



**REPÚBLICA DEL ECUADOR
UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADOS**

**INFORME DE INVESTIGACIÓN
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:**

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

Optimización de *Escherichia coli* modificada genéticamente para la producción de proteínas recombinantes no enzimáticas: insulina.

Autor:

Mina Ortiz Jhon Bryan
Zambrano Valencia Raquel Noemi

Director:

PhD. Darío Javier Cruz
Sarmiento

Milagro, año 2024

Derechos de autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **Mina Ortiz Jhon Bryan y Zambrano Valencia Raquel Noemi** en calidad de autores y titulares de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de Magister en Biotecnología, como aporte a la Línea de Investigación **alimentación y nutrición** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Informe de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 2 de agosto del 2024



Firmado electrónicamente por:
JHON BRYAN MINA
ORTIZ

Mina Ortiz Jhon Bryan
0803798875



Firmado electrónicamente por:
RAQUEL NOEMI
ZAMBRANO
VALENCIA

Zambrano Valencia Raquel Noemi
0804199727

- ii -

Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Yo, **Darío Cruz Sarmiento** en mi calidad de director del trabajo de titulación, elaborado por **Mina Ortiz Jhon Bryan y Zambrano Valencia Raquel Noemi**, cuyo tema es Optimización de *Escherichia coli* modificada genéticamente para la producción de proteínas recombinantes no enzimáticas: insulina, que aporta a la Línea de Investigación, previo a la obtención del Grado Magister en biotecnología, Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 2 de agosto del 2024



Firmado electrónicamente por:
**DARIO JAVIER
CRUZ
SARMIENTO**

PhD. Darío Javier Cruz Sarmiento
1104012016

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **LIC. ZAMBRANO VALENCIA RAQUEL NOEMI**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "OPTIMIZACIÓN DE ESCHERICHIA COLI MODIFICADA GENÉTICAMENTE PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES NO ENZIMÁTICAS: INSULINA", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	53.67
SUSTENTACIÓN	32.00
PROMEDIO	85.67
EQUIVALENTE	Muy Bueno



Firmado electrónicamente por:
**CARLOS JAMIL
BASTIDAS SANCHEZ**

Msc BASTIDAS SANCHEZ CARLOS JAMIL
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
**MARCELA MARICELA
CARPIO ARIAS**

CARPIO ARIAS MARCELA MARICELA
VOCAL



Firmado electrónicamente por:
**KEVIN XAVIER
HUILCAREMA ENRIQUEZ**

Mcimq HUILCAREMA ENRIQUEZ KEVIN XAVIER
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **LIC. MINA ORTIZ JHON BRYAN**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "OPTIMIZACIÓN DE ESCHERICHIA COLI MODIFICADA GENÉTICAMENTE PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES NO ENZIMÁTICAS: INSULINA", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	53.67
SUSTENTACIÓN	33.33
PROMEDIO	87.00
EQUIVALENTE	Muy Bueno



Firmado electrónicamente por:
**CARLOS JAMIL
BASTIDAS SANCHEZ**

Msc **BASTIDAS SANCHEZ CARLOS JAMIL**
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
**MARCELA MARICELA
CARPIO ARIAS**

CARPIO ARIAS MARCELA MARICELA
VOCAL



Firmado electrónicamente por:
**KEVIN XAVIER
HUILCAREMA ENRIQUEZ**

Mcmq **HUILCAREMA ENRIQUEZ KEVIN XAVIER**
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

V

Dedicatoria

Este trabajo de investigación está dedicado a todas aquellas personas y entidades que han contribuido significativamente a la culminación de este proyecto sobre la optimización de *Escherichia coli* modificada genéticamente para la producción de proteínas recombinantes no enzimáticas, específicamente la insulina.

En primer lugar, extendemos nuestro más sincero agradecimiento a nuestros familiares, quienes nos han proporcionado un inquebrantable apoyo emocional y moral. Su constante respaldo ha sido fundamental para mantener nuestra perseverancia y compromiso con la investigación científica.

A nuestros profesores y mentores, expresamos nuestro profundo reconocimiento. Su expertise y orientación académica han sido cruciales para el desarrollo de este trabajo.

Agradecemos especialmente a nuestro tutor de tesis, cuya meticulosa revisión y asesoramiento técnico han enriquecido significativamente la calidad de esta investigación.

Finalmente, dedicamos este logro a nuestros colegas y compañeros de maestría, con quienes hemos compartido extensas jornadas de experimentación y análisis. Su colaboración, intercambio de ideas y apoyo en la resolución de problemas técnicos han sido invaluable para la consecución de nuestros objetivos.

