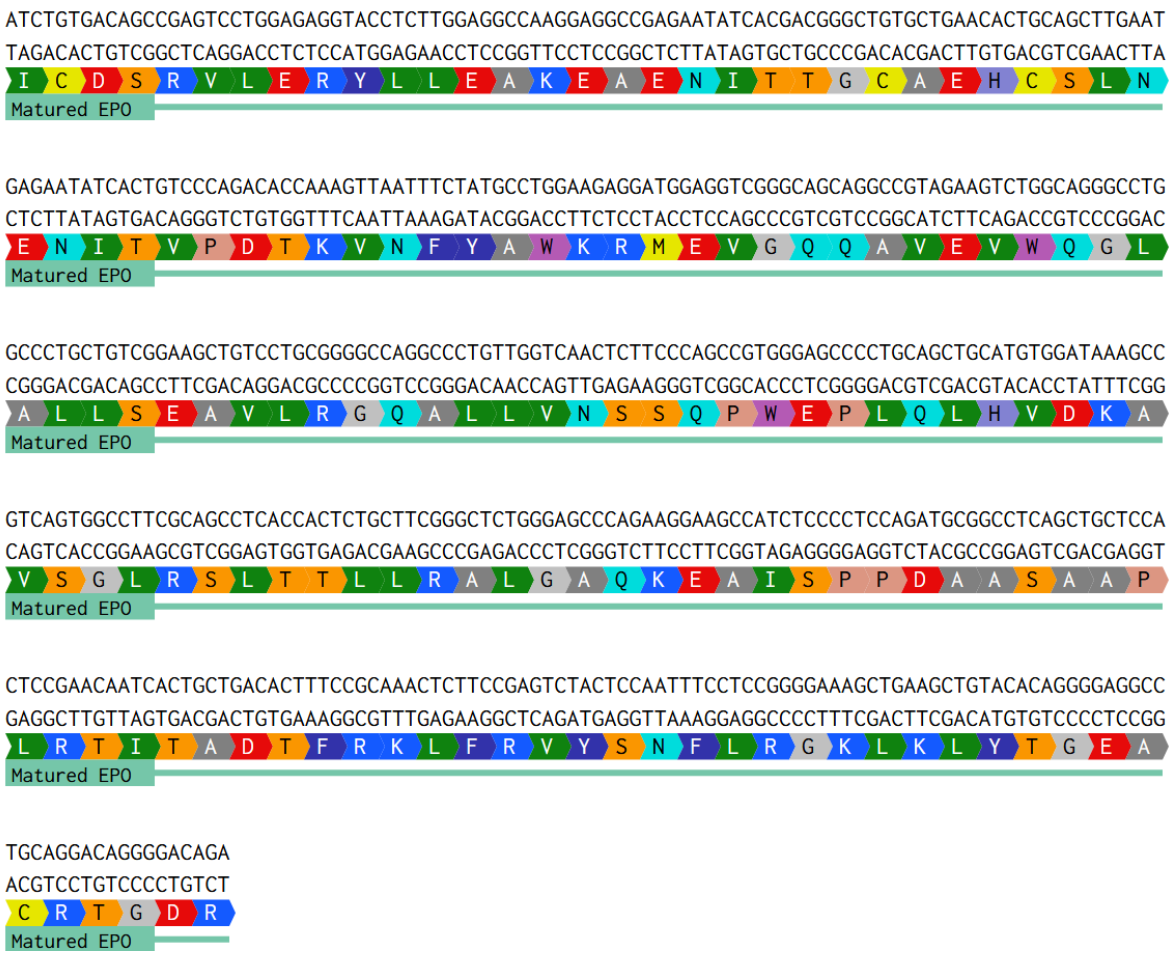


Figura 13. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos correspondiente a la eritropoyetina humana madura con una longitud de 483 pb.

9.1.1.3. pMF272

Se seleccionó el vector de clonación pMF272 debido a que: 1) permite su clonación en bacterias 2) favorece la rápida replicación del plásmido por acción del sitio de origen a la replicación (ORI) ColE1/pMB1/pBR322/pUC, 3) permite la selección de transformantes de bacterias por resistencia a ampicilina (AmpR), 4) permite la transfección guiada al locus

Casa abierta al tiempo

his-3´ de *N. crassa*, 5) permite la selección de cepas de *N. crassa* transformadas, mediante la auxotrofía a histidina y prototrofía y 6) permite la regulación del gen de interés bajo acción del promotor endógeno regulado por luz *Pccg-1*. Otra característica de este vector, pero que no fue aprovechada durante este trabajo, es la capacidad de expresar la proteína verde fluorescente (sGFP) (Ao *et al*., 2018; Sun *et al.*, 2011). Este vector ha sido empleado para estudios de localización subcelular de proteínas (Cano-Domínguez *et al.*, 2019), así como para la producción heteróloga de un fragmento de un anticuerpo humano (Havlik *et al*., 2017).

En las figuras 15 y 16 se muestran las regiones de hibridación de los oligonucleótidos utilizados para la linealización y amplificación del vector por PCR inversa de punto final.



Figura 14. Mapa genético del plásmido pMF272.

Casa abierta al tiempo

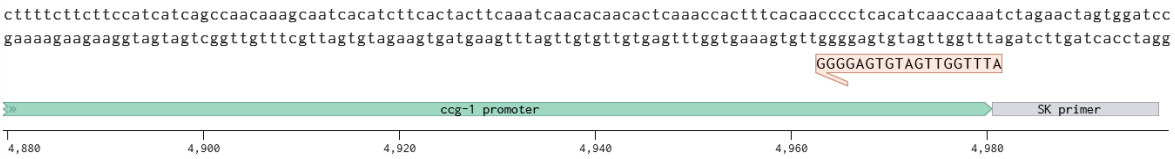


Figura 15. Región y secuencia del plásmido pMF272 donde hibrida el oligo pMF272 R.

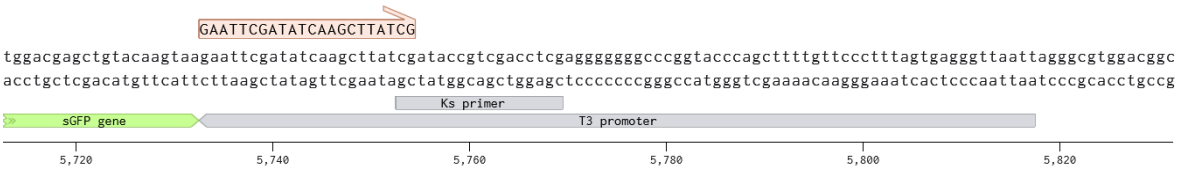


Figura 16. Región y secuencia del plásmido pMF272 donde hibrida el oligo pMF272 F.

9.1.2. Diseño del gen sintético

9.1.2.1. Gen SigGla – EPO – HisTag

En la figura 17 se muestra la secuencia de nucleótidos correspondiente al gen *SigGla – EPO – HisTag* y la secuencia de aminoácidos que codifican a la proteína de fusión, deseñada. Sin embargo, la secuencia mostrada no es la secuencia de la proteína secretada ya que la región correspondiente al péptido señal (subrayada en naranja) es removida durante el procesamiento de la proteína en el retículo endoplasmático previo a su secreción, resultando en una proteína que contiene únicamente a la rhPEO y a la cola de histidinas en el extremo C-terminal (Keenan, 2001).

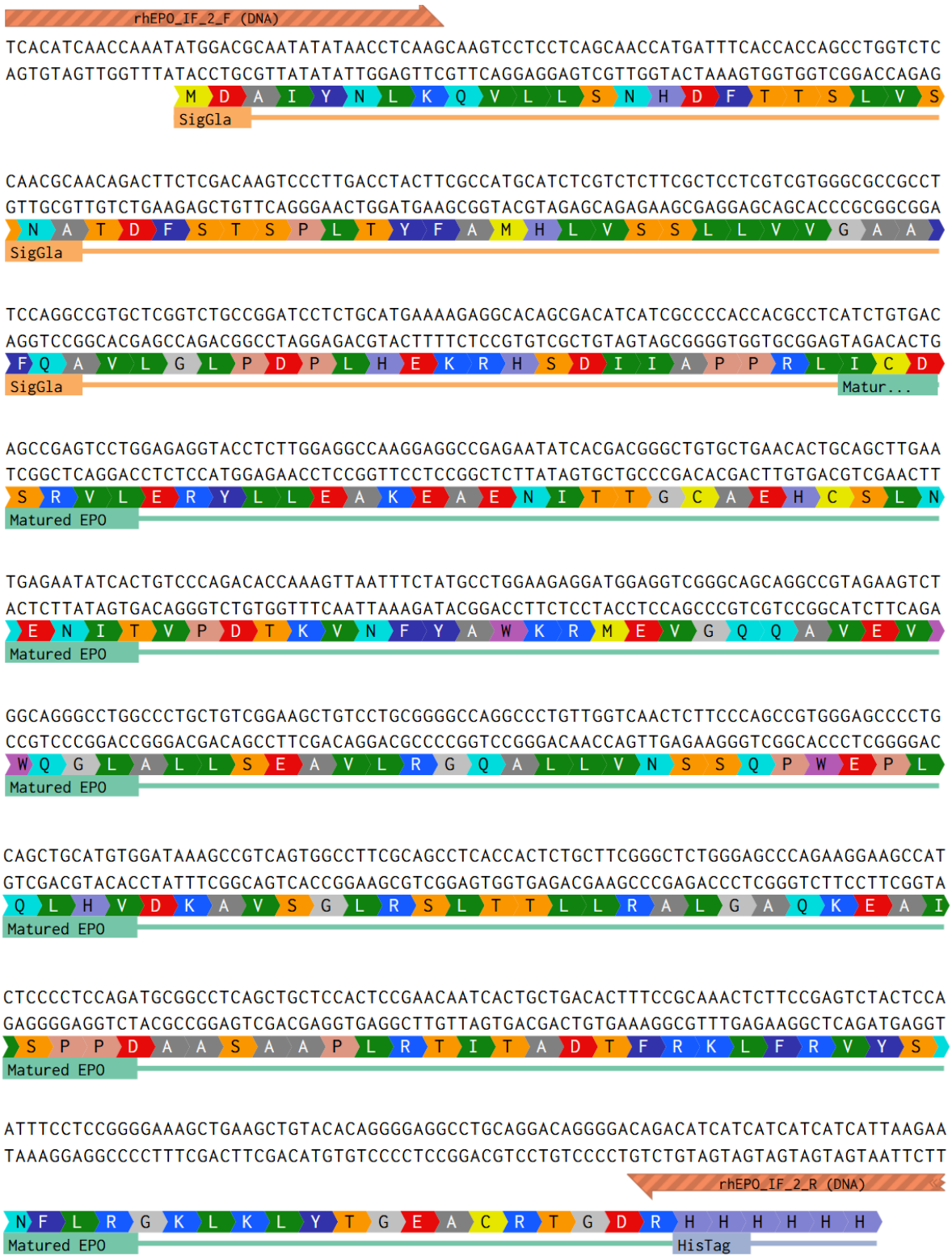


Figura 17. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos correspondientes al gen *SigGla – EPO – HisTag* con una longitud de 726 pb.

9.1.3. Diseño del vector de expresión

El gen *SigGla – EPO – HisTag* fue clonado en el vector pMF272 bajo acción del promotor inducible por luz, *Pccg-1*. Esto permitió la inducción de la producción de la proteína por fotoestimulación durante el SSC.

Para lograr este objetivo, llevamos a cabo una novedosa técnica de clonación, llamada In-Fusion. Esta técnica, permite clonar múltiples fragmentos de ADN en un vector de clonación durante una sola reacción. Adicionalmente, elimina la necesidad de emplear enzimas de restricción o ligasa, ya que esta se basa en la actividad de la DNA polimerasa del virus vaccinia, la cual, también presenta actividad exonucleasa 3'->5'. Esto permite la generación de sitios cohesivos sobresalientes, permitiendo la clonación de los fragmentos de interés en un vector de clonación por recombinación ("In-Fusion ® Cloning: Accuracy, Not Background," 2018).

