

PERSPECTIVAS ACTUALES DEL USO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y SU IMPORTANCIA EN LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA E INDUSTRIAL

CURRENT PERSPECTIVES ON THE USE OF RECOMBINANT PROTEINS AND THEIR IMPORTANCE IN SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH

Guevara-Hernández E¹, López-Zavala AA¹, Jiménez-Gutiérrez LR¹ y Sotelo-Mundo RR^{1,2,*}

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a Ejido La Victoria Km 0.6. PO Box. 1735. Hermosillo, Sonora, 83304, México. | ²Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales. Universidad de Sonora. Blvd. Rosales y Blvd. Luis Encinas. Hermosillo, Sonora 83000, México.

RESUMEN

El descubrimiento de la estructura y el mecanismo de replicación del ADN han permitido el desarrollo de técnicas biomoleculares para su manipulación, gracias a estos avances es posible sintetizar proteínas en organismos en los que no se encuentran de manera natural (sobreexpresión heteróloga). A las proteínas producidas de esta manera se les conoce como proteínas recombinantes (PR).

Las PR se pueden producir en una gran variedad de sistemas biológicos, como bacterias, levaduras y hasta células eucariontes. Comercialmente están disponibles un gran número de sistemas de expresión y uno de los más utilizados es el sistema basado en la ARN polimerasa del *fago T7*. Las PR pueden tener características estructurales y funcionales muy similares a las proteínas naturales y por lo general se producen con alta eficiencia. Sin embargo, algunas PR no son funcionales o sufren problemas de plegamiento cuando se expresan en células procariontes, formando agregados moleculares que se conocen como cuerpos de inclusión. La coexpresión con otras proteínas, como las chaperonas o el uso de cepas modificadas para la sobreexpresión, son algunas de las estrategias utilizadas para evitar la formación de agregados. A pesar de estas limitantes, la tecnología de PR es ampliamente utilizada en investigación y en la industria farmacéutica y alimentaria. Esta revisión tratará sobre los principales aspectos del proceso de producción de PR y sus aplicaciones.

Palabras claves: Proteínas recombinantes, sobreexpresión heteróloga, plásmidos, biofármacos, sobreexpresión de proteínas.

ABSTRACT

The discovery of DNA's structure has allowed the development of molecular techniques for its manipulation. With these advances it is possible to synthesize proteins in organisms that are not found naturally (called protein heterologous over expression). A protein produced in this way is known as recombinant proteins (PR), since it is the product of recombinant DNA. The PR can be produced in a variety of systems, like bacteria, yeast and eukaryotic cells. Likewise, there are several expression systems available; being the system based on phage T7 RNA polymerase one of the most

used. Usually, PR may have similar structural and functional properties as the natural protein, and they are produced in high yield. However, some PR is difficult to obtain due to the formation and accumulation of aggregates (inclusion bodies). The chaperone co-expression and the use of modified host strains are some strategies used to solve some of these problems. Despite these limitations, PR technology has been widely used in different industries such as pharmaceuticals, food, among others. On the other hand, the use of PR has enabled major advances in the understanding of diverse cellular processes in scientific research.

Keywords: Recombinant proteins, plasmids, heterologous expression, protein expression

INTRODUCCIÓN

El ácido desoxirribonucleico (ADN) contiene la información necesaria para la síntesis de proteínas. El descubrimiento del código genético abrió la posibilidad de obtener péptidos y/o proteínas a gran escala a partir de diversos organismos en los cuales no se producen de manera natural. A las proteínas obtenidas de esta manera se les conoce como PR. Éstas se pueden producir en microorganismos como bacterias, hongos, virus y levaduras, así como en líneas celulares cultivables de insectos, plantas y de mamíferos (Jonasson *et al.*, 2002; Palomares *et al.*, 2004), sistemas de expresión de proteínas "sin células" y también en animales y plantas transgénicas (Farrokhi *et al.*, 2009).

La sobreexpresión de PR ofrece la ventaja de producir grandes cantidades de la proteína de interés con características similares a la proteína natural y de manera relativamente fácil y rápida. Esta tecnología cuenta con al menos 35 años y por su aplicación tanto en la industria farmacéutica y alimentaria, como en la investigación científica, se encuentra entre los desarrollos más importantes del siglo XX (Porro *et al.*, 2005).

El procedimiento para producir una PR consiste en introducir el ADN que codifica para la proteína de interés en un vector de sobreexpresión (plásmidos, virus, cósmidos). El vector contiene un origen de replicación que le permite copiarse dentro de la célula hospedera, una región promotora que permite la producción de la proteína de interés, un sitio de clonación múltiple (SCM), que es una región que con-

tiene diversos sitios de restricción que permiten la inserción de ADN entre ellos y en algunos casos, genes de resistencia a antibióticos y genes reporteros, que facilitan la selección de las colonias de bacterias que tendrían el vector con la información genética insertada.

Por ejemplo, para crear un plásmido recombinante, se lleva a cabo un procedimiento de ligación que permite insertar dentro del SCM del vector, un segmento de ADN que corresponde al marco de lectura funcional, que contiene la información para la generación de la proteína de interés. Al producto de este vector, más el fragmento de ADN codificante (inserto), se denomina "construcción". El siguiente paso es la "transformación", ésta se realiza al insertar la construcción dentro de la célula hospedera y ésta se convierte en una fábrica celular de la proteína de interés (Palomares *et al.*, 2004). La bacteria *Escherichia coli* es uno de los sistemas de sobreexpresión más utilizados para la producción de PR. Algunas ventajas que ofrece son su rápida reproducción, utiliza medios de cultivo relativamente baratos, buen manejo en fermentaciones de alta densidad y fácil escalamiento. Además, ha sido uno de los organismos más utilizados como modelo de estudio, debido a esto se ha sido caracterizado ampliamente y se han desarrollado numerosas herramientas que han facilitado su clonación y expresión genética (Baneyx y Mujacic, 2004).

Otra ventaja del uso de las PR es que se puede hacer mutagénesis dirigida para modificar su secuencia de aminoácidos, algunos ejemplos de estas técnicas son: la PCR de extensión por sobreposicionamiento (OE-PCR por sus siglas en inglés), mutagénesis de casete, el método de Kunkel entre otras. Esto permite cambiar la secuencia de aminoácidos y conferir o suprimir características específicas que se deseen estudiar, como la estabilidad térmica, la inmunogenicidad, propiedades estructurales o alguna otra de interés industrial, médico o farmacológico (Palomares *et al.*, 2004).