Agradecimientos

La realización de este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la colaboración y apoyo de diversas personas de la entidad UNEMI, a quienes queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento.

En primer lugar, queremos agradecer profundamente a nuestras familias, cuyo apoyo incondicional ha sido una fuente constante de motivación. Su comprensión y paciencia han sido esenciales para afrontar los desafíos y demandas de este proyecto.

Deseamos extender nuestro reconocimiento a nuestros profesores y mentores, especialmente a nuestro tutor de tesis, Dr. Darío Cruz Sarmiento, cuya experiencia y orientación técnica han sido fundamentales para el desarrollo y la conclusión de esta investigación. Su minuciosa revisión y sus valiosos comentarios han enriquecido significativamente la calidad científica de este trabajo.

Agradecemos igualmente a la institución educativa Universidad Estatal de Milagro UNEMI por proporcionar el entorno académico y profesional necesario para llevar a cabo esta investigación. A todos ustedes, nuestro más sincero agradecimiento por su apoyo y contribución al éxito de este proyecto. Este logro es el resultado de su dedicación y compromiso.

Resumen

En las últimas décadas, la prevalencia de la diabetes mellitus ha aumentado significativamente a nivel mundial, aumentando la demanda de insulina, una hormona esencial para el control de la glucosa en el cuerpo. *Escherichia coli* se ha destacado como un organismo hospedador preferido para la producción de insulina debido a su rápido crecimiento y facilidad de manipulación genética. Sin embargo, la producción de insulina recombinante en *E. coli* enfrenta desafíos significativos, como la formación de cuerpos de inclusión, incorrecta plegabilidad de la proteína y baja eficiencia de expresión, lo que limita su capacidad de producción a escala industrial y aumenta los costos de purificación y procesamiento.

Para abordar estos problemas, esta revisión bibliográfica se centra en las estrategias de modificación genética de *E. coli* para optimizar la producción de insulina. Las principales preguntas de investigación incluyen los avances recientes en la modificación genética de *E. coli*, los factores que influyen en la eficiencia de producción y los desafíos actuales en su optimización. La revisión sistemática de la literatura incluyó 1291 artículos, seleccionados y analizados según criterios de inclusión y exclusión específicos, utilizando la metodología PRISMA y procedimientos bioinformáticos. Los resultados indican que la optimización de la expresión de proteínas, la disrupción dirigida de genes y el diseño de proteínas son estrategias clave para mejorar la producción de insulina recombinante en *E. coli*.

Las conclusiones destacan que las técnicas de optimización de la expresión génica y la disrupción dirigida de genes son cruciales para mejorar la producción de insulina en *E. coli*. La manipulación de redes metabólicas y reguladoras también es esencial para redirigir recursos celulares y aumentar la eficiencia de producción. Las recomendaciones incluyen desarrollar protocolos estandarizados para la compilación de información bibliográfica, realizar análisis estadísticos adicionales para evaluar la eficacia de las metodologías identificadas, e implementar estudios experimentales para validar la viabilidad de las estrategias propuestas. Estas medidas pueden contribuir significativamente a la mejora de la producción de insulina, haciéndola más eficiente y viable económicamente.

Palabras Clave: *E. coli*, Ingeniería genética, Proteínas recombinantes no enzimáticas, Insulina, Optimización de la producción.

Abstract

In recent decades, the prevalence of diabetes mellitus has increased significantly worldwide, escalating the demand for insulin, a crucial hormone for glucose control in the body. *Escherichia coli* (*E. coli*) has emerged as a preferred host organism for insulin production due to its rapid growth and ease of genetic manipulation. However, the production of recombinant insulin in *E. coli* faces significant challenges, such as the formation of inclusion bodies, improper protein folding, and low expression efficiency, which limit its industrial-scale production capacity and increase purification and processing costs.

To address these issues, this literature review focuses on genetic modification strategies of *E. coli* to optimize insulin production. The main research questions include recent advances in genetic modification of *E. coli*, factors influencing production efficiency, and current challenges in its optimization. The systematic literature review included 1,291 articles, selected and analyzed based on specific inclusion and exclusion criteria, using the PRISMA methodology and bioinformatic procedures. The results indicate that protein expression optimization, targeted gene disruption, and protein design are key strategies to improve recombinant insulin production in *E. coli*.