En las figuras 19 y 20 se muestran las regiones del vector donde ocurre la clonación del gen por la técnica In-Fusion.

Casa abierta al tiempo

9.1.3.1. pMF272_SigGla-rhEPO-HisTag

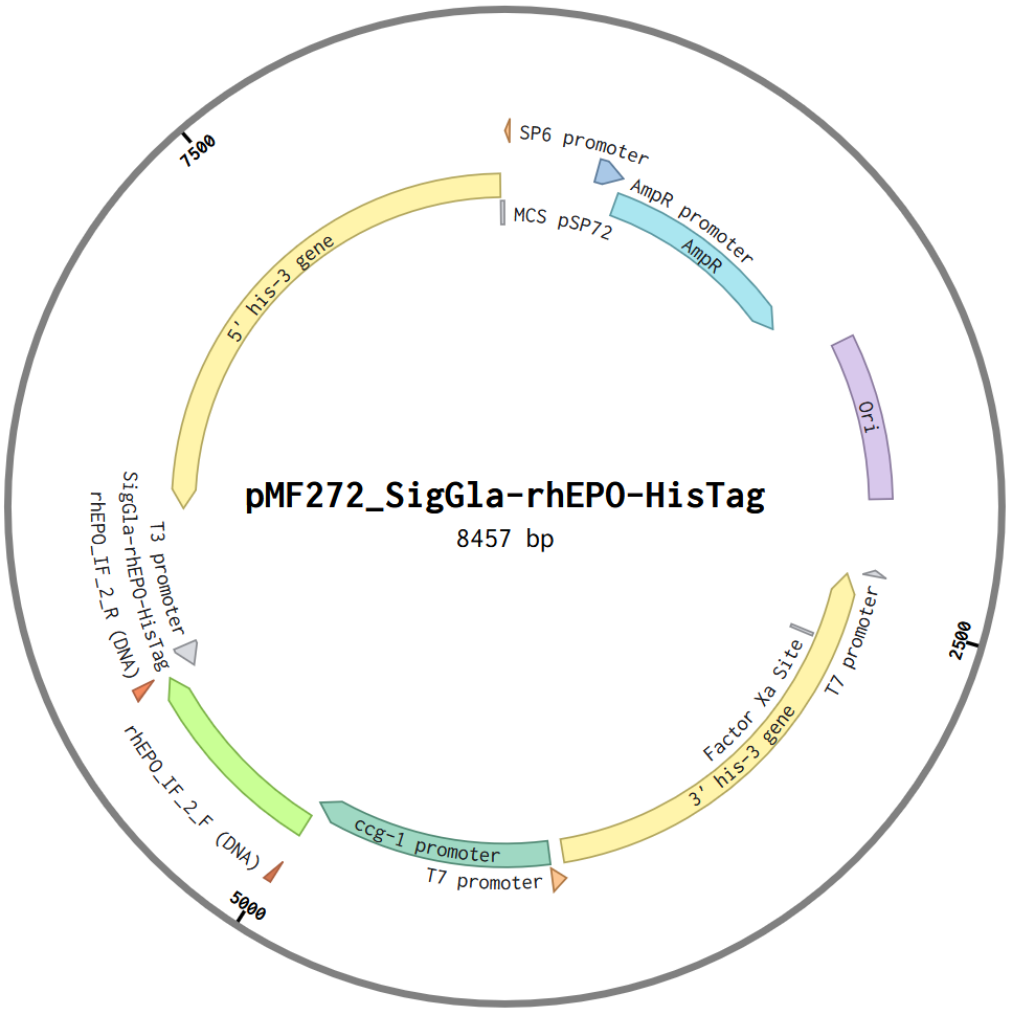


Figura 18. Mapa genético del plásmido pMF272_SigGla – rhEPO – HisTag.

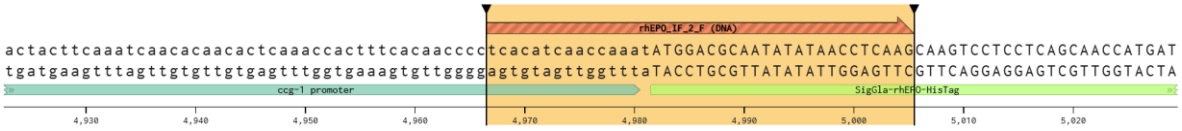


Figura 19. Región y secuencia de la construcción donde se lleva a cabo la reacción de In-Fusion.

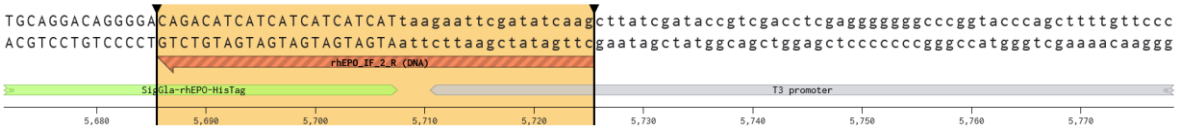


Figura 20. Región y secuencia de la construcción donde se lleva a cabo la reacción de In-Fusion.

Casa abierta al tiempo

9.1.4. Diseño de oligonucleótidos

Para esta sección, utilizamos dos diferentes herramientas bioinformáticas, la herramienta de IDT PrimerQuest y la herramienta de In-Fusion Cloning Primer Design Tool v1.0 de la compañía Takara, en la tabla 7 se muestra el diseño de oligonucleótidos empleados para el presente estudio.

Tabla 7. Secuencias y uso de los oligonucleótidos.

Nombre	Uso	Secuencia
pMF272_IF_2 F	Linealizar vector y amplificar	5´-GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC-3´
pMF272_IF_2 R		5´- ATT TGG TTG ATG TGA GGG G-3´
EPO_IF_2 F	Amplificación del gen sintetizado y adición en los extremos 5' de las regiones complementarias a pMF272 para el In- Fusion	5´-TCA CAT CAA CCA AAT ATG GAC GCA ATA TAT AAC CTC AAG-3´
EPO_IF_2 R		5´-CTT GAT ATC GAA TTC TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG TCT-3´

*Forward (F), Reverse (R).

9.2. Amplificación de secuencias de interés

9.2.1. PCR

En la figura 21 se muestran los amplicones productos de varias reacciones de PCR de punto final con el objetivo de obtener suficiente cantidad del gen y vector para realizar la construcción.

En el carril superior del gel, se pueden observar bandas correspondientes a un tamaño aproximado de 7,700 pb obtenidas tras la linealización y amplificación del vector pMF272 por PCR inversa. Los amplicones observados son 720 pb menores a la forma nativa del vector ya que se eliminó el gen *sGFP* para sustituirlo en la clonación por el gen *SigGla – EPO – HisTag*, Mientras tanto, en el carril inferior del gel, se observan bandas correspondientes a un tamaño aproximado de 760 pb, productos de la amplificación del gen *SigGla – EPO – HisTag* por PCR de punto final. A diferencia de la secuencia mostrada en la figura 13, estos amplicones son 33 pb mayores, ya que, con ayuda de los oligonucleótidos, se les adicionó en ambos extremos regiones complementarias al vector

pMF272 (Figuras 19 y 20), permitiendo la construcción del vector de expresión por la técnica In-Fusion.

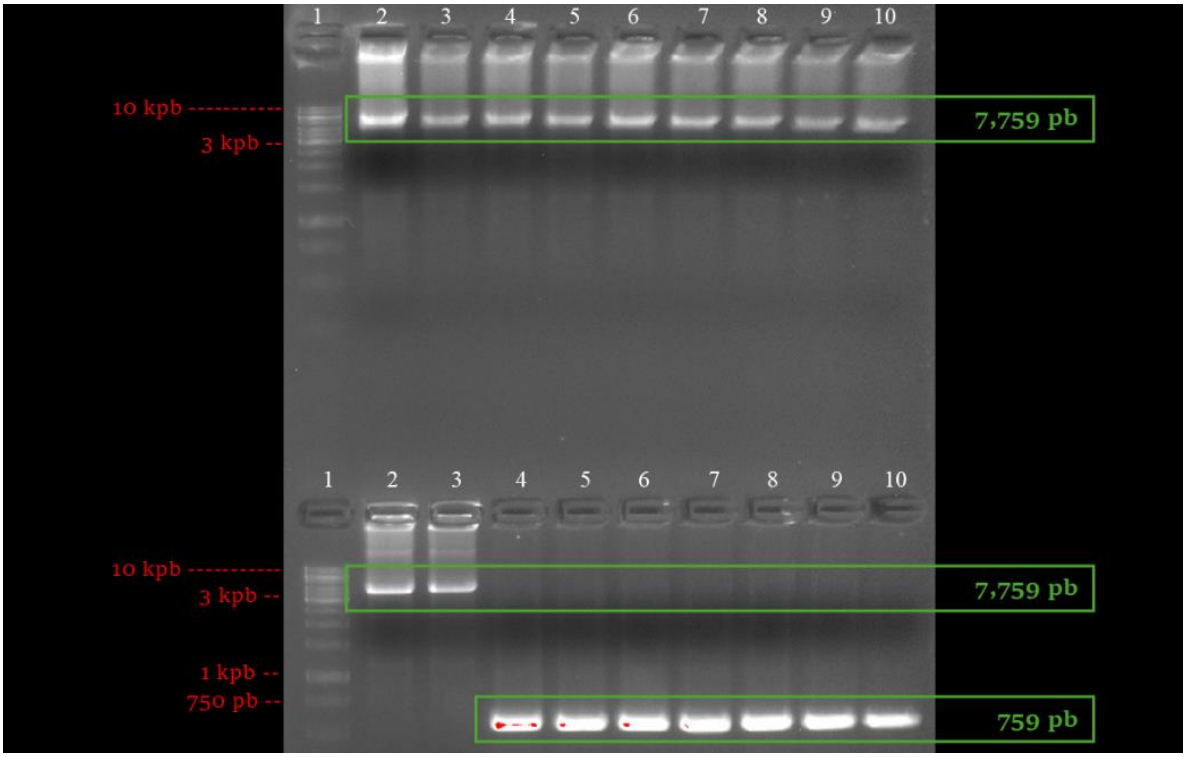


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de ADN de interés amplificados por PCR.
En orden, en el carril superior, de izquierda a derecha; 1.º pozo: marcador de tamaño molecular de 1 kpb y 2.º a 10.º pozo: amplificación por PCR del plásmido pMF272. En el carril inferior, de izquierda a derecha; 1.º pozo: marcador de tamaño molecular de 1kpb, 2.º y 3.º pozo: pMF272 y 4.º al 10.º pozo: amplificación por PCR del gen sintético.

9.2.2. Purificación por columna

A continuación, se muestran los amplicones del gen *SigGla – EPO – HisTag* y el vector pMF272 posterior a su purificación. A diferencia de lo mostrado en la figura 21, se puede observar que la banda del gen *SigGla – EPO – HisTag* se encuentra aislada y con menor presencia de cadenas de nucleótidos de menor o mayor tamaño. Por otro lado, la banda del vector pMF272 aún presenta un barrido en el gel; sin embargo, esto puede ser producto al tratamiento de las muestras con el buffer de carga y no por contaminación de la muestra purificada. Adicionalmente, se puede observar que en las figuras 21 y 22, la migración de los amplicones y del marcador de tamaño molecular se ve afectada por el mismo buffer de carga. En respuesta a esto, se modificó la técnica de tinción para el gel presentado en la figura 25 en donde se puede observar las bandas presentes a los correctos tamaños.