Con los avances en el conocimiento de biología molecular y biotecnología, es relativamente sencillo producir PR. Muchas proteínas pueden ser obtenidas con algún método que utilice la tecnología de la PR. Sin embargo, antes de iniciar un proceso de producción, se debe establecer un protocolo adecuado en base a las características de la PR que se desea expresar y esto definirá, por ejemplo: el sistema de sobreexpresión, el vector de sobreexpresión, si se expresará la proteína completa o algún dominio, las posibles dificultades que se puedan presentar en el proceso, las estrategias de purificación y almacenamiento de la PR.

En este artículo se hará una breve descripción de las principales técnicas de sobreexpresión de PR y se revisarán sus campos de aplicación en el ámbito científico e industrial, así como sus tendencias y perspectivas.

BASES DE DATOS DE SECUENCIAS GENÉTICAS

En los últimos años los avances en la secuenciación de genes han culminado en la elucidación de la secuencia completa del genoma humano, así como de otros organismos. Esta información se ha depositado en bases de datos

electrónicas disponibles para la comunidad científica, organizadas en librerías que contienen los genomas completos, por ejemplo, la Librería Mayor de Genomas Microbianos (EMGLib, por sus siglas en inglés, <http://pbil.univ-lyon1.fr/emglib/emglib.html>) contiene todos los genomas de bacterias secuenciados a la fecha (Perrière *et al.*, 1999).

Existe un gran número de páginas electrónicas con bases de datos de genes, difieren básicamente en la información proporcionada, ya sea por el tipo de organismo de estudio o por la aplicación y estudios en los que se han enfocado. Una de las bases de datos más utilizada por la comunidad científica es la del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Esta base de datos almacena la información referente a secuencias genómicas en el Banco de Genes (GenBank). Además, contiene un índice de artículos científicos y una recopilación de enfermedades genéticas humanas (Perrière *et al.*, 1999).

Otras bases de datos disponibles y de libre acceso son: El banco de datos de proteínas (PDB, por sus siglas en inglés; <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>), la iniciativa de Estructura de Proteínas del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NHI por sus siglas en inglés, <http://www.nigms.nih.gov/Initiatives/PSI/>) y la base de datos SPINE del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI, por sus siglas en inglés, <http://www.ebi.ac.uk/euprojects/index.html>). Estas bases de datos proporcionan la información de los genes que codifican para la proteína de interés.

En algunos casos la información de la región codificante está completa, pero en otros, se pueden encontrar etiquetas de fragmentos expresados (conocidas como *EST*, por sus siglas en inglés). Estas regiones son de gran utilidad para completar la región codificante de la proteína que se desea estudiar y a partir de allí iniciar con el proceso de producción de PR. Esta propiedad es muy importante, ya que se puede investigar una proteína determinada de un organismo sin que sea necesario conocer su genoma completo, por ejemplo, se puede hacer una búsqueda de secuencias similares conocidas de otros organismos en estas bases de datos y es posible encontrar el gen completo, o bien sólo fragmentos, que mediante el uso de primers degenerados (que son formados a partir de secuencias conservadas en todos los organismos) se pueden obtener los fragmentos restantes del gen mediante la técnica del PCR.

SÍNTESIS DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

La ARN polimerasa (ARNpol) es una enzima que realiza una de las funciones más importantes de la célula: la transcripción del ADN. Este es el proceso por el cual se genera una copia de ARN mensajero (ARNm) a partir de un molde de ADN. En eucariontes y procariontes este proceso se lleva a cabo por un sistema complejo de proteínas que conforman la ARNpol, sin embargo, en organismos como los bacteriófagos (p.ej. *fago T7*), la ARNpol es menos compleja: se compone por una sola subunidad y es capaz de realizar todo el proceso de transcripción, como su homóloga en organismos superiores.

Otra característica importante de esta ARNpol es que presenta una elevada velocidad de transcripción y sus regiones promotoras son altamente específicas (McAllister y Raskin, 1993; Tunitskaya y Kochetkov, 2002). Estas características hacen a la ARNpol del *fago T7* (T7-ARNpol) un excelente modelo para implementarse en sistemas de expresión de PR, ya que en estos sistemas se requiere de una alta eficiencia de polimerización de nucleótidos y al mismo tiempo una elevada capacidad de regulación sobre su función.

Los sistemas de expresión basados en la T7-ARNpol, fueron creados para la producción de PR en *E. coli*. El sistema de sobreexpresión pET[®] que utiliza esta enzima es el más conocido comercialmente para la sobreexpresión de PR (Studier y Moffatt, 1986). Como se mencionó anteriormente, esta polimerasa posee una alta especificidad por su región promotora, asimismo, también tiene una alta capacidad de procesamiento, de regulación y funciona adecuadamente en *E. coli* (Studier y Moffatt, 1986). En el sistema pET[®] se usa una cepa de *E. coli* llamada BL21, que contiene el gen de la T7-ARNpol. Para tener control de la síntesis de la PR y dado que es más eficiente este proceso durante la fase exponencial, la región promotora del vector generalmente está bajo el control del operador *lac*, el represor *lacI* se encuentra presente bloqueando la expresión de la T7-ARNpol y por lo tanto, también la expresión de la proteína de interés. Al añadir un inductor como el isopropilo de tiogalctósido (IPTG), el promotor deja de estar reprimido y se inicia la síntesis de la PR.

El sistema T7 no es infalible, ya que se pueden presentar bajos niveles de sobreexpresión de la proteína de interés. Si la proteína es tóxica para la bacteria, ésta sufre lisis y el cultivo no crece adecuadamente. En otros casos, la

proteína de interés no puede detectarse, tanto en la fracción soluble como en la insoluble. Sin embargo cuando el sistema T7 funciona correctamente, se puede tener rendimientos de hasta el 50 % de la proteína recombinante con respecto a la proteína total de la bacteria (Changchien *et al.*, 2000; Studier *et al.*, 1990). Por ello, se han desarrollado alternativas en el diseño de vectores de sobreexpresión, algunos de ellos contienen diferentes secuencias cercanas al sitio de clonación que expresan diversas etiquetas de fusión ("tags", en inglés), que facilitan la purificación, solubilidad o transporte al periplasma de las proteínas que se desea expresar, por ejemplo, los vectores pET14-16 que contienen una etiqueta de fusión de histidinas que facilita la purificación por medio de cromatografía de afinidad a metales (IMAC), los vectores de sobreexpresión pET32 y pET41-42 contienen una etiqueta de fusión con tiorredoxina y GST (glutatión S-transferasa) que facilita la solubilidad de algunas proteínas y también su purificación. En el mercado existen un gran número de vectores que ofrecen una alternativa al sistema pET, estos contienen diferentes características que se adecúan a casos particulares de sobreexpresión. Por mencionar algunos, se encuentran los vectores con diferentes promotores como el T5, ramnosa, arabinosa, entre otros. El vector pCold que es usado para proteínas que presentan problemas de solubilidad en sistemas basados en el sistema T7 al disminuir la temperatura de sobreexpresión. Puede contener también secuencias para favorecer el rendimiento de la proteína que se desea expresar, por ejemplo, una secuencia con proteínas chaperonas, para mejorar el rendimiento y plegado, o bien con lisozima, para ofrecer estabilidad a algunas proteínas y facilitar la lisis de células, vectores con diferentes inductores que permiten la