The conclusions highlight that gene expression optimization techniques and targeted gene disruption are crucial for enhancing insulin production in *E. coli*. Manipulating metabolic and regulatory networks is also essential to redirect cellular resources and increase production efficiency. Recommendations include developing standardized protocols for compiling bibliographic information, conducting additional statistical analyses to evaluate the efficacy of identified methodologies, and implementing experimental studies to validate the feasibility of the proposed strategies. These measures can significantly contribute to improving insulin production, making it more efficient and economically viable.

Keywords: *E. coli*, Genetic engineering, Non-enzymatic recombinant proteins, Insulin, Production optimization.

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura de <i>Escherichia coli</i>	30
Figura 2. Estructura secundaria de la insulina... ..	36
Figura 3. Nube de palabras sobre metodologías para producción de proteínas recombinantes: insulina en <i>E. coli</i>	52
Figura 4. Frecuencia de palabras sobre términos claves de metodologías para producción de proteínas recombinantes: insulina en <i>E. coli</i>	53
Figura 5. Número de publicaciones por año sobre metodologías para producción de proteínas recombinantes: insulina en <i>E. coli</i>	54

Lista de Tablas

Tabla 1. Conceptos claves y términos de búsqueda asociados en tres bases de datos en línea	48
Tabla 2. Palabras clave de búsqueda utilizadas en base de datos en línea	49
Tabla 3. Técnica: Sistema de producción de insulina recombinante basado en enzimas híbridas y expresión de proteínas optimizadas (SIRHEPO)	51

Lista de Siglas / Acrónimos

PRISMA: Guía Para La Elaboración, Remisión Para Publicación y/o Comunicación De Revisiones Sistemáticas Y Metaanálisis.

CRISPER- CAS 9: Agrupación de Repeticiones Palindrómicas Regularmente Intercaladas Asociada a La Proteína 9

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

OGMs: Organismos Genéticamente Modificados

ADNc: ADN complementario

IGF-1: Factor De Crecimiento Similar a La Insulina 1

PCR: Reacción En Cadena De La Polimerasa

ARN: Ácido Ribonucleico

IPEC: *E. coli* patógena intestinal

ExPEC: *E. coli* patógena extraintestinal

EPEC: *E. coli* enteropatógena

EHEC: *E. coli* enterohemorrágica

ETEC: *E. coli* enterotoxigénica

EAEC: *E. coli* enteroagregativa

EIEC: *E. coli* enteroinvasiva

DAEC: *E. coli* difusamente adherente

UPEC: *E. coli* uropatógena

NMEC: *E. coli* asociada a meningitis

pH: Potencial de Hidrógeno

PAI: Isla de Patogenicidad Cromosómica

ORF: Marcos de Lectura Abiertos

LEE: Locus de Borrado de Enterocitos

EAF: Factor de Adherencia De EPEC

LT: Termolábiles

ST: Termoestables

FC: Factores De Colonización

STEC: Cepas De *E. Coli* Productoras De Toxina Shiga

SUH: Síndrome Urémico Hemolítico

Pic: Protease Involved In Intestinal Colonization

ITU: infecciones del tracto urinario

WGS: secuenciación completa del genoma

CARD: Base de Datos Integral de Resistencia a Antibióticos

VFDB: Base de Datos de Factores de Virulencia

PMN: Polimorfonucleares

ATP: Adenosín Trifosfato

GIP: Péptido Insulinotrópico Dependiente De Glucosa

GLP1: Péptido 1 Similar al Glucagón

AMPc: adenosina monofosfato cíclico.

PR: Proteínas Recombinantes

THG: transferencia horizontal de genes

Índice/ Sumario

PORTADA.....	1
Derechos de autor	2
Aprobación del director del Trabajo de Titulación	3
Dedicatoria	4
Agradecimientos	5
Resumen.....	6
Abstract.....	7
Lista de Figuras.....	8
Lista de Tablas	9
Lista de Siglas / Acrónimos	10
Lista de Abreviaturas.....	11
Indice/ Sumario.....	14
Introducción	16
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN	19
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
1.2 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	20
1.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	20
1.4 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	20
1.5 DETERMINACIÓN DEL TEMA	21
1.6 OBJETIVO GENERAL	21
1.7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
1.8 DECLARACIÓN DE LAS VARIABLES (OPERACIONALIZACIÓN)	22
1.9 JUSTIFICACIÓN	23
1.10 ALCANCE Y LIMITACIONES.....	24
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	27
2.1 ANTECEDENTES	27
2.2 CONTENIDO TEÓRICO QUE FUNDAMENTA LA INVESTIGACIÓN.....	29
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	29
2.2.1.1 Morfología y Fisiología.....	29
2.2.1.2 Hábitat y ecología.....	30
2.2.1.3 Cepas no patógenas.....	31
2.2.1.4 Cepas patógenas.....	32