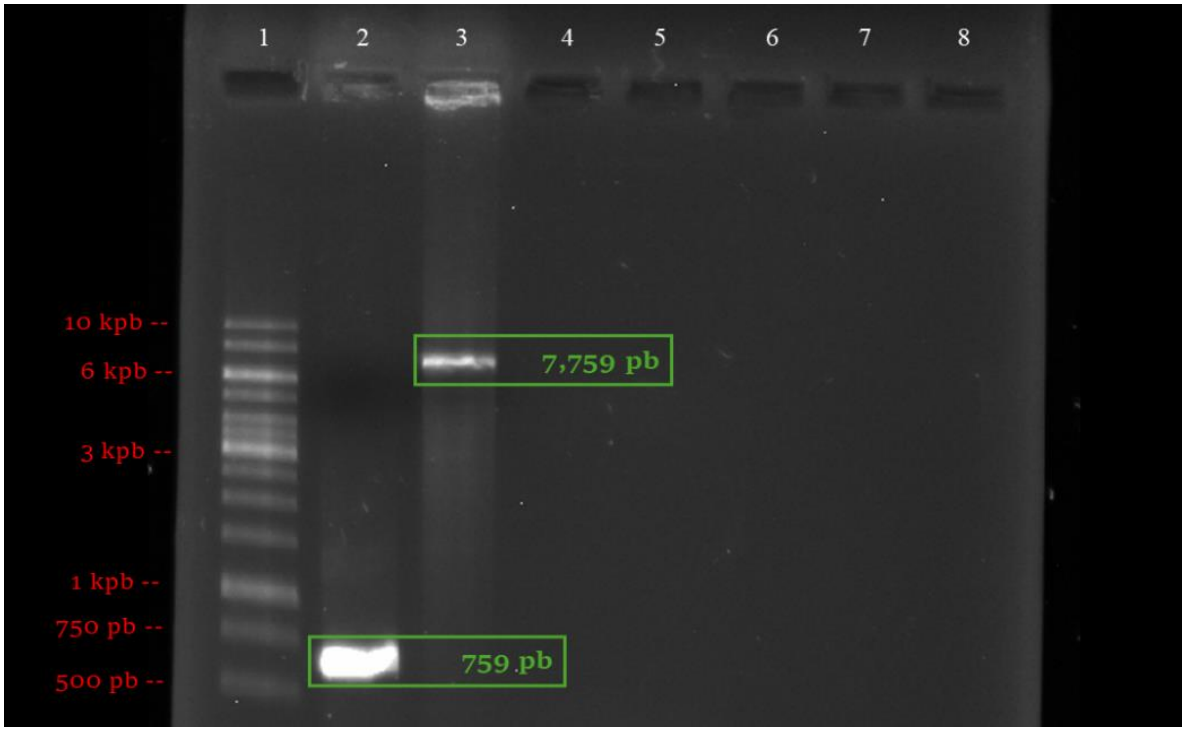


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de ADN de interés, tras su purificación por columna.
En orden, de izquierda a derecha; 1.º pozo: marcador de tamaño molecular, 2.º pozo: gen *SigGla – EPO – HisTag* y 3.º pozo: plásmido pMF272.

9.2.3. Cuantificación de ADN

A continuación, se presenta la cuantificación de las piezas biológicas por Nanodrop, este equipo nos permite conocer de forma muy precisa la concentración de ácidos nucleicos a partir de micro-volúmenes, que van de 1-2 µL (Yu *et al.*, 2017) Esta técnica nos permitió conocer la concentración de las soluciones obtenidas tras la purificación del gen y vector y con ello, definir el protocolo del In-Fuision.

Tabla 8. Cuantificación de ADN en Nanodrop.

Muestra	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Promedio
SigGla – EPO – HisTag	4.2	4.3	4.2	4.23
pMF272	1.9	1.7	1.9	1.83

*Concentraciones en ng sobre microlitro (ng/µL).

Tabla 9. Cálculo de la concentración de ADN en muestras.

Muestra	Dilución [ng/µL]	F.D.*	Solución inicial [ng/µL]
SigGla – EPO – HisTag	4.23	20	84.4
pMF272	1.83	20	36.6

*Factor de Dilución (F.D.)

9.3. Construcción del vector

Para la construcción del vector se optó por la clonación In-Fusion (CloneTech – TaKaRa), ya que esta ofrece un método rápido, eficiente y sin cicatrices para la clonación de forma simultánea de uno o más insertos en un solo vector. Comparando esta técnica con la clonación Gateway, una técnica similar y muy popular, se observa la evidente conveniencia del método In-Fusion. En la clonación Gateway se requiere que cada fragmento se integre a un vector donador antes de ser insertado en el vector objetivo y requiere generalmente de dos pasos de amplificación por PCR punto final. De forma contraria, el In-Fusion requiere únicamente una reacción de PCR y permite la inserción directa del gen al vector. Los oligonucleótidos utilizados en el método In-Fusion requieren de un extremo protuberante en la región 5´complementario al vector objetivo de una longitud de 15 pares de base (pb), a diferencia de las 35 pb del protocolo Gateway, reduciendo costos en la síntesis de oligonucleótidos (Chee & Chin, 2015; Park *et al*., 2015). Aunado a esto, el método In-Fusion no requiere de una reacción de ligación, como sí ocurre en el caso de la clonación mediante el uso de enzimas de restricción, por el protocolo Golden Gate o el ensamblado de Gibbson.

Derivado de la clonación In-Fusion, se obtuvieron colonias de posibles transformantes con el vector pMF272_SigGla – rhEPO – HisTag las cuales fueron resembradas por superficie en medio SOC agar adicionado con ampicilina en una concentración de 100 μg/mL. La biomasa obtenida de dichos cultivos se utilizó para 1) preparar gliceroles para conservar la construcción genética y 2) extraer ADN plasmídico para confirmar la transformación mediante la amplificación de la secuencia SigGla – EPO – HisTag.

Casa abierta al tiempo

9.3.1. Choque térmico

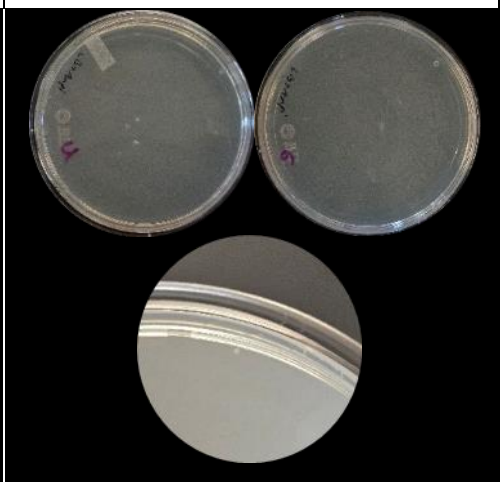
	Control técnico	Transformantes
LB con Antibiótico		
LB sin antibiótico		No Aplica

Figura 23. Cultivo de *E. coli* DH5α tras a la transformación por choque térmico.

9.3.2. Resiembra de posibles transformantes



Figura 24. Sembrado de posibles transformantes sobre medio SOC agar adicionado con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL. Se pueden observar las regiones donde se recolectó biomasa para la extracción de ADN plasmídico por la técnica de Mega Prep.

Casa abierta al tiempo

9.3.3. Confirmación de transformantes

Para confirmar las colonias transformadas, se realizaron reacciones de PCR punto final con el par de oligonucleótidos EPO_IF_2 para identificar la presencia del gen *SigGla – EPO – HisTag*. Las muestras que provinieran de colonias exitosamente transformadas presentaron un amplicón de un tamaño aproximado a las 750 pb, mientras que en las muestras provenientes de colonias no transformadas no presentaron dicha banda. Simultáneamente a estas reacciones, se trabajó con un control positivo y negativo. El primero consistió en una reacción de PCR punto final utilizando una muestra purificada del gen *SigGla – EPO – HisTag* como ADN molde y en el segundo, se utilizó una muestra purificada del vector pMF272 sin inserto. Esto se realizó con el propósito de demostrar que las bandas obeservadas en las cepas transformantes no correspondían a un falso positivo; en otras palabras, que, en lugar de corresponder al gen de interés, fueran producto de la unión inespecífica de los oligonucleótidos en otras regiones de pMF272.

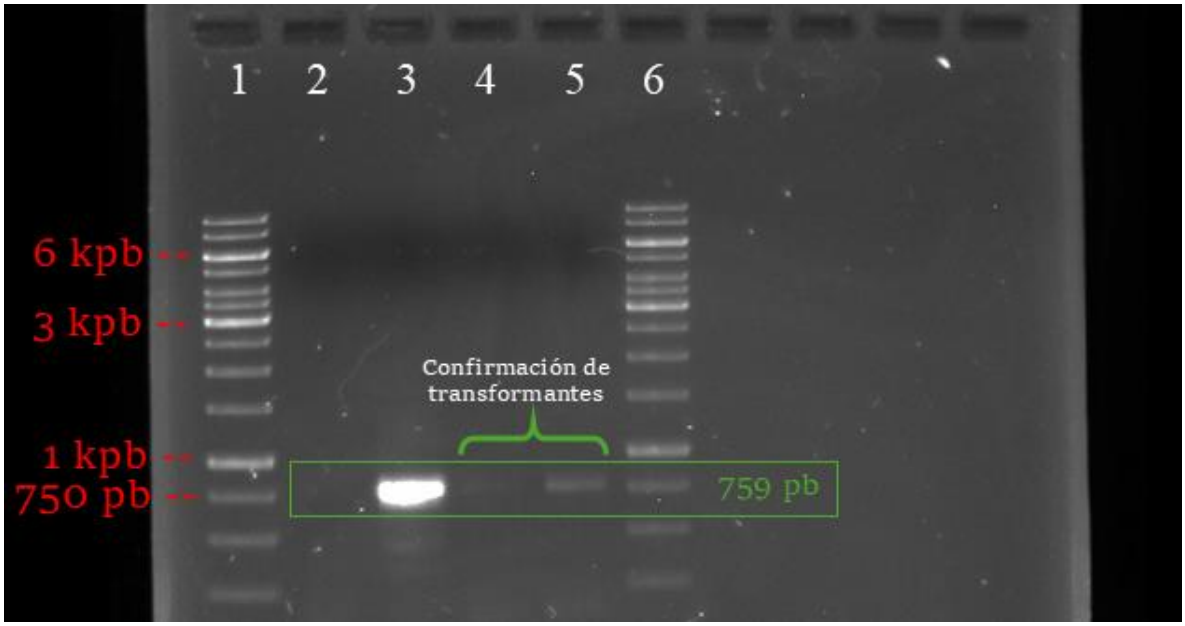


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR.
En orden de izquierda a derecha; 1.º y 6.º pozo: marcador de tamaño molecular, 2.º pozo: control negativo, 3.º pozo: control positivo y 4.º y 5.º pozo: muestras de transformantes positivas.

9.4. Transformación de *Neurospora* crassa

9.4.1. Cultivo de N. crassa

9.4.1.1. Pruebas de auxotrofía

Se sembró la cepa *Neurospora crassa* FGSC #9717 en medio Vogel agar (MVA) con y sin histidina, para corroborar que se estaba trabajando con la cepa auxótrofa. Como se puede

Casa abierta al tiempo

observar en la figura 26, no hubo crecimiento de la cepa los medios preparados sin histidina y se observa un crecimiento abundante en aquellos medios que si fueron adicionados con esta. Lo observado corrobora que se está trabajando con la cepa *N. crassa* FGS#9717 y que no hay contaminación en los cultivos de una cepa protrótofa de *Neurospora*.