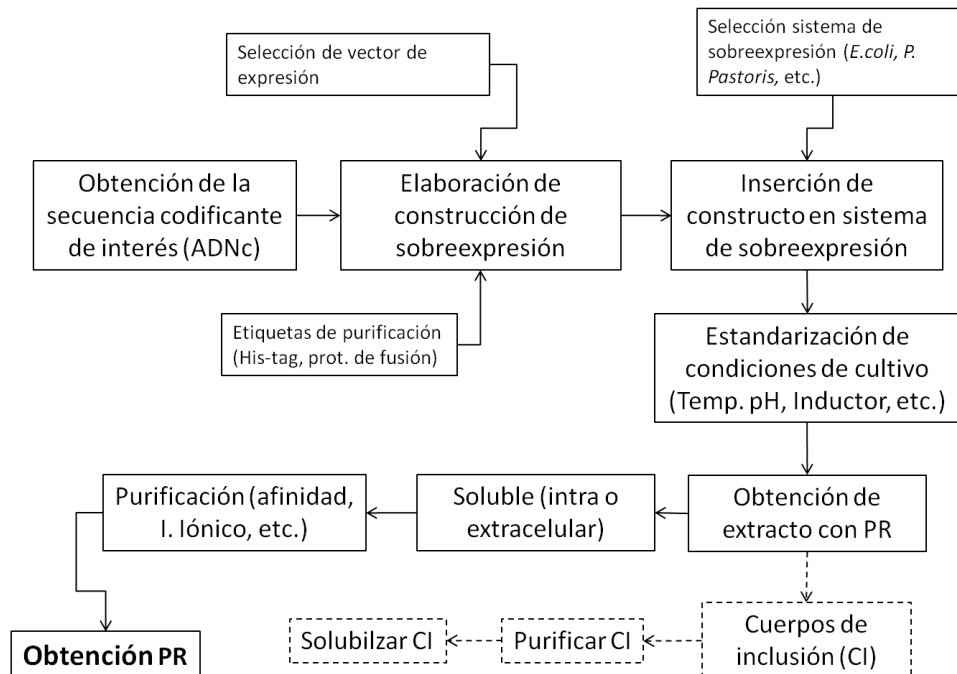


Figura 1. Diagrama general de producción y obtención de PR.

Figure 1. General diagram for recombinant proteins production.

expresión de proteínas tóxicas, como el sistema Rhamex® de DNA 2.0. El proceso general para la producción de proteínas recombinantes se describe gráficamente en la figura 1.

Primero, se puede obtener el ADN complementario (ADNc) mediante la transcripción reversa del ARN mensajero de interés y su posterior secuenciación para confirmar la identidad. Posteriormente se utilizan enzimas de restricción para clonar el ADNc (o fragmento de interés) en un vector de expresión basado T7-ARNpol (sistema pET®). En caso de ser necesario, esos sitios únicos de restricción se pueden introducir mediante PCR con iniciadores que se extiendan corriente arriba y abajo de la región codificante de interés (Barron *et al.*, 2007; Geisse y Fux, 2009; Palomares *et al.*, 2004).

Algunos de los vectores de expresión contienen una etiqueta en el amino o en el carboxilo terminal. Generalmente se utilizan etiquetas de histidinas, argininas o proteínas de fusión, como la GST o la tiorredoxina, lo que facilita en gran medida la purificación de la PR mediante cromatografía de afinidad o de intercambio iónico para el caso de la etiqueta de argininas (Terpe, 2003). Para algunas aplicaciones como la cristalografía de proteínas o la generación de anticuerpos, esta inserción debe ser eliminada y esto se logra incluyendo un sitio de corte para una proteasa específica. Algunos ejemplos son la enterocinasa que reconoce una secuencia de 5 aminoácidos (DDDDK), la proteasa TEV (ENLYFGS) y la proteasa PreScission® (LEVLFG/GP).

Lo siguiente es transformar una cepa de *E. coli*, como la BL21, que sea compatible con el plásmido recombinante, formado por el vector de expresión pET® u otro utilizado, que contenga la región codificante de interés y seleccionar la cepas de acuerdo a los criterios de selección de antibióticos del vector (resistencia a ampicilina, kanamicina, etc.). Las bacterias se inoculan en caldo LB o algún otro medio previamente optimizado para *E. coli* BL21 transformadas con el constructo. Al llegar a la fase exponencial (cuando la densidad óptica del cultivo esté entre 0,4-0,8 a 600 nm) se añade el inductor. Se continúa con el crecimiento del cultivo proveyendo aireación suficiente para mantener una adecuada oxigenación en el medio y se determina el tiempo más adecuado de expresión, mediante análisis de electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras SDS-PAGE (Lesley y Wilson, 2005). Para finalizar, se recupera la biomasa y se purifica la PR mediante lisis celular y técnicas cromatográficas. En algunos casos se puede secretar la PR al medio de cultivo mediante el uso de vectores especialmente diseñados para ello.

Las proteínas que mejor se expresan en bacterias y en particular en el sistema pET® son las citoplasmáticas, es decir, aquellas que llevan a cabo su función en el citosol. Proteínas de membrana, secretadas o que contengan modificaciones post-traduccionales, como glicosilaciones, fosforilaciones amidaciones, formación de puentes disulfuro, etc. son problemáticas al sobreexpresarse en *E. coli*.

La producción de PR es un proceso relativamente sencillo y ofrece muchas ventajas. Sin embargo, uno de los principales obstáculos es obtener la PR en su forma soluble y funcional. Muchas proteínas son complejos multi-proteicos y

a menudo requieren interactuar con otras moléculas para su correcto plegamiento. En ocasiones, algunas proteínas no se pueden obtener en su forma funcional mediante procesos clásicos de PR.