2.2.2	<i>Insulina</i>	35
2.2.2.1	Estructura y síntesis.....	35
2.2.2.2	Procesos biológicos de síntesis y secreción en el páncreas.....	36
2.2.2.3	Regulación de la glucosa en sangre.....	37
2.2.2.4	Mecanismo de acción de la insulina.....	37
2.2.2.5	Interacción con receptores celulares.	37
2.2.3	<i>Proteínas recombinantes</i>	38
2.2.3.1	Producción de insulina recombinante.....	38
2.2.4	<i>Modificación genética bacteriana</i>	40
2.2.4.1	Técnicas de modificación genética.....	40
2.2.5	<i>Herramientas moleculares</i>	41
2.2.5.1	Plásmidos y vectores.	41
2.2.5.2	Enzimas de restricción y ligasas.	43
2.2.5.3	Tecnología crispr-cas9.	43
2.2.6	<i>PRISMA</i>	44
CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO		45
3.1	TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	45
3.2	LA POBLACIÓN Y LA MUESTRA	45
3.2.1	<i>Características de la población</i>	45
3.2.2	<i>Delimitación de la población</i>	45
3.2.3	<i>Procesamiento estadístico de la información.</i>	45
3.2.4	<i>Preguntas de investigación</i>	46
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....		47
4.1	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	47
4.2	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	52
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		59
5.1	CONCLUSIONES	59
5.2	RECOMENDACIONES.....	60
CAPÍTULO VI: ANEXOS... ..		68
BIBLIOGRAFÍA		61

Introducción

En el panorama actual de la biotecnología y la producción farmacéutica, la generación eficiente y sostenible de insulina mediante métodos recombinantes es una prioridad que va en ascenso. Esta investigación explora la utilización de *Escherichia coli* modificada genéticamente como un sistema de expresión para la producción de insulina, empleando técnicas avanzadas de ingeniería genética. Esta estrategia promete una solución innovadora para la producción de insulina, crucial en el tratamiento de la diabetes y en la mejora de la calidad de vida de los pacientes (Casas Martínez, Fuquen Fúquene, Ramírez Torres, & Gómez Rodríguez, 2022)

La producción de proteínas recombinantes es una tecnología consolidada en la industria. Cuando no es necesario el uso de modificaciones post-traduccionales complejas, *Escherichia coli* es la opción preferida sintetizar estas proteínas. Para lograr altas productividades, se emplean cultivos de alta densidad celular, lo que implica el uso de grandes cantidades de sustrato. Normalmente, en los cultivos industriales de *E. coli*, se utiliza un medio enriquecido con glucosa, dado que esta bacteria prefiere esta fuente de carbono (Alvarado Madrigal, Chavarría Quirós , Leiva Montero, & Mora Román , 2019).

Seleccionar un sistema de producción apropiada resulta fundamental para alcanzar un rendimiento satisfactorio en la purificación de la proteína recombinante deseada. Factores como la optimización del uso de codones, la selección de la cepa hospedera, el vector de expresión, la etiqueta o proteína de fusión empleada en la purificación, la composición del medio de cultivo, las condiciones de inducción y otros elementos son determinantes para el resultado final. (Hernández Alcántara , García Torres, Alba Martínez, & Ramírez Silva, 2021).

Debido a su rápido desarrollo y capacidad para generar grandes cantidades de biomasa en medios económicos, junto con un amplio entendimiento de su fisiología y genética, acompañado de su alta eficiencia en la producción de proteínas heterólogas, la bacteria *E. coli* sigue siendo la opción preferida para la expresión recombinante, tanto en entornos de laboratorio como en la industria (González & Fillat, Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*, 2018)

Es comúnmente aceptado que *E. coli* sirve como una bacteria de referencia para establecer sistemas de producción microbiana para una variedad de productos y para investigar los mecanismos de regulación. Esta bacteria exhibe una serie de componentes en su membrana externa, como fosfolípidos, lipopolisacáridos, ácido colánico, flagelos y fimbrias tipo I, que actúan como una barrera autoprotectora; esta membrana externa está estrechamente ligada a la morfología celular, el crecimiento, los fenotipos y la capacidad de adaptación al estrés. (Wang, Ma, & Wang, 2021)