Casa abierta al tiempo

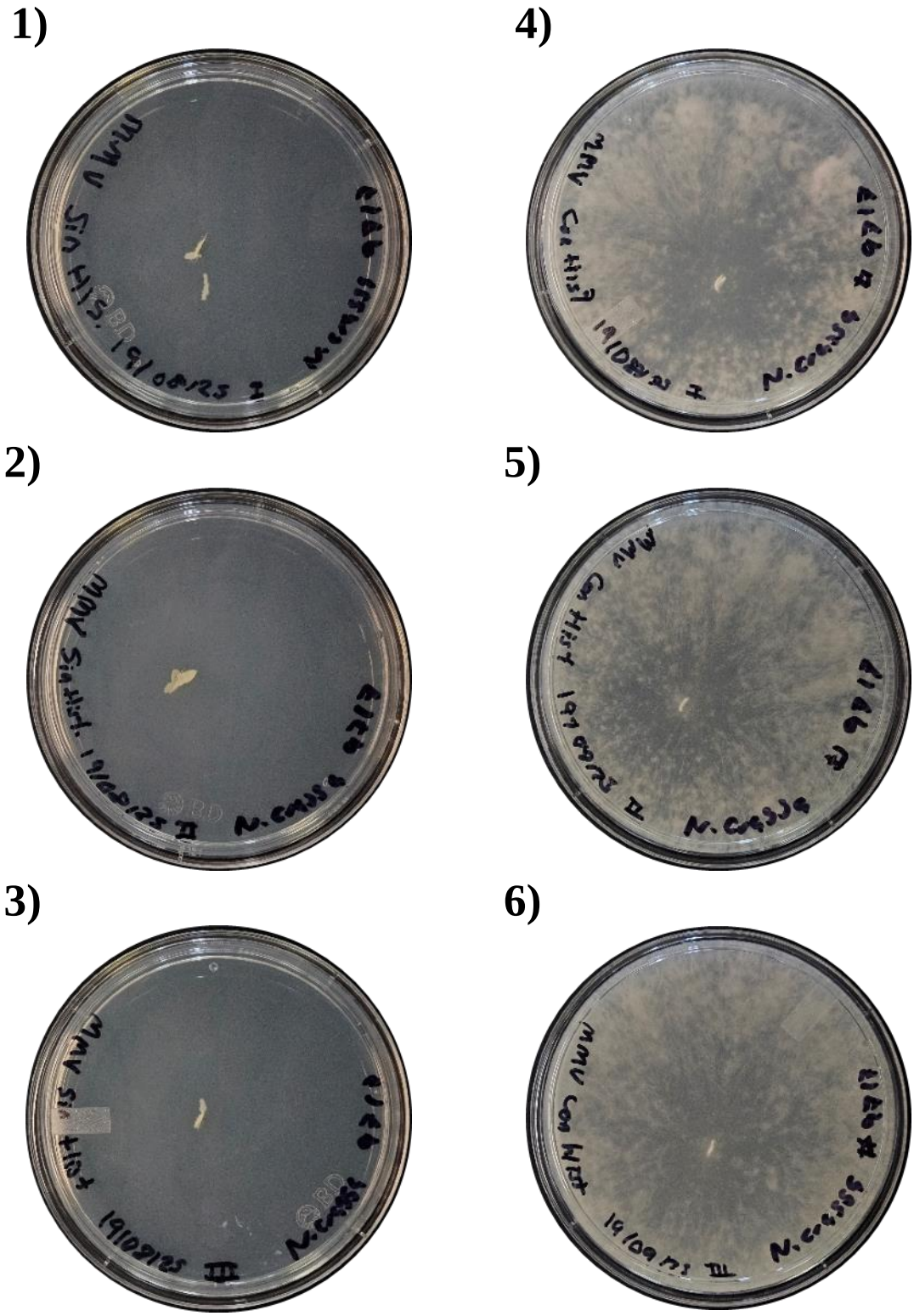


Figura 26. Pruebas de auxotrofía de *Neurospora crassa* #9717.
1-3) Siembra en medio MVA sin histidina posterior a 48 h de incubación a 30 °C, sin fotoestímulo. B) Siembra en medio MVA adicionado con histidina a una concentración final de 0.02%. (p/v)Posterior a 48 h de incubación a 30 °C, sin fotoestímulo.

Casa abierta al tiempo

9.4.1.2. Siembra de N. crassa y recolección de conidios

Una vez confirmada la auxotrofía de la cepa, se cultivó en tubos en bisel para obtener un preinóculo, que se utilizó para sembrar en matraces Erlenmeyer. A partir de éstos, se recolectaron conidios para su posterior transformación mediante electroporación.

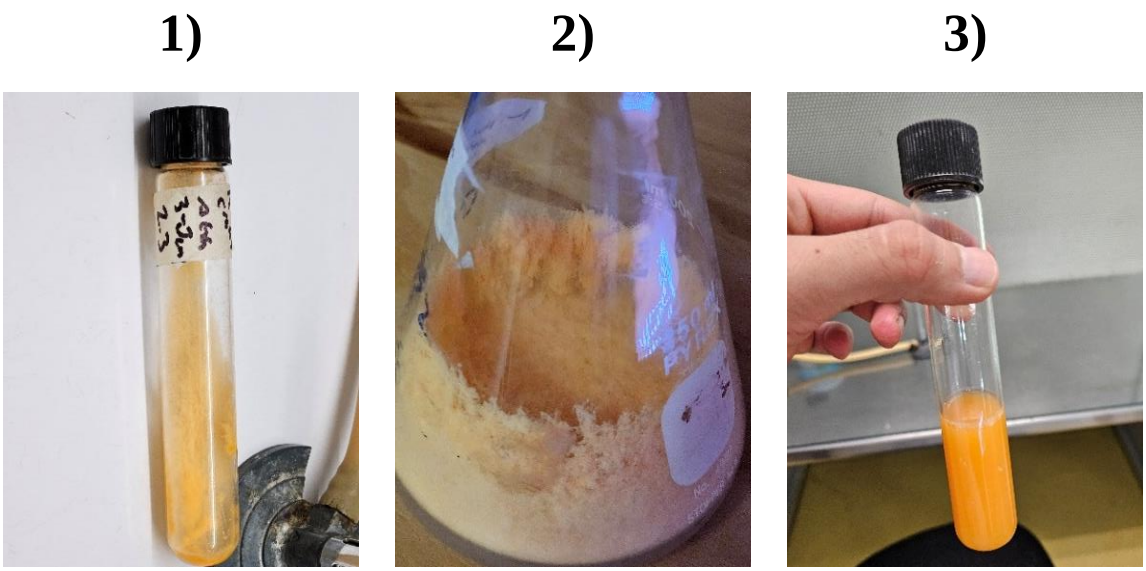


Figura 27. 1) Cultivos de *N. crassa* #9717 en bisel. 2) Cultivo de *N. crassa* #9717 en matraz Erlenmeyer. 3) Suspensión de conidios utilizada para la electroporación.

9.4.2. Electroporación de conidios

Producto de la electroporación se consiguieron las cepas mostradas en la figura 28, utilizando como marcador para identificar posibles colonias transformadas la auxotrofía a histidina. Estas colonias fueron resembradas por estriado en superficie en medio MVA adicionado con sorbosa, para permitir el crecimiento de colonias aisladas (Figura 29).

De igual forma que para la transformación de *E. coli*, se usó un control técnico (negativo) durante la transformación. En este caso, el control técnico consistió en una cepa de *N. crassa* #9717 sometida a todo el proceso de electroporación, pero en ausencia del vector pMF272_SigGla – EPO – HisTag. Tal como se muestra en la figura 28, este control creció exclusivamente en medio adicionado con histidina, ya que se conserva como una cepa auxótrofa; sin embargo, este crecimiento no se presentó como en los cultivos reportados en la imagen 25 debido a la presencia de sorbosa en el medio. La sorbosa impide la propagación del micelio por lo que el control positivo creció como una capa fina sobre la superficie del medio, dificultando su visualización en fotografía.

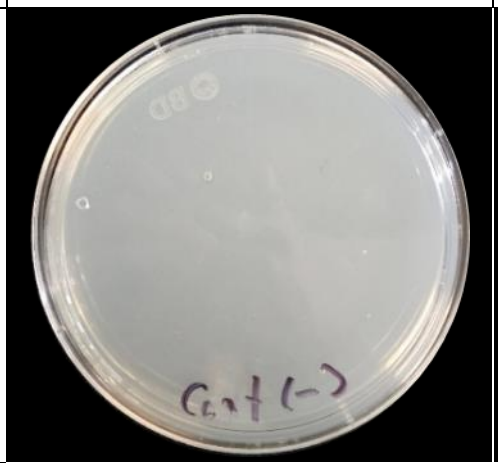
	Control técnico	Transformantes
Medio CA + Agar de regeneración sin histidina		
Medio CA + Agar de regeneración con histidina		No Aplica

Figura 28. Cultivo de *N. crassa* posterior a la electroporación de conidios.

9.4.3. Obtención de cultivo monospórico

9.4.3.1. Resiembra de posibles transformantes

En la figura 29 se presentan los cultivos producto de la resiembra de las colonias aisladas posterior a la electroporación por estriado en superficie. Se obtuvieron en total 7 probables cepas transformantes que fueron posteriormente resembradas por separado.

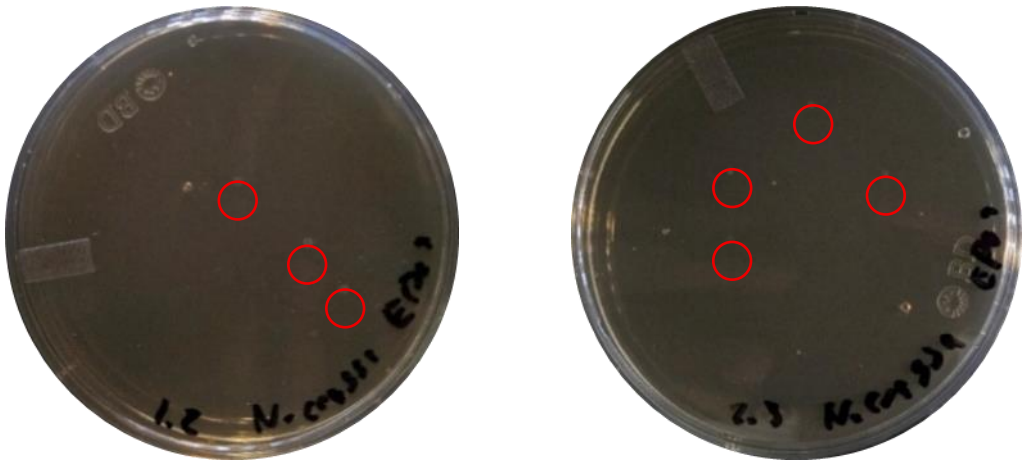


Figura 29. Siembra de *N. crassa* tras la electroporación.
Sembrado en medio MVA adicionado con sorbosa a una concentración final de 0.02%. (p/v). Fotos tomadas tras 24 h de incubación a 30 °C. Las siete colonias aisladas obtenidas se encierran dentro de los círculos rojos.

9.4.3.2. Cepas monospóricas y homocariontes

A partir de las colonias mostradas en la figura 29, se tomaron las colonias aisladas y se resembraron por picadura en cajas Petri individuales con medio MVA sin histidina, obteniendo cultivos monospóricos y homocariontes (Figura 30).