Actualmente, es posible mejorar el plegado de la PR al co-expresarse con otras proteínas con las que interactúa (Gräslund *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que la co-expresión de chaperonas facilitan el plegamiento de la PR de interés (Deuerling y Bukau, 2004). Por ejemplo, se ha reportado que el vector pG-Tf2 (Takara Bio Inc.) favorece la producción y el correcto plegado de PR que no había sido posible producirlas por técnicas de sobreexpresión clásicas, como es el caso de la lisozima y otras. Este vector contiene una combinación de las chaperonas tipo GroEL-GroES y Tig. Si bien se ha demostrado su efectividad a nivel laboratorio, aun hacen falta más estudios para evaluar su uso a escala industrial (Gräslund *et al.*, 2008).

En nuestro grupo de investigación se han producido proteínas recombinantes en su forma soluble y funcional, utilizando este sistema de expresión, como la lisozima del camarón (gamba) blanco *Litopenaeus vannamei* (de-la-Re-Vega *et al.*, 2004), la timidilato sintasa del WSSV (White Spot Syndrome Virus, por sus siglas en inglés) (Arvizu-Flores *et al.*, 2009), la glutatión-S-transferasa (Salazar-Medina *et al.*, 2010), la nucleótido cinasa (Quintero-Reyes *et al.*, 2012), la timidina monofosfato cinasa del WSSV (Guevara-Hernandez *et al.*, 2012), entre otras. Para el caso de la lisozima, que contiene enlaces disulfuros en su estructura, se establecieron las condiciones de sobreexpresión (Figura 2) y replegamiento *in vitro* para obtener proteína soluble a partir de cuerpos de inclusión.

FÁBRICAS BIOLÓGICAS PARA LA PRODUCCION DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Se han desarrollado una gran variedad de sistemas de expresión, tanto procariontes como eucariontes para la producción de PR. Los organismos más utilizados son: bacterias, levaduras, insectos, plantas y células de mamíferos (Basile y Peticca, 2009). En algunos de ellos se utiliza el microorganismo completo (p.ej. *E. coli*) y en otros se utilizan células derivadas del organismo (p.ej. cultivos vegetales, células de insecto o de mamífero) o bien, se puede implementar la expresión de proteínas libre de células.

Los sistemas más utilizados para la producción de proteínas recombinantes en EUA y Europa son los microorganismos, con un 55 % (del cual 39 % corresponde a *E. coli* y un 15 % a levaduras) y células de mamífero, específicamente células de ovario de hámster (CHO), con un 35 % (Rader, 2008).

La bacteria *E. coli*, es uno de los sistemas más utilizados para la producción de PR. Esta bacteria tiene la capacidad de crecer rápidamente y con alta densidad en medios de cultivo de bajo costo. Además, en el mercado hay una gran disponibilidad de cepas mutantes, un ejemplo es el sistema BL21 de Invitrogen® que carece de las proteasas *lon* y *ompT*, esto re-

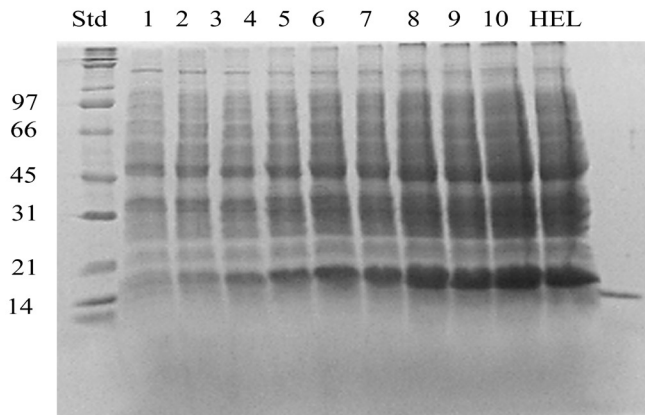


Figura 2. Cinética típica de sobre expresión de lisozima de camarón (*Litopenaeus vannamei*) en *E. coli*. La figura representa un gel de poliácridamida donde las proteínas se separan en condiciones desnaturizantes y reductoras y migran de acuerdo a su masa molecular. STD corresponde al estándar de masa molecular, el carril 1 corresponde al cultivo sin inducir, los carriles 2-10 corresponden a muestras colectadas de biomasa cada hora después de la inducción. El carril HEL corresponde a una muestra de lisozima de clara de huevo con una masa de 14 kDa.

Figure 2. Expression pattern of recombinant shrimp lysozyme (*Litopenaeus vannamei*) expressed as a recombinant form in *E. coli*. The figure shows a polyacrylamide gel under denaturing and reducing conditions, where all bacterial proteins are separated. The proteins migrate according to their molecular weight. STD corresponds to the molecular weight marker, lane 2 corresponds to uninduced bacteria, and lanes 2-10 correspond to samples taken each hour post induction. Lane labeled with HEL contains hen egg white lysozyme, which has a molecular weight of 14 kDa.

duce la degradación de las proteínas heterólogas expresadas en estas células y de vectores de expresión compatibles con *E. coli*.

E. coli no es capaz de realizar modificaciones post-traduccionales, necesarias para la mayoría de las proteínas de eucariotes. Sin embargo, existen algunos vectores que ayudan a realizar estas modificaciones. Por ejemplo, el vector pET12a⁺ contiene una etiqueta de señalización que permite que la PR se acumule en el periplasma de la bacteria (EMD Chemical/Novagen, USA).

Aunque no todas las PR pueden ser sintetizadas en *E. coli*, se ha logrado mejorar el rendimiento y la versatilidad de este microorganismo (Baneyx, 1999; Shokri *et al.*, 2003), cada línea celular puede presentarse de diferentes formas modificando algunas características de su genoma, por ejemplo, la designación DE3 en las bacterias, indica que están basados en la RNA polimerasa del fago T7 y por lo tanto, se encuentran bajo el control del promotor *LacUV5*, la designación pLysS, indica que la bacteria hospedera contiene el gen que codifica la lisozima T7, que es un inhibidor natural de la RNA

polimerasa T7 y que permite disminuir la sobreexpresión basal, haciendo más estable la expresión de la PR.

Algunos insertos que codifican para proteínas eucariotes contienen codones (codones raros) cuyos tripletes no se presentan naturalmente en *E. coli*, por lo que es necesario modificar la secuencia del inserto para incluir los codones que si se presentan en la bacteria. Una alternativa es usar las cepas de Novagen[®], Rosetta[™], Rosetta-Blue[™] y Rosetta-Gami[™], que contiene los tripletes para los codones raros (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). Otras líneas celulares, como Origami[™] y Origami[™]B presentan una mutación en los genes *trxB* y *gor* que favorecen la formación de puentes disulfuro en el citoplasma (<http://goo.gl/oRJkl>). Algunos ejemplos de PR producidas en esta bacteria son proteínas para usos industriales, como renina, amilasas, proteasas y celulasas, proteínas terapéuticas, como insulina, hormonas de crecimiento e interferones, entre muchas otras (Lesley y Wilson, 2005). Otras bacterias que también han sido utilizadas como modelo para la producción de PR son: *Lactococcus lactis* y *Bacillus subtilis*, pero en menor grado (Morello *et al.*, 2008; Nijland y Kuipers, 2008).