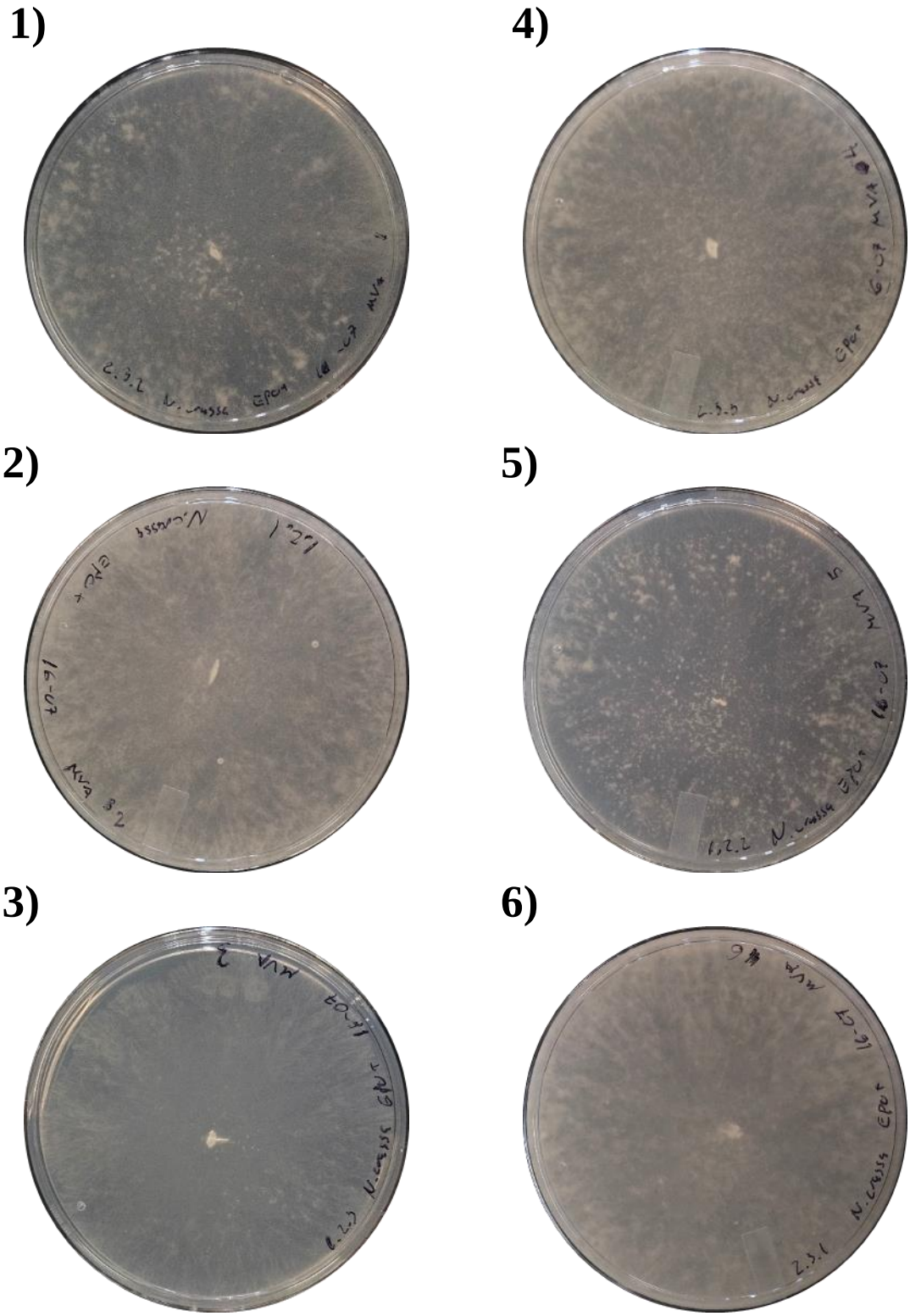


Figura 30. Cepas monospóricas y homocariontes de *N. crassa* transformadas con el gen *SigGla – EPO – HisTag*. La 7.º cepa no creció en el segundo paso de resiembra en ausencia de histidina, por lo que fue descartada.

Casa abierta al tiempo

9.4.4. Confirmación de transformantes

Se extrajo ADN genómico a partir de cultivos monospóricos homocariontes, para confirmar la presencia del gen *SigGla – EPO – HisTag* por medio de PCR punto final, utilizando el par de oligonucleótidos EPO_IF_2. En forma similar a la realizada en la sección 7.3.3., la confirmación de transformantes fue acompañada de un control positivo y uno negativo. Se conservó el control positivo como una reacción de PCR utilizando el gen *SigGla – EPO – HisTag* como ADN molde y como control negativo se realizó una reacción de PCR a partir de ADN genómico de *N. crassa* 9717 (Figura 32 A). Ambos controles se realizaron con el mismo objetivo: verificar la existencia de bandas en 750 pb, las cuales confirman una transformación exitosa, ya que son producto únicamente de la amplificación del gen *SigGla – EPO – HisTag* y no de otras regiones del genoma del hongo.

Las reacciones de PCR confirmaron la transformación de las seis cepas aisladas, a las cuales se nombraron *N. crassa* EPO **n**+, donde **n** ϵ [1,6] (Figura 32 B).

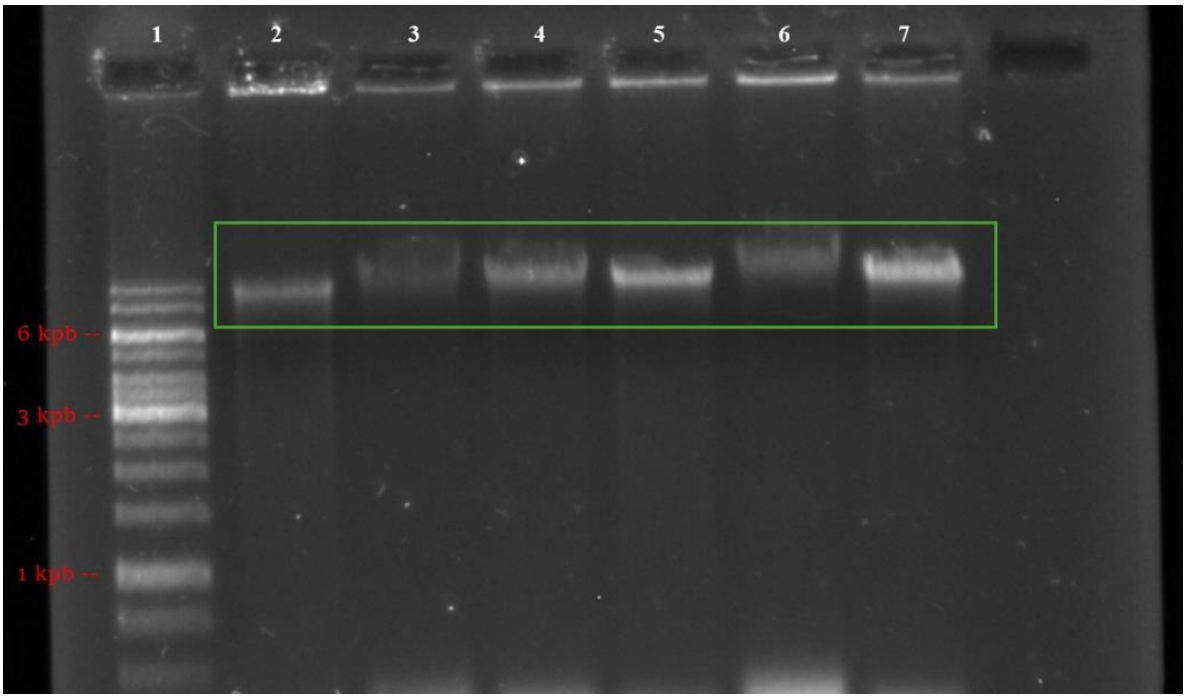


Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de extracción de ADN genómico de cepas transformadas de *N. crassa*. En orden de izquierda a derecha; 1.er pozo: marcador de tamaño molecular y 2.º a 7.º pozo: ADN genómico (encerrado en el cuadro verde).

Casa abierta al tiempo

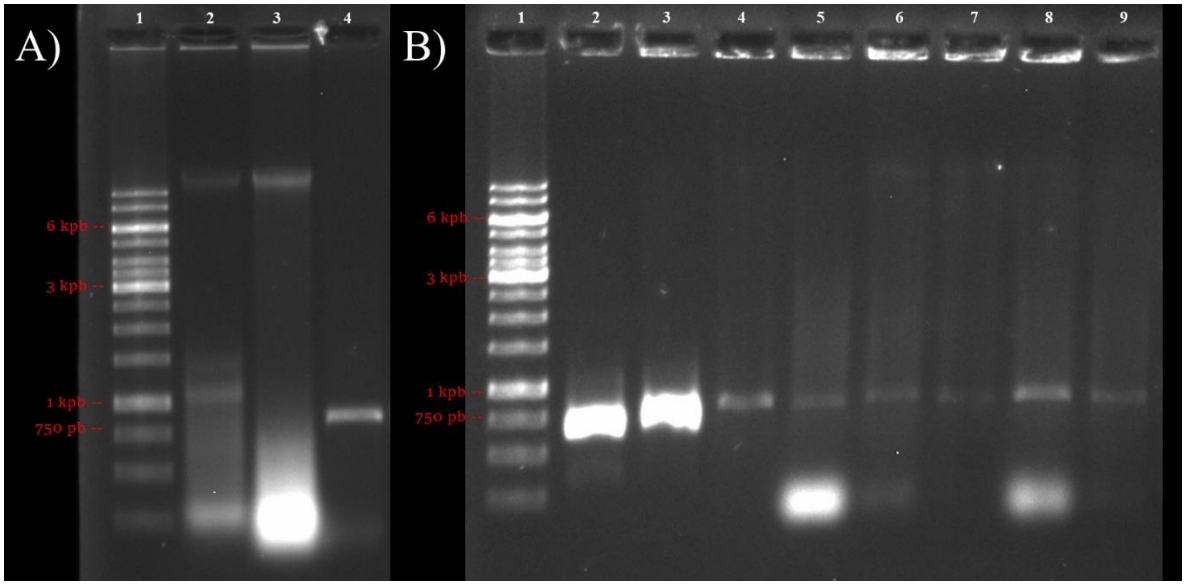


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR punto final de controles y cepas transformadas.
A) En orden de izquierda a derecha; 1.º pozo: Marcador de tamaño molecular, 2.º pozo: Muestra transformante positiva (*N. crassa* EPO 1+), 3.º pozo: Control negativo y 4.º pozo: Control positivo. B) En orden de izquierda a derecha; 1.er pozo: marcador de tamaño molecular y 2.º y 3.º pozo: controles positivos y 4.º a 8.º pozo: muestras de cepas exitosamente transformadas.

9.5. Cultivo en medio sólido

Debido a que, durante las pruebas de confirmación de transformantes por PCR punto final y durante los cultivos en ausencia de histidina, la cepa *N. crassa* EPO 6+ presentó mayor reproducibilidad en los resultados, se decidió continuar los experimentos de producción de rhEPO por SSC con esta cepa. Adicional al SSC de la cepa *N. crassa* EPO 6+, se montó, al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones, SSC con la cepa no transformada de *N. crassa* #9717 para fungir como control negativo. Se omitió la construcción de un control de una cepa de *N. crassa* transformada con el vector pMF272 sin el gen *SigGla – EPO – HisTag* debido a que pMF272 revierte la auxotrofía a histidina y la nueva cepa protrótrofa sin el gen representaba un riesgo de contaminación cruzada con las cepas *N. crassa* EPO n+.

9.5.1. Biomasa

Según lo observado en la variación de peso seco de biomasa a lo largo del cultivo, se puede apreciar que la cepa transformada presenta un crecimiento mayor al de la cepa nativa, siendo este de casi un 70% mayor finalizadas las 96 h de cultivo.

Este incremento de biomasa se puede deber a la reversión de la auxotrofía a histidina de la cepa *N. crassa* EPO 6+, reduciendo el estrés metabólico del hongo. Por otro lado, la cepa auxótrofa, *N. crassa* #9717, se encuentra bajo constante estrés metabólico causado por la

competencia entre rutas metabólicas. A pesar de que el medio donde crece la cepa auxótrofa está adicionado con histidina, la taza de transporte del aminoácido al interior de la célula no es lo suficientemente rápido para abastecer los requerimientos nutricionales del hongo. Esto provoca que el flujo del carbono sea parcialmente desviado al metabolismo de aminoácidos, pero, ya que no se permite la síntesis de histidina, comienza la acumulación de intermediarios metabólicos que afectan a la regulación metabólica. En conjunto, esto no representa una incompatibilidad con la proliferación de la cepa *N. crassa* #9717; sin embargo, provoca que su crecimiento sea menor al de la cepa protrótrofa (Landi *et al*., 2011; Kaplan *et al*., 2024).

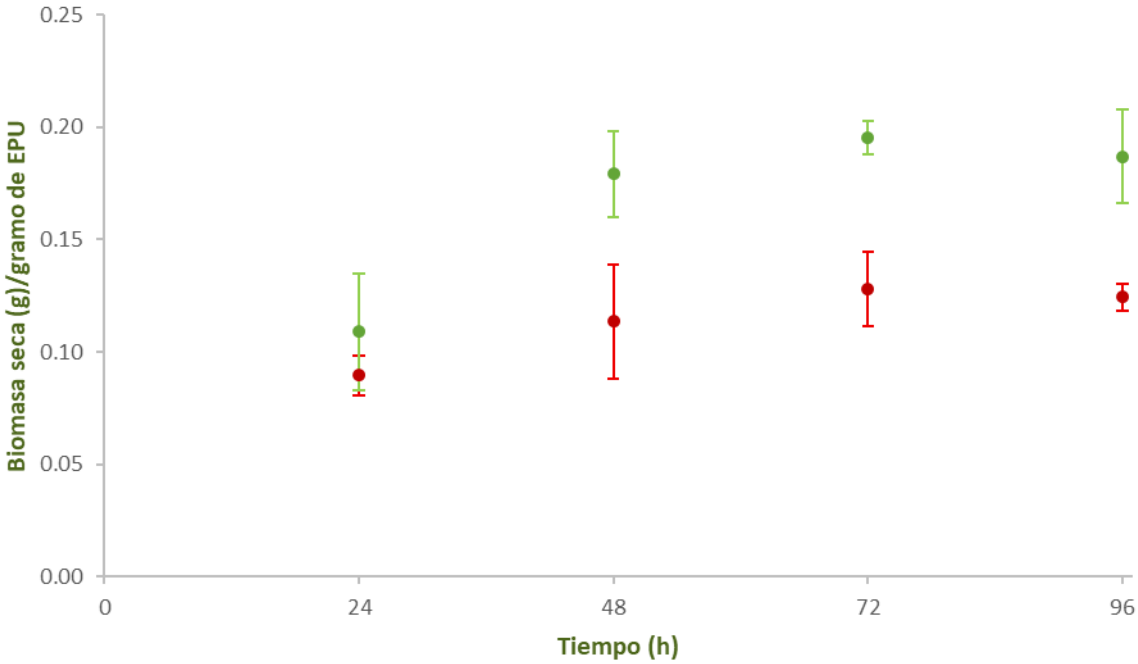


Figura 33. Gráfica de biomasa seca por gramo de soporte (espuma de poliuretano, EPU) en función del tiempo de cultivo. En rojo se muestra el crecimiento de la cepa *N. crassa* #9717 y, en verde, el de la cepa *N. crassa* EPO 6+.

9.5.2. pH

En la figura 34 se observa el comportamiento del pH extracelular a lo largo del proceso de SSC. Se puede notar que, en ambos casos, hay una alcalinización del medio a medida que avanza el cultivo; sin embargo, el cambio es significativamente mayor en los cultivos con la cepa transformada que en los con la nativa. La cepa de *N. crassa* EPO 6+ muestra una alcalinización del medio, partiendo de un pH inicial de 5 y alcanzando un pH final de casi 7, mientras que la cepa de *N. crassa* #9717 muestra una estabilización del pH extracelular a

Casa abierta al tiempo

las 48 h. Dicha alcalinización del medio coincide con lo reportado en trabajos previos, en los que la variación del pH durante el cultivo oscila entre 5 y 6 (Havlik et al., 2017).

Este fenómeno se puede deber al incremento de producción de CO_2 tras el metabolismo de la fuente de carbono. El CO_2, al ser transportado al exterior de la célula, es ligeramente solubilizado en la fase acuosa, formando carbonatos (H_2CO_3-) que alcalinizan el medio. Esta teoría se puede sostener comparando la variación del pH con el perfil de producción de biomasa reportado en la figura 33, donde se observa que el pH aumenta de forma simultánea al incremento de biomasa. Otra posible explicación a este fenómeno de alcalinización se puede deber al metabolismo propio de aminoácidos y a la secreción de amoniaco, algo observado en levaduras como *Candida* y hongos filamentosos como *Trichoderma guizhouense* (Miao et al., 2020; Huang *et al.*, 2025). No obstante, se requeriría un análisis de azucares residuales en medio para poder sostener con mayor evidencia que la alcalinización del medio es producto del metabolismo de la fuente de carbono.

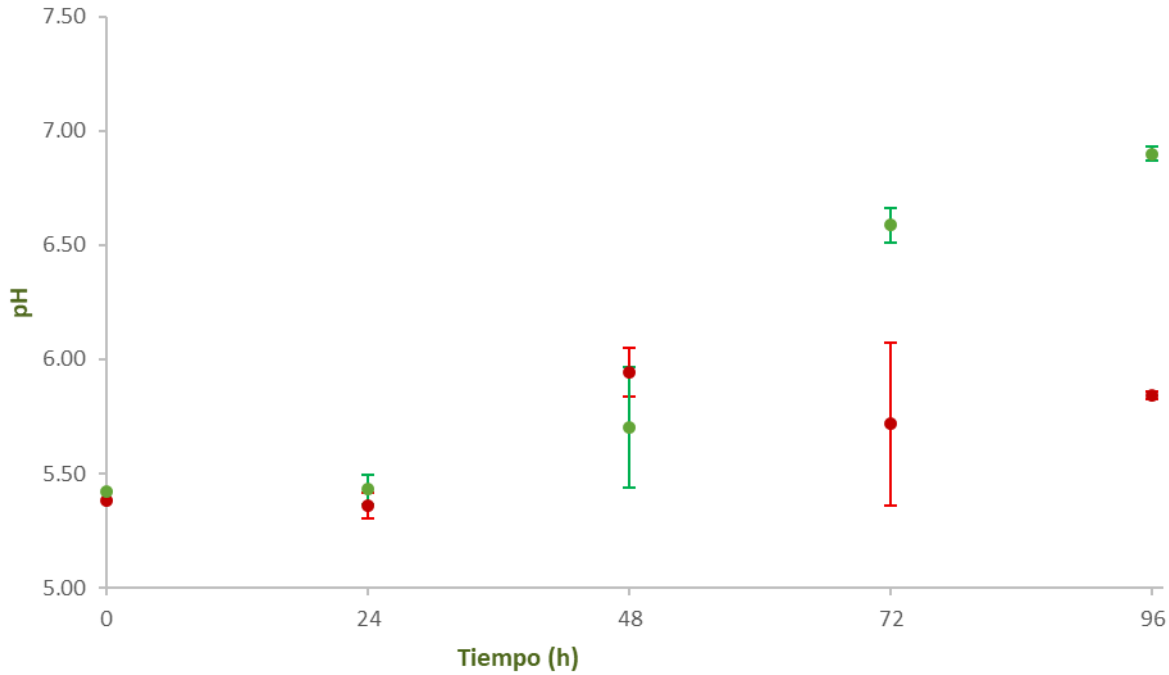


Figura 34. Gráfica de la variación de pH en los extractos recolectados en función del tiempo de cultivo.
En rojo se muestra el pH correspondiente a los cultivos de la cepa *N. crassa* #9717 y, en verde, el de la cepa *N. crassa* EPO 6+.

9.5.3. Proteína extracelular

A continuación, en la figura 35, se presenta una gráfica que muestra la cantidad de proteína extracelular en el medio cada 24 h de cultivo. Se observa que los cultivos de la cepa *N.*

Casa abierta al tiempo

crassa EPO 6+ presentan una mayor secreción de proteínas extracelulares que la de la cepa *N. crassa* #9717. Este comportamiento es similar a lo reportado por Sun y colaboradores (2011), quienes clonaron la endoglucanasa GH5-1 bajo la acción del promotor *Pccg-1* en una cepa de *N. crassa* FGSC #2489, observándose un aumento aproximado del 15% en la secreción de proteínas en la cepa transformada.

Adicionalmente, se puede observar un máximo en la concentración de proteína extracelular, a las 72 h de cultivo. Esto puede deberse a la variación del secretoma de *N. crassa* a lo largo del cultivo, producto de la variación en la concentración de nutrientes disponibles, tal como proponen Salgado-Bautista y colaboradores (2025). Para tiempos superiores a 72 h de cultivo, tentativamente habría un incremento en la secreción de proteasas, lo que provocaría la disminución de proteínas extracelulares observada a las 96 h de fermentación.

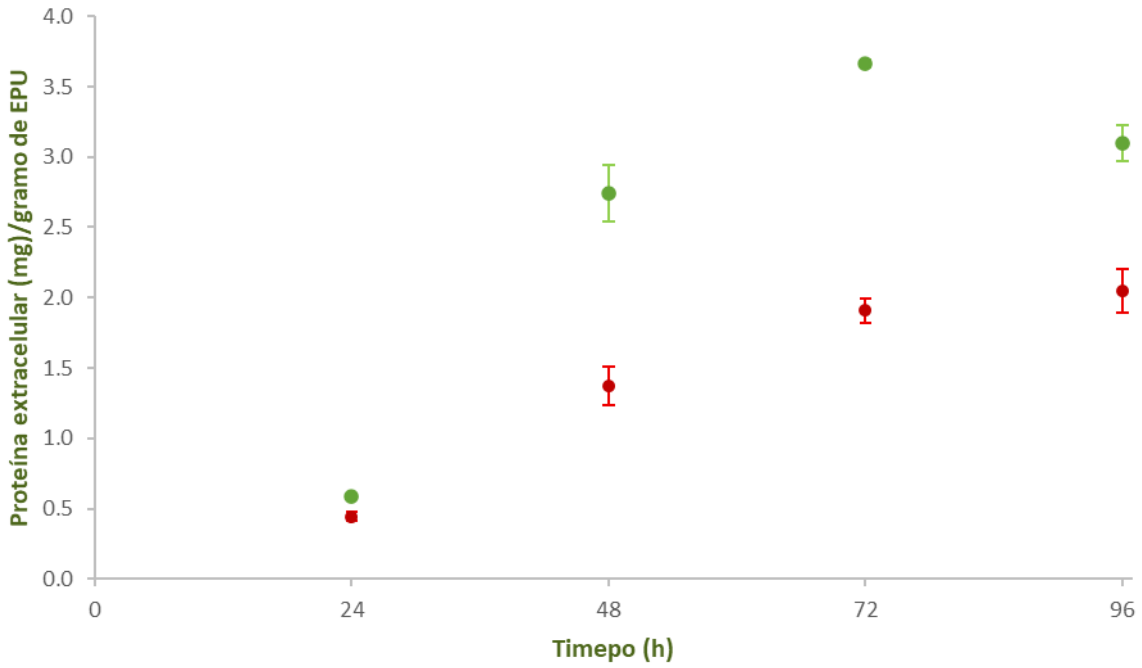


Figura 35. Gráfica de la producción de proteína extracelular (mg) por gramo de soporte (EPU) en función del tiempo de cultivo. En rojo se muestra la cantidad de proteína correspondiente a la cepa *N. crassa* #9717 y, en verde, a la cepa *N. crassa* EPO 6+.