Otro de los organismos utilizados para producir PR son las levaduras. Las más usadas son *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*, en las cuales se han expresado cientos de proteínas diferentes (Cregg *et al.*, 2000; Mattanovich *et al.*, 2004; Porro *et al.*, 2005). Generalmente las levaduras, al igual que las líneas celulares de insectos y mamíferos se utilizan para sobreexpresar proteínas que son tóxicas o que no se pueden plegar correctamente en *E. coli* (Kost *et al.*, 2005; Oker-Blom y Vuento, 2003). Además, estos sistemas pueden realizar modificaciones post-traduccionales, excretar la PR al medio de cultivo y también se obtienen rendimientos mayores al 50 % (Gräslund *et al.*, 2008)

La expresión transitoria del gen (por sus siglas en inglés: TGE) en células de mamífero es una importante tecnología para la generación de PR. La TGE, cumple todos los requisitos en materia de cantidad y calidad de los productos. Para las líneas celulares CHO y HEK293 se han optimizado protocolos que permiten la producción de proteínas con un alto rendimiento (Geisse y Fux, 2009). Por otro lado, en el 2009, Basile y Peticca utilizaron al parásito *Leishmania tarentolae* como modelo para la expresión de genes heterólogos. La familia *Tripanosomatidaea* a la que pertenece este protozoo se caracteriza por ser ricos en glicoproteínas. Se ha reportado que las proteínas sobreexpresadas en este parásito presentan las glicosilaciones en la misma posición que las estructuras de las proteínas nativas. Si bien, su uso en la tecnología de PR es reciente, ya se han producido varias enzimas y receptores de membrana citoplasmática y además se pueden producir a nivel intracelular o pueden ser secretadas al medio de cultivo.

Entre los diferentes sistemas basados en tejidos vegetales, la producción de PR en semillas es la plataforma más utilizada. Este sistema ofrece varias ventajas, tales como: mínimo costo de producción, no propaga virus y patógenos de mamíferos, confiere un almacenamiento estable de la PR

y además, es capaz de realizar modificaciones post-traduccionales en las proteínas (Jamal *et al.*, 2009; Lau y Sun, 2009; Ahmad *et al.*, 2010).

El primer producto biofarmacéutico producido en células de plantas fue la hormona del crecimiento humana, producida en tabaco transgénico en 1986 (Barta *et al.*, 1986). Desde entonces, diversas especies de plantas, como cereales, legumbres, frutas y vegetales han sido utilizados para la producción de biofármacos, anticuerpos y vacunas (Miao *et al.*, 2008; He *et al.*, 2008).

No obstante, el principal obstáculo para la producción de PR en tejidos vegetales ha sido su bajo nivel de acumulación. Para solventar esta situación, se han implementado estrategias de transformación de los cloroplastos, expresión transitoria y fusión de proteínas (Ahmad *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha reportado que los tejidos de plantas son altamente influenciados por factores ambientales, como la temperatura, la luz, la salinidad, la sequía, la nutrición, los insectos y plagas (Jamal *et al.*, 2009).

Una alternativa es la producción de PR en células de plantas en biorreactores, ya que se pueden controlar las condiciones de producción, aumentar la consistencia y homogeneidad del producto, simplifica la purificación (especialmente de proteínas secretadas extracelularmente), reduce la contaminación potencial de endotoxinas y micotoxinas derivadas de las plantas y del suelo y minimiza el silenciamiento post-transcripcional de genes (PTGS) (Huang y McDonald, 2009).

El principal compartimento de almacenamiento de proteínas recombinantes de células de plantas generadas en bioreactores son las vacuolas (almacenamiento de proteínas en vacuolas, PVS por sus siglas en inglés). Ésta a su vez se divide en tres compartimentos morfológica y bioquímicamente diferentes: La matriz, la estructura globoide y la cristaloides. La matriz es el reservorio principal de proteínas solubles, la estructura globoide presenta un ambiente ácido que contiene ácido fítico o cristales de oxalato y la estructura cristaloides que puede estar conformada por proteínas de almacenamiento. Para que las proteínas recombinantes puedan alcanzar estos depósitos se pueden agregar señales específicas que se encuentran en las proteínas naturales, esto permite a su vez seleccionar el compartimento de almacenamiento para la proteína recombinante (Miao *et al.*, 2008).

Los "cuerpos grasos de las semillas" (OB por sus siglas en inglés), también son utilizados para la producción de PR en bioreactores. Algunas de las ventajas de este organelo, es que existen en diversos tejidos vegetales, como semillas, polen, frutas y oleaginosas. Además se pueden generar proteínas de fusión con oleosinas, que pueden ser purificadas fácilmente por centrifugación (Miao *et al.*, 2008).

En la técnica de la expresión libre de células todos los componentes necesarios para la replicación de ADN son aislados y usados con un templado, que puede ser ADN o RNA para generar la proteína. Una de las principales ventajas de este sistema es que se puede evitar la toxicidad que presentan algunas proteínas heterólogas en los sistemas de expresi-

ón en bacterias, promoviendo un correcto plegado en estos casos. Los sistemas de expresión libres de células más usados son los basados en extractos de *E. coli*, germen de trigo y sistemas derivados de células de mamífero (Farrokhi, 2009).

LIMITACIONES EN LA PRODUCCIÓN DE PR

A pesar de la importancia y al amplio uso de la tecnología de PR tanto en la industria farmacéutica como en la investigación, aún no se cuenta con una estrategia infalible para la obtención de PR.

Se han analizado una gran cantidad de variables y factores en el proceso de producción (temperatura, pH, oxígeno, cepas hospederas etc.) que se sabe están estrechamente relacionados con el rendimiento e integridad de la PR. También se ha evaluado la importancia de la composición del medio de cultivo (concentración, tipo y consumo de nutrientes, etc.) (Holmes *et al.*, 2009), por lo que es necesario establecer experimentalmente las condiciones óptimas para cada PR. A continuación se mencionan algunas de las dificultades y limitaciones que suelen presentarse en los protocolos de síntesis y purificación de estas proteínas:

1- La recombinación de un plásmido recombinante que codifica la PR en el genoma del hospedero. Esto puede tener como consecuencia la interrupción de genes importantes en el genoma del hospedero y dar origen a genotipos desconocidos que son incapaces de sintetizar la PR. En el mejor de los casos se puede producir la PR, pero con bajo rendimiento (Barron *et al.*, 2007).