9.6. Producción de eritropoyetina

9.6.1. SDS-PAGE

Para visualizar la rhEPO se realizó un análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de los extractos extracelulares obtenidos de los SSC. Se compararon los secretomas de las cepas *N. crassa* #9717 y *N. crassa* EPO 6+ para determinar la presencia o ausencia de la banda

Casa abierta al tiempo

correspondiente al peso de la rhEPO (≈34 kDa). Sin embargo, se debe considerar que el peso molecular de la rhEPO producida en este trabajo difiere de lo reportado en la literatura, debido a las diferencias en los patrones de glicosilación empleados por cada sistema de producción.

Según la figura 36, se puede observar la presencia de bandas en los extractos de la cepa transformante de un tamaño aproximado de 37 kDa y que estas bandas se ausentan en los extractos de la cepa nativa, siendo tentativamente rhEPO. Esta variación de peso se corresponde con lo observado en otros modelos de producción de rhEPO. Algunos referentes de esto son el trabajo de Chin y colaboradores (2019), en el que obtuvieron rhEPO glicosilada en células HEK293 con un tamaño mayor a 40 kDa, o el trabajo de Goh y colaboradores (2013), donde obtuvieron en células CHO isoformas de rhEPO con pesos entre 25 y 37 kDa.

Debido a que no se ha intentado producir rhEPO en *N. crassa* es complicado estimar los patrones de glicosilación esperados; sin embargo, se puede comparar con otros sistemas fúngicos y el más utilizado en este caso es *Pichia pastoris*. En este sistema se puede observar una amplia variación en el peso de la rhEPO glicosilada en función de la cepa utilizada, produciendo rhEPO glicosilada con tamaños de 30 kDa (Çelik et al., 2007), 33 kDa (Maleki et al., 2010) y con un peso mayor a 40 kDa (Soyaslan & Çalık, 2011).

Para corroborar que las bandas observadas a 37 kDa corresponden a rhEPO glicosilada producida por la cepa *N. crassa* EPO 6+, es necesaria la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad en columna de níquel, gracias a la cola de histidina, y un segundo análisis por SDS-PAGE. Adicionalmente, se requiere de la identificación y cuantificación de rhEPO por inmunoensayos (ensayo ELISA).

Casa abierta al tiempo

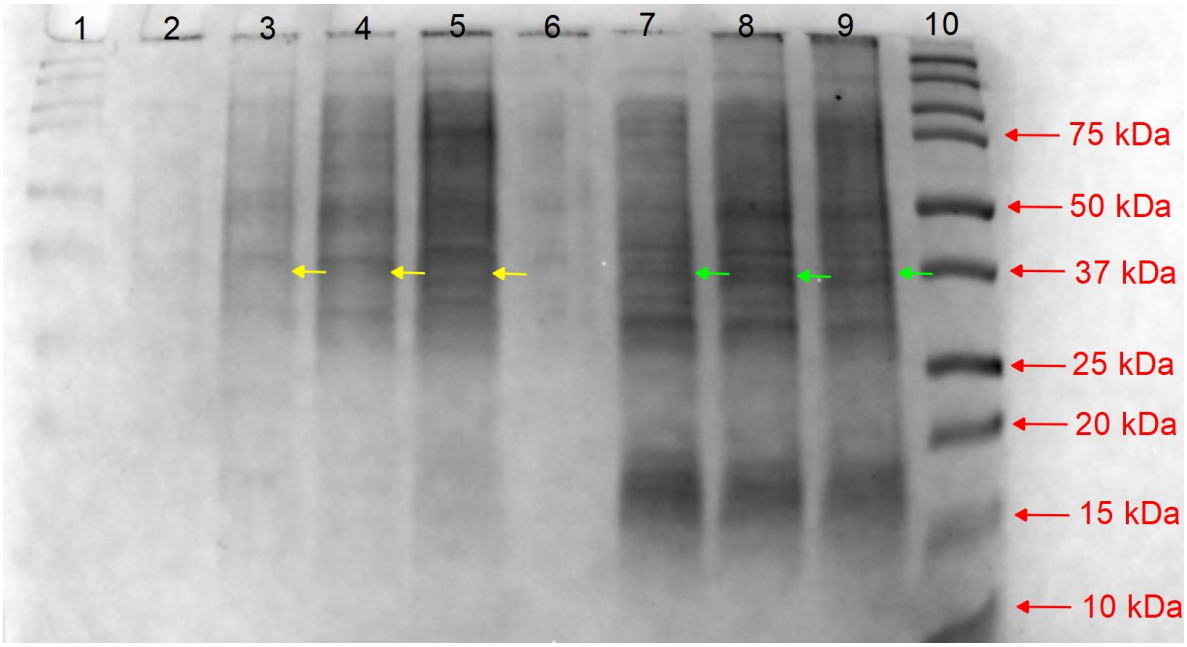


Figura 36. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.
En orden de izquierda a derecha; 1.º pozo: Marcador de tamaño molecular, 2.º a 5.º pozo: secretoma de *N. crassa* #9717 a 24, 48, 72 y 96 h de cultivo 6.º a 9.º pozo: secretoma de *N. crassa* EPO 6+ a 24, 48, 72 y 96 h de cultivo y 10º pozo: marcador de tamaño molecular (Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standards).

.

10. Conclusión

El presente trabajo tuvo como objetivo transformar una cepa del hongo filamentoso *N. crassa* con el gen de la eritropoyetina humana (modificada con una señal de secreción y una cola de histidinas), permitiendo su síntesis heteróloga y secreción al medio extracelular, lo que facilitaría su purificación.

Esto se realizó para probar a *N. crassa* como modelo biotecnológico para la producción de proteínas recombinantes. Se utilizó la eritropoyetina humana como modelo de estudio debido a que es una proteína ampliamente caracterizada y conocida, y a su compleja estructura, dada por sus importantes modificaciones postraduccionales. En otras palabras, utilizar EPO como modelo tiene el potencial de permitir determinar la capacidad de *N. crassa* para producir glicoproteínas complejas, información útil para la expresión heteróloga de moléculas de alto interés farmacéutico, como los anticuerpos monoclonales.

El vector de expresión pMF272_SigGla – EPO – HisTag se construyó mediante clonación In-Fusion y, posteriormente, se utilizó para transformar una cepa de *N. crassa* #9717. De este proceso se obtuvieron seis cepas exitosamente transformadas, a las cuales se les denominó *N. crassa* EPO **n**+.

Se tomó la cepa *N. crassa* EPO 6+ para establecer un cultivo sólido destinado a la producción de rhEPO. A partir del análisis de SDS-PAGE, comparando los secretomas (las proteínas secreteadas presentes en los extractos recolectados tras el SSC) de las cepas *N. crassa* #9717 y *N. crassa* EPO 6+, se observó que desde las primeras 24 h de cultivo la cepa transformante ya producía lo que tentativamente es rhEPO. Se observó la producción, exclusivamente por la cepa transformante, de una proteína de un tamaño aproximado a 37 kDa; sin embargo, para poder identificar con certeza la proteína, aún se requieren pasos adicionales de purificación mediante cromatografía de afinidad y caracterización mediante espectrometría de masas. Adicionalmente, se requiere de la cuantificación de rhEPO secretada mediante ensayo ELISA, permitiendo, en conjunto con los análisis previos, evaluar los rendimientos de producción, la pureza y los patrones de glicosilación de la rhEPO producida por el hongo.

11. Referencias

Ao, J., Bandyopadhyay, S., & Free, S. J. (2018). Characterization of the *Neurospora crassa* DHN melanin biosynthetic pathway in developing ascospores and peridium cells. *Fungal Biology*, *123*(1), 1–9.

Baker, C. L., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2012). The circadian clock of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(1), 95-110.

Brun, S., Kuo, H. C., Jeffree, C. E., Thomson, D. D., & Read, N. (2021). Courtship ritual of male and female nuclei during fertilization in *Neurospora crassa*. *Microbiology Spectrum*, *9*(2), e00335-21.

Bunn, H. F. (2013). Erythropoietin. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *3*(3), a011619.

Cano-Domínguez, N., Álvarez-Delfín, K., Hansberg, W., & Aguirre, J. (2008). NADPH oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, *7*(8), 1352-1361.

Cano-Domínguez, N., Bowman, B., Peraza-Reyes, L., & Aguirre, J. (2019). *Neurospora crassa* NADPH oxidase NOX-1 is localized in the vacuolar system and the plasma membrane. *Frontiers in microbiology*, *10*, 1825.

Çelik, E., Çalık, P., Halloran, S. M., & Oliver, S. G. (2007). Production of recombinant human erythropoietin from Pichia pastoris and its structural analysis. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(6), 2084–2094.

Cerón-Moreno, M. F. (2020). *Caracterización de la función de la proteína PcSNT y su papel en la vía de señalización celular mediada por proteínas G heterotriméricas en Penicillium chrysogenum.* https://doi.org/10.24275/uami.fn106z13r

Cheetham, J. C., Smith, D. M., Aoki, K. H., Stevenson, J. L., Hoeffel, T. J., Syed, R. S., & Egrie, J. (1998). NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. *Nature Structural Biology*, *5*(10), 861-866.

Chin, C. L., Goh, J. B., Srinivasan, H., Liu, K. I., Gowher, A., Shanmugam, R., Lim, H. L., Choo, M., Tang, W.Q., Tan, A.H., Nguyen-Khuong, T., Tan, M. H. & Ng, S. K. (2019). A human expression system based on HEK293 for the stable production of recombinant erythropoietin. *Scientific Reports*, *9*(1), 16768.

Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., Weiss, R.L., Borkovich, K.A. & Dunlap, J. C. (2006). A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(27), 10352-10357.

Chávez-Velazco, H. (2022). *Estudio de la función de la MAPK codificada por el gen Pc13g11680 de Penicillium chrysogenum y su relación con la vía de transducción de señal de las proteínas G heterotriméricas.* https://doi.org/10.24275/uami.z890rt537

Chee, J. Y., & Chin, C. F. (2015). Gateway Cloning Technology: Advantages and drawbacks. *Cloning & Transgenesis*, *04*(01).

Dammen-Brower, K., Epler, P., Zhu, S., Bernstein, Z. J., Stabach, P. R., Braddock, D. T., Spangler, J.B., & Yarema, K. J. (2022). Strategies for glycoengineering therapeutic proteins. *Frontiers in Chemistry*, *10*, 863118.

Davis, R. H., & De Serres, F. J. (1970). Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. En *Methods in Enzymology* (Vol. 17, pp. 79–143).

De los Ríos-Morales, L. A., Guevara-Arismendy, N. M., Vizcaíno-Carruyo, J. C., & Toro-Montoya, A. I. (2021). Eritropoyetina (EPO). *Medicina & Laboratorio*, *24*(4), 344-347.

Dogaris, I., Vakontios, G., Kalogeris, E., Mamma, D., & Kekos, D. (2009). Induction of cellulases and hemicellulases from Neurospora crassa under solid-state cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. *Industrial Crops and Products*, *29*(2-3), 404-411.

Eggold, J. T., & Rankin, E. B. (2019). Erythropoiesis, EPO, macrophages, and bone. *Bone*, *119*, 36-41.

Elliott, S. G., Foote, M., & Molineux, G. (2009). *Erythropoietins, erythropoietic factors, and erythropoiesis: Molecular, Cellular, Preclinical, and Clinical Biology*. Springer Science & Business Media.

Farinas, C. S. (2015). Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 52*, 179-188.

Goh, J. S. Y., Liu, Y., Liu, H., Chan, K. F., Wan, C., Teo, G., Zhou, X., Xie, F., Zhang, P., Zhang, Y., & Song, Z. (2013). Highly sialylated recombinant human erythropoietin production in large-scale perfusion bioreactor utilizing CHO-gmt4 (JW152) with restored GnT I function. *Biotechnology Journal*, *9*(1), 100–109.