2.- Deterioro de la fisiología celular del hospedero. El estrés por manejo es uno de los principales factores que afectan el desarrollo y crecimiento del hospedero (Sevastyanovich *et al.*, 2010). Otro factor importante es el estrés nutricional al que están sujetos los microorganismos hospederos. En conjunto, estos factores pueden ocasionar errores de transcripción que repercuten en la integridad de la PR. Estos errores aleatorios son difíciles de detectar, ya que producen una mezcla heterogénea de polipéptidos. Las proteínas alteradas pueden estar presentes en cantidades muy pequeñas, pero el número total de moléculas defectuosas podría ser sustancial en el rendimiento de la PR (Barron *et al.*, 2007; Mattanovich *et al.*, 2004).

3- Una inadecuada aireación del cultivo puede provocar limitaciones en la producción de aminoácidos y la estabilidad del plásmido (Holmes *et al.*, 2009).

Se han empleado varias estrategias para minimizar estas limitaciones. Barron y Piskavera (2007), desarrollaron alternativas a los protocolos estándar para minimizar el error durante la síntesis de las PR. Estos protocolos se basan en la inserción directa del material genético en el hospedero. Además incluyeron marcadores de selección negativa en combinación con los marcadores tradicionales.

Los procesos de automatización son de gran ayuda para establecer los métodos de control y calidad, adecuados durante la síntesis de la PR. Esto permite hacer reproducibles los protocolos de producción de PR y ejecutarlos con mayor facilidad (Acton *et al.*, 2005; Genomics-GTL-Roadmap, 2005).

Asímismo, se han desarrollado nuevas cepas de *E. coli*, más resistentes al manejo y al estrés producido por la sobreexpresión. Estas cepas incluyen mejores marcadores de selección o modificaciones en el metabolismo (baja producción de acetato) (Eiteman y Altman, 2006). Para mejorar el problema de plegamiento se han probado diferentes estrategias, como modificaciones en la fuerza del promotor, la temperatura de cultivo, optimización de codones raros (tARN) en la cepa Rosetta-Gami de *E. coli*; así como la co-expresión de chaperonas en cualquier tipo de cepa *E. coli* BL21(DE3) (Martínez-Alonso *et al.*, 2010). Sin embargo, es posible que la co-expresión de chaperonas pueda reflejarse en un bajo rendimiento de la PR (Martínez-Alonso *et al.*, 2010).

Con respecto a la recuperación de la PR, las proteínas de fusión y la adición de etiquetas de afinidad a metales han facilitado en gran medida los procesos de purificación de la PR (Jonasson *et al.*, 2002).

En la actualidad existe gran interés en producir PR para el uso de aplicaciones farmacéuticas, industriales o para el desarrollo de la investigación científica. Si bien, se han implementado un gran número de metodologías exitosas para la producción de PR, a menudo se presentan dificultades en las diferentes etapas de su proceso de producción. Por lo que es necesario determinar las condiciones ideales para la producción y recuperación de la PR que se está generando.

CAMPOS DE APLICACIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Desde sus inicios en la década de los 70, la industria biotecnológica del ADN recombinante ha crecido continuamente. Sus campos de aplicación se han expandido a diferentes ramas industriales, como la farmacéutica, ambiental,

textil, alimentaria y energética (Tabla 1).

La industria farmacéutica ha sido una de las más beneficiadas con la tecnología de producción de PR (Geisse y Fux, 2009). La insulina fue el primer biofármaco comercializado que se obtuvo mediante esta tecnología. Esta molécula ha sido valorada entre los 10 medicamentos más comercializados en el mundo en cuanto a producción y a las altas ganancias económicas que se derivan de su comercialización. Este biofármaco se produce bajo diferentes nombres comerciales, como humulina®, InsulinR®, Lantus® y Arasnep®, entre otros.

Desde mediados de la década pasada cientos de fármacos habían sido probados para el tratamiento de diversas enfermedades y actualmente más de 100 fármacos han sido aprobados desde el año 2000 a lo que va del presente año (<http://www.biopharma.com/approvals.html>) y se estima que para los próximos años los biofármacos representarán el 12 % del total de las ventas mundiales de medicamentos de prescripción (Tabla 2).

En México también se producen PR de interés farmacológico. Laboratorios Silanes S.A. de C.V. es uno de los pioneros a nivel mundial en la producción de anti-venenos (<http://www.silanes.com.mx/html/bioclon.html>), en colaboración con el Instituto Bioclon, comercializan varios faboterápicos para tratar picaduras de insectos y otros animales venenosos para el humano (Boyer *et al.*, 2009, Casasola *et al.*, 2009), aunque los faboterápicos no son PR, este laboratorio utiliza esta tecnología durante su desarrollo. Algunos de sus productos, como el Alacramyn® y el Antivipmyn® han sido aprobados por la FDA y son distribuidos en varios países.

Las industrias relacionadas con la producción de PR se han establecido prácticamente en todas las regiones

Tabla 1. Aplicaciones y beneficios Industriales de proteínas recombinantes. Tomado de: BIO-Report 2008.

Table 1. Applications and industrial benefits of recombinant proteins. Source: BIO-Report 2008.

Campo de aplicación	Usos	Beneficios
Industria farmacéutica	Producción de compuestos activos, intermediarios terapias.	Disminuye costos y tiempo de producción, fármacos más específicos, disminuye reacciones inmunológicas e infecciones
Aplicaciones ambientales	Detección de contaminantes mediante anticuerpos monoclonales	Más baratos y rápidos que las pruebas convencionales. Se pueden aplicar en campo
Industria papelera	Mejora el proceso de manufactura mediante el uso de enzimas	Disminuye la toxicidad de los residuos del procesamiento de la pulpa
Industria textil	Aplicaciones en la fabricación secado y terminación de productos, adición de enzimas en detergentes	Disminuye la toxicidad de residuos de producción, detergentes más efectivos
Industrias de los alimentos	Procesos de producción, generación de aditivos y conservadores	Mejora de procesos, calidad de productos, técnicas de análisis
Industria energética	Uso de enzimas en procesos de producción de biocombustibles	Generación de biocombustibles más limpios y a partir de desechos industriales o agrícolas

Tabla 2. Fármacos recombinantes aprobados en el mercado. Tomado de Drago-Serrano, 2006.

Table 2. Recombinant drugs approved for market. Source: Drago-Serrano, 2006.