Gómez, D. E. (2020). Evaluación de la expresión del hetereceptor EPO-R/βCR (CD131) en células de riñón de humano en hipoxia. *CIATEJ*

Haase, V. H. (2013). Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Reviews, 27*(1), 41-53.

Hamilton, S. R., Bobrowicz, P., Bobrowicz, B., Davidson, R. C., Li, H., Mitchell, T., Nett, J. H., Rausch, S., Stadheim, T. A., Wischnewski, H., Wildt, S., & Gerngross, T. U. (2003). Production of Complex Human Glycoproteins in Yeast. *Science*, *301*(5637), 1244–1246.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, *166*(4), 557-580.

Havlik, D., Brandt, U., Bohle, K., & Fleißner, A. (2017). Establishment of *Neurospora crassa* as a host for heterologous protein production using a human antibody fragment as a model product. *Microbial Cell Factories*, *16*(1), 128.

Honda, S., Eusebio-Cope, A., Miyashita, S., Yokoyama, A., Aulia, A., Shahi, S., Kondo, H., & Suzuki, N. (2020). Establishment of *Neurospora crassa* as a model organism for fungal virology. *Nature Communications*, *11*(1), 5627.

Huang, X., Chen, G., Wu, L., Zou, Y., Zhang, L., Li, S., ... & Chen, C. (2025). Coordinated regulation of pH alkalinization by two transcription factors promotes fungal commensalism and pathogenicity. *Nature Communications*, *16*(1), 7855.

Inoue, N., Takeuchi, M., Ohashi, H., & Suzuki, T. (1995). The production of recombinant human erythropoietin. In *Biotechnology Annual Review* (Vol. 1, pp. 297-313).

In-Fusion ® cloning: accuracy, not background. (2018). BioTechniques, 64(4), 189–191.

Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S. D., Kaufman, R. J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S.S., Hewick, R., Fritsch, E. F., Kawakita, M., Shimizu, T., & Miyake, T. (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*, *313*(6005), 806-810.

Jankowski, M. S., Chase, Z. A., & Hurley, J. M. (2020). From genetics to molecular oscillations: the circadian clock in *Neurospora crassa*. *Genetics and Biotechnology*, 77-103.

Jelkmann, W. (2007a). Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *European Journal of Haematology*, *78*(3), 183-205.

Jelkmann, W. (2007b). Recombinant EPO production—points the nephrologist should know. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, *22*(10), 2749–2753.

Jelkmann, W. (2013). Physiology and pharmacology of erythropoietin. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, *40*(5), 302-309.

Jiménez, V., Guimil, R., de la Fuente, J., Lleonard, R., Rubiera, R., & Villegas, R. (1991). Síntesis total del gen de la eritropoyetina humana. *Biotecnología Aplicada*, *8*(3), 326-334.

Kalantar-Zadeh, K. (2017). History of erythropoiesis-stimulating agents, the development of biosimilars, and the future of anemia treatment in nephrology. *American Journal of Nephrology*, *45*(3), 235-247.

Kaplan, K., Levkovich, S. A., DeRowe, Y., Gazit, E., & Laor Bar-Yosef, D. (2024). Mind your marker: the effect of common auxotrophic markers on complex traits in yeast. *The FEBS Journal*, *291*(10), 2209-2220.

Kasap, M., Torol, S., & Gacar, G. (2008). Comparison of electrocompetencies of some commonly used laboratory strains of *Escherichia coli*. *Journal of Applied Biological Sciences*, *2*(2), 19-22.

Keenan, R. J., Freymann, D. M., Stroud, R. M., & Walter, P. (2001). The signal recognition particle. *Annual Review of Biochemistry*, *70*(1), 755-775.

Krishna, C. (2005). Solid-state fermentation systems—an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, *25*(1-2), 1-30.

Kuo, H. C., Hui, S., Choi, J., Asiegbu, F. O., Valkonen, J. P., & Lee, Y. H. (2014). Secret lifestyles of *Neurospora crassa*. *Scientific Reports*, *4*(1), 5135.

Landi, C., Paciello, L., de Alteriis, E., Brambilla, L., & Parascandola, P. (2011). Effect of auxotrophies on yeast performance in aerated fed-batch reactor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *414*(3), 604-611.

Lee, J. S., Ha, T. K., Lee, S. J., & Lee, G. M. (2012). Current state and perspectives on erythropoietin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *95*, 1405-1416.

Lin, F. K., Suggs, S., Lin, C. H., Browne, J. K., Smalling, R., Egrie, J. C., Chen, K.K., Fox, G. M., Martin, F. Stabinsky, Z., Basrawi, S. M., Lai, P. H., & Goldwasser E. (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *82*(22), 7580-7584.

Liu, D., Garrigues, S., & de Vries, R. P. (2023). Heterologous protein production in filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *107*(16), 5019-5033.

Lizardi-Jiménez, M. A., & Hernández-Martínez, R. (2017). Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. *3 Biotech*, *7*(1), 44.

Maheshwari, R. (1999). Microconidia of *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology*, *26*(1), 1-18.

Maleki, A., Roohvand, F., Tajerzadeh, H., Khanahmad, H., Nobari, M. B., Beiruti, A., & Najafabadi, A. R. (2010). High expression of methylotrophic yeast-derived recombinant human erythropoietin in a pH-controlled batch system. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, *2*(4), 197.

Mattedi, A., Sabbi, E., Farda, B., Djebaili, R., Mitra, D., Ercole, C., Cacchi, P., Del Gallo, M. & Pellegrini, M. (2023). Solid-state fermentation: Applications and future perspectives for biostimulant and biopesticides production. *Microorganisms*, *11*(6), 1408.

Metzenberg, R. L., & Glass, N. L. (1990). Mating type and mating strategies in *Neurospora*. *Bioessays*, *12*(2), 53-59.

Miao, Y., Chen, X., Li, T., Zhu, H., Tang, S., Liu, D., & Shen, Q. (2020). Proteomic analysis reflects an environmental alkalinization-coupled pH-dependent mechanism of regulating lignocellulases in *Trichoderma guizhouense* NJAU4742. *Biotechnology for Biofuels*, *13*(1), 6.

Miller, J.H. (1972). Experiments in Molecular Genetics (pp. 352-355). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Miyake, T., Kung, C. K., & Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry*, *252*(15), 5558-5564.

Mora-Pérez, C. J., Sánchez-Ruiz, M. C., Salgado-Bautista, D., Carrasco-Navarro, U., & Favela-Torres, E. (2024). Growth and invertase production by *Neurospora crassa* in submerged and solid-state cultures. *Mexican Journal of Biotechnology*, *9*(3), 20-35.

Park, J., Throop, A. L., & LaBaer, J. (2015). Site-Specific recombinational cloning using Gateway and In-Fusion cloning schemes. *Current Protocols in Molecular Biology*, *110*(1), 3.20.1-3.20.23.

Pauwels, K., Herman, P., Van sVaerenbergh, B., Dai Do Thi, C., Berghmans, L., Waeterloos, G., Bockstaele, D.V., Dorsch-Häsler, K., Sneyers, M. (2007). Animal cell cultures: risk assessment and biosafety recommendations. *Applied Biosafety*, *12*(1), 26-38.

Pérez-Pérez, W. D. (2022) *Regulación de la respuesta al estrés oxidante, el metabolismo secundario y la diferenciación mediante factores transcripcionales del tipo ap-1 en Penicillium chrysogenum.* https://doi.org/10.24275/uami.6108vb68d

Raju, N. B. (2009). *Neurospora* as a model fungus for studies in cytogenetics and sexual biology at Stanford. *Journal of Biosciences*, *34*(1), 139-159.

Rasmussen-Wilson, S. J., Palas, J. S., Wolf, V. J., Taft, C. S., & Selitrennikoff, C. P. (1997). Expression of a plant protein by *Neurospora crassa*. *Applied and environmental microbiology*, *63*(9), 3488-3493.

Roche, C. M., Loros, J. J., McCluskey, K., & Glass, N. L. (2014). *Neurospora crassa*: looking back and looking forward at a model microbe. *American Journal of Botany*, *101*(12), 2022-2035.

Ruger-Herreros, C., & Corrochano, L. M. (2020). Conidiation in *Neurospora crassa*: vegetative reproduction by a model fungus. *International Microbiology*, *23*(1), 97-105.

Russo, V. E., Brody, S., Cove, D., Ottolenghi, S., Russo, V. E., & Pandit, N. N. (1992). Development in *Neurospora crassa*. *Development: The Molecular Genetic Approach*, 88-102.

Salgado-Bautista, D. A., Favela-Torres, E., Mora-Pérez, C. J, Cerón-Moreno, M. F., Sánchez-Ruiz, C. M., Riquelme, M. & Carrasco-Navarro, U. (2025, 02 de octubre). *Neurospora crassa*: impacto del tipo de cultivo y la concentración de nutrientes en el secretoma. [Sesión de Congreso, área VIII: Biotecnología microbiana]. XXI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Oaxaca, México.

Sethuraman, N., & Stadheim, T. A. (2006). Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, *17*(4), 341-346.

Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *44*(1), 13-18.

Soyaslan, E. Ş., & Çalık, P. (2011). Enhanced recombinant human erythropoietin production by Pichia pastoris in methanol fed-batch/sorbitol batch fermentation through pH optimization. *Biochemical Engineering Journal*, *55*(1), 59-65.

Spivak, J. L. (1993). Recombinant erythropoietin. *Annual Review of Medicine*, *44*(1), 243-253.

Stockmann, C., & Fandrey, J. (2006). Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *33*(10), 968-979.

Sun, J., Phillips, C. M., Anderson, C. T., Beeson, W. T., Marletta, M. A., & Glass, N. L. (2011). Expression and characterization of the *Neurospora crassa* endoglucanase GH5-1. *Protein expression and purification*, *75*(2), 147-154.

Teh, S. H., Fong, M. Y., & Mohamed, Z. (2011). Expression and analysis of the glycosylation properties of recombinant human erythropoietin expressed in *Pichia pastoris*. *Genetics and Molecular Biology*, *34*, 464-470.

Tóthová, Z., Tomc, J., Debeljak, N., & Solár, P. (2021). STAT5 as a key protein of erythropoietin signalization. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(13), 7109.

Vogel, H. J. (1956). A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genetics Bulletin*, *13*, 42-43.

Winearls, C. G. (1998). Recombinant human erythropoietin: 10 years of clinical experience. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 13(90002), 3–8.

Yafetto, L. (2022). Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. *Heliyon*, *8*(3).

Yu, S., Wang, Y., Li, X., Yu, F., & Li, W. (2017). The factors affecting the reproducibility of micro-volume DNA mass quantification in Nanodrop 2000 spectrophotometer. *Optik*, *145*, 555-560.

Zheng, L., Yu, X., Wei, C., Qiu, L., Yu, C., Xing, Q., Fan, Y., & Deng, Z. (2020). Production and characterization of a novel alkaline protease from a newly isolated *Neurospora crassa* through solid-state fermentation. *Lwt*, *122*, 108990.

Casa abierta al tiempo

Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00334
Matrícula: 2233803884

Producción de eritropoyetina humana en Neurospora crassa.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 16:00 horas del día 16 del mes de diciembre del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO
DR. JUAN GABRIEL VIGUERAS RAMIREZ
DR. CHRISTIAN JESUS MORA PEREZ
DRA. MARIA EUGENIA HIDALGO LARA



ADRIAN GUERRERO GUZMAN
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

DE: ADRIAN GUERRERO GUZMAN

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH ARENAS RIOS

PRESIDENTE

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO

VOCAL

DR. JUAN GABRIEL VIGUERAS RAMIREZ

VOCAL

DR. CHRISTIAN JESUS MORA PEREZ

SECRETARIA

DRA. MARIA EUGENIA HIDALGO LARA