Fármaco	Compañía	Año de aprobación
Kogenate	Bayer	1993
Nutropin	Genetech	1994
Norditropin	Novo Nordisk	1995
Puregon	N.V. Organon	1996
Benefix	Genetics Institute	1997
Insuman	Hoechst AG	1997
Apidra	Aventis	2004
Advate Factor VIII	Baxter AG	2004

del mundo con ganancias de miles de millones de dólares (Tabla 3). Tan solo en EUA, entre el 2009-2010 se registró un incremento record de 4,5 billones de dólares en este sector. Además, Se espera que este sector tenga un crecimiento del 1,5 % para el año 2018. Por esta razón se considera que este sector tendrá uno de los crecimientos más importantes de la industria privada para los EUA.

Por otro lado, la tecnología de la PR se ha utilizado para el estudio y comprensión de los diferentes mecanis-

Tabla 3. Ventas de productos biotecnológicos 2008. Tomada de Biotech Guide 2008.

Table 3. Gross sales of biotechnology products during 2008. Source: Biotech Guide 2008.

Segmento	Ventas (x10 ⁹ dólares)	Ejemplos
Bioenergética	26	Etanol, diesel
Ext. vegetales	24	Hidrocoloides (gomas, almidones industriales) aceites esenciales
farmacéuticos	12	Productos biocatalíticos, antibióticos, proteínas terapéuticas
Polímeros	12	Hule natural, PLA, polioles
Alimenticio	9	Acido cítrico, lisina, acido glutámico, Vit. B12, ácidos grasos poliinsaturados
Olequímico	9	Surfactantes, alcoholes y glicerol
Enzimático	2.5	Enzimas en detergentes, procesamiento de textiles, procesamiento de granos

mos celulares (Mathews, 1999; Smithies *et al.*, 1985). Una de las principales ventajas es que las PR se pueden obtener rápidamente y en abundancia. Esto permite tener acceso prácticamente ilimitado a la PR para realizar cualquier tipo de estudio relacionado con su función. Además, se pueden generar variantes a la proteína de interés mediante técnicas de mutación de ADN. En la mayoría de los casos, el costo de producción de PR es relativamente bajo respecto a la obtención de la proteína a partir de su fuente natural. Debido a esto, la tecnología de PR se ha convertido en una de las técnicas más utilizadas en diversos campos de la investigación científica. (Genomics:-GTL-Roadmap., 2005).

CONCLUSIÓN

Existe una gran variedad en sistemas de expresión y organismos hospederos para la producción de PR. Además, la complejidad y diversidad de las características físico-químicas de las proteínas, hace que sea necesario plantear una estrategia adecuada para tener una solución a los problemas que puedan surgir durante la síntesis de PR. Por lo tanto, los protocolos de purificación y estrategias deben ser elaborados para cada caso en particular. Los avances tecnológicos y científicos han permitido que la síntesis de PR sea una herramienta disponible para diversas necesidades. Cada vez son más las aplicaciones en las que las PR han sido utilizadas, siendo la industria farmacéutica y la alimentaria las más beneficiadas. Asimismo, en el ámbito científico el uso de las PR ha permitido entender y elucidar rutas metabólicas y mecanismos celulares que son importantes para el desarrollo de la vida. La mayoría de las estructuras de proteínas depositadas en el PDB, han sido obtenidas a partir de PR. Diversas ramas del conocimiento científico hacen uso constante de la tecnología del ADN recombinante, ya que permite obtener una proteína de interés de manera rápida y abundante. La aplicación de enzimas recombinantes a tratamientos ambientales depende del costo del proceso, además de no ser recomendable liberar al medio ambiente material genético recombinante conteniendo plásmidos con resistencia a antibióticos. Su aplicación como catalizador en procesos químicos es mas factible, en particular catalizando reacciones estereoselectivas sobre sustratos racémicos. Esta y cualquier otra aplicación debe considerar que el costo de producción y purificación de la PR compense la aplicación a realizar.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento otorgado por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) de México (proyecto CB-2009-131859) y por las becas para estudios doctorales otorgadas a los primeros tres autores. Agradecemos a la Dra. Ana María Calderón de la Barca su apoyo en la revisión del presente manuscrito.

REFERENCIAS

- Acton, T. B., Gunsalus, K. C., Xiao, R., Ma, L. C., Aramini, J., Baran, M. C., Chiang, Y. W., Climent, T., Cooper, B. y Denissova, N. G. 2005. Robotic cloning and protein production platform of the Northeast Structural Genomics Consortium. *Methods in Enzymology*. 394:210-243.
- Ahmad, A., Pereira, E. O., Conley, A. J., Richman, A. S. y Menassa, R. 2010. Green Biofactories: Recombinant Protein Production in Plants. *Recent Patents on Biotechnology* 4:242-259.
- Arvizu-Flores, A. A., Aispuro-Hernandez, E., Garcia-Orozco, K. D., Varela-Romero, A., Valenzuela-Soto, E., Velazquez-Contreras, E. F., Rojo-Dominguez, A., Yepiz-Plascencia, G., Maley, F. y Sotelo-Mundo, R. R. 2009. Functional identity of the active sites of crustacean and viral thymidylate synthases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 150:406-13.
- Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 10:411-21.
- Baneyx, F. y Mujacic, M. 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*. 22:1399-408.
- Barron, N., Piskareva, O. y Muniyappa, M. 2007. Targeted genetic modification of cell lines for recombinant protein production. *Cytotechnology*. 53:65-73.
- Barta A., Sommergruber, K., Thompson, D., Hartmuth, K., M.A., M. y Matzke, A. J. M. 1986. The expression of a nopaline synthase-human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology*. 6:347-357.
- Basile, G. y Peticca, M. 2009. Recombinant protein expression in *Leishmania tarentolae*. *Molecular Biotechnology*. 43:273-8.
- Boyer, L. V., Theodorou, A. A., Berg, R. A., Mallie, J., Chavez-Mendez, A., Garcia-Ubbelohde, W., Hardiman, S. y Alagon, A. 2009. Antivenom for critically ill children with neurotoxicity from scorpion stings. *New England Journal of Medicine*. 360:2090-2098.
- Casasola, A., Ramos-Cerrillo, B., De Roodt, A. R., Carbajal Saucedo, A., Chippaux, J. P., Alagon, A. y Stock, R. P. 2009. Paraspecific neutralization of the venom of African species of cobra by an equine antiserum against *Naja melanoleuca*: a comparative study. *Toxicon*. 53:602-608.
- Changchien, L. M., Garibian, A., Frasca, V., Lobo, A., Maley, G. F. y Maley, F. 2000. High-level expression of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* thymidylate synthases. *Protein Expression and Purification*. 19:265-270.
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J. y Higgins, D. R. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*. 16:23-52.
- De-La-Re-Vega, E., Garcia-Orozco, K. D., Calderon-Arredondo, S. A., Romo-Figueroa, M. G., Islas-Osuna, M. A., Yepiz-Plascencia, G. M. y Sotelo-Mundo, R. R. 2004. Recombinant expression of marine shrimp lysozyme in *Escherichia coli*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 7:298-304.
- Deuerling, E. y Bukau, B. 2004. Chaperone-assisted folding of newly synthesized proteins in the cytosol. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 39:261-277.
- Eiteman, M. A. & Altman, E. 2006. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *TRENDS in Biotechnology*, 24, 530-536.
- Farrokhi, N., Hrmova, M., Burton, R. A. & Fincher G. B. 2009. Heterologous and Cell Free Protein Expression Systems. *Methods in Molecular Biology*. 513:175-198.
- Geisse, S. & Fux, C. 2009. Recombinant protein production by transient gene transfer into Mammalian cells. *Methods Enzymol*, 463, 223-38.
- Genomics:Gtl-Roadmap. 2005. Protein production and characterization. Review of the Department of Energy Genomics:GTL Program. Washington D.C.
- Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R. y Ming, J. 2008. Protein production and purification. *Nature Methods*. 5:135-146.
- Guevara-Hernandez, E., Garcia-Orozco, K. D. y Sotelo-Mundo, R. R. 2012. Biochemical Characterization of Thymidine Monophosphate Kinase from white Spot Syndrome Virus: A Functional Domain from the Viral ORF454. *Protein and Peptide Letters*. 19:1220-1224.
- He, Z. M., Jiang, X. L., Qi, Y. y Luo, D. Q. 2008. Assessment of the utility of the tomato fruit-specific E8 promoter for driving vaccine antigen expression. *Genetica*. 133:207-214.
- Holmes, W. J., Darby, R. A., Wilks, M. D., Smith, R. y Bill, R. M. 2009. Developing a scalable model of recombinant protein yield from *Pichia pastoris*: the influence of culture conditions, biomass and induction regime. *Microbial Cell Factory*. 8-35.
- Huang, T. K. y McDonald, K. A. 2009. Bioreactor Engineering for Recombinant Protein Production in Plant Cell Suspension Cultures. *Biochemical Engineering Journal*. 45:168-184.
- Jamal, A., Ko, K., Kim, H. S., Choo, Y. K. y Joung, H. 2009. Role of genetic factors and environmental conditions in recombinant protein production for molecular farming. *Biotechnology Advances*. 27:914-923.
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P. A. y Stahl, S. 2002. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 35:91-105.
- Kost, T. A., Condreay, J. P. y Jarvis, D. L. 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*. 2:567-75.
- Lau, O. S. y Sun, S. S. 2009. Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. *Biotechnol Advances*. 27:1015-22.
- Lesley, S. A. y Wilson, I. A. 2005. Protein production and crystallization at the joint center for structural genomics. *Journal of Structural and Functional Genomics*. 6:71-79.
- Martinez-Alonso, M., Garcia-Fruitos, E., Ferrer-Miralles, N., Rinas, U. y Villaverde, A. 2010. Side effects of chaperone gene co-expression in recombinant protein production. *Microbial Cell Factories*. 9:64.
- Mathews, C. K. 1999. *Biochemistry*. Upper Saddle River, NJ, USA, Prentice Hall.
- Mattanovich, D., Gasser, B., Hohenblum, H. y Sauer, M. 2004. Stress in recombinant protein producing yeasts. *Journal of Biotechnology*. 113:121-135.
- Mcallister, W. T. y Raskin, C. A. 1993. The phage RNA polymerases are related to DNA polymerases and reverse transcriptases. *Molecular Microbiology*. 10:1-6.
- Miao, Y., Ding, Y., Sun, Q. Y., Xu, Z. F. y Jiang, L. 2008. Plant bioreactors for pharmaceuticals. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 25:363-380.
- Morello, E., Bermudez-Humaran, L. G., Llull, D., Sole, V., Miraglio, N., Langella, P. y Poquet, I. 2008. *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 14:48-58.
- Nijland, R. y Kuipers, O. P. 2008. Optimization of protein secre-

- tion by *Bacillus subtilis*. Recent Patents on Biotechnology. 2:79-87.
- Oker-Blom, C. y Vuento, M. 2003. Reconstitution of recombinant viral envelope proteins. *Methods in Enzymology*, 372, 418-28.
- Palomares, L. A., Estrada-Mondaca, S. y Ramírez, O. T. 2004. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods in Molecular Biology*. 267:15-52.
- Perrière, G., Bessières, P. y Labedan, B. 1999. The Enhanced Microbial Genomes Library. *Nucleic Acids Research*. 27:63.
- Porro, D., Sauer, M., Branduardi, P. y Mattanovich, D. 2005. Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology*. 31:245-259.
- Quintero-Reyes, I., Garcia-Orozco, K., Sugich-Miranda, R., Arvizu-Flores, A., Velazquez-Contreras, E., Castillo-Yañez, F. y Sotelo-Mundo, R. 2012. Shrimp oncoprotein nm23 is a functional nucleoside diphosphate kinase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 44:325-331.
- Rader, R. A. 2008. Expression Systems for Process and Product Improvement: A Perspective on Opportunities for Innovator and Follow-On Product Developers. *BioProcess International*. 6:54-59.
- Salazar-Medina, A. J., Garcia-Rico, L., Garcia-Orozco, K. D., Valenzuela-Soto, E., Contreras-Vergara, C. A., Arreola, R., Arvizu-Flores, A. y Sotelo-Mundo, R. R. 2010. Inhibition by Cu²⁺ and Cd²⁺ of a mu-class glutathione S-transferase from shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 24:218-222.
- Sevastyanovich, Y. R., Alfasi, S. N. & Cole, J. A. 2010. Sense and nonsense from a systems biology approach to microbial recombinant protein production. *Biotechnol Appl Biochem*, 55, 9-28.
- Shokri, A., Sanden, A. M. y Larsson, G. 2003. Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60:654-64.
- Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A. y Kucherlapati, R. S. 1985. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*. 317:230-234.
- Studier, F. W. y Moffatt, B. A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*. 189:113-30.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. y Dubendorff, J. W. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology*. 185:60-89.
- Terpe, K. 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 6:523-33.
- Tunitskaya, V. L. y Kochetkov, S. N. 2002. Structural-functional analysis of bacteriophage T7 RNA polymerase. *Biochemistry (Moscu)*. 67:1124-1135.