Se ha comprobado que el uso de insulinas recombinantes es una alternativa eficaz, segura y asequible que los análogos de insulina. No solo se debe promover el uso de insulina, sino también seguir estrictamente pautas relacionadas con cambios al estilo de vida, como la nutrición, los hábitos alimentarios, la actividad física, la optimización del control metabólico y la prevención de complicaciones (Sandoval Benalcázar, Socasi Dioses , Vera Navarrete , & Poquiza Pacheco , 2023)

El estudio se centra en tres objetivos específicos: compilar información bibliográfica sobre los métodos utilizados de modificación genética de *Escherichia coli* para la producción de insulina usando PRISMA para garantizar una revisión exhaustiva y sistemática, analizar estadísticamente estas metodologías con R Studio para identificar las más eficaces y proponer una alternativa innovadora basada en la revisión bibliográfica y los análisis estadísticos, avanzando así en la producción eficiente de insulina recombinante.

La tesis está estructurada por capítulos que incluyen desde una revisión exhaustiva de la literatura pertinente hasta los detalles metodológicos, los resultados y las discusiones. Este formato garantiza un abordaje completo de cada aspecto de la investigación, permitiendo una comprensión profunda y coherente del estudio. A continuación, se presentan los capítulos que corresponden a este trabajo:

Capítulo I: Problema de la investigación – Describe el problema y proporciona la justificación para llevar a cabo la investigación.

Capítulo II: Marco Teórico Referencial – Presenta una revisión de la literatura y las teorías pertinentes.

Capítulo III: Diseño Metodológico – Describe los métodos y técnicas utilizadas en

la investigación.

Capítulo IV: Análisis e Interpretación de Resultados – Expone y analiza los hallazgos del estudio.

Esta investigación no solo aborda un desafío biotecnológico significativo, sino que también contribuye al avance de la producción sostenible de insulina recombinante. A través de este estudio, se espera abrir nuevas vías de investigación y aplicación de técnicas biotecnológicas para optimizar la modificación genética de *Escherichia coli* y mejorar la eficiencia en la producción de proteínas recombinantes no enzimáticas como la insulina.

CAPÍTULO I: El problema de la investigación

1.1 Planteamiento del problema

En las últimas décadas, la prevalencia de la diabetes mellitus ha aumentado considerablemente a nivel mundial, tornándose una creciente demanda de insulina, una hormona que permite que la glucosa del torrente sanguíneo ingrese en las células del cuerpo (Federation, 2019). Entre las diversas plataformas de producción, *E. coli* se destaca como un organismo hospedador preferido debido a su rápido crecimiento, facilidad de manipulación genética y costo de cultivo relativamente bajos (González Crespo , Hardy Sosa, & Sosa Espinosa , 2018).

Sin embargo, la producción de insulina recombinante en *E. coli* no está exenta de desafíos. La formación de cuerpos de inclusión, la incorrecta plegabilidad de la proteína y baja eficiencia de expresión son algunos de los problemas más comunes que afectan el rendimiento y la calidad de la insulina producida. Estos problemas no solo limitan la capacidad de producción a escala industrial, sino que también aumentan los costos de purificación y procesamiento, lo que puede impactar negativamente en la disponibilidad y el precio del medicamento (Rauda Ceja , Perez , Valdez Cruz , & Trujillo Roldán , 2020).

A nivel global, se estima que la demanda de insulina continuará creciendo debido al aumento de la población diabética y a la expansión del acceso a tratamientos médicos en países en desarrollo. En este contexto resalta la necesidad urgente de optimizar los procesos de producción de insulina recombinante (Organización Panamericana de la Salud & Organización Mundial de la Salud, 2021).

En el Ecuador, la investigación sobre la producción de proteínas recombinantes, incluida la insulina, está en una etapa incipiente. Aunque se han realizado algunos estudios sobre el uso de *E. coli* para la producción de proteínas terapéuticas, la optimización de este sistema para la producción eficiente de insulina sigue siendo un desafío. La falta de investigaciones específicas en este ámbito deja un vacío en la comprensión y el desarrollo de procesos biotecnológicos más eficientes y sostenible para la producción de insulina.

En este contexto, la presente investigación busca abordar estos desafíos y contribuir al desarrollo de métodos mejorados para la producción de insulina recombinante en *E. coli*. La optimización de las condiciones de cultivo, las estrategias de modificación genética y los métodos de purificación son aspectos cruciales para mejorar el rendimiento y la calidad de la insulina producida.

1.2 Delimitación del problema

La investigación se centra en la optimización de *E. coli* modificada genéticamente para la producción de insulina recombinante, excluyendo otras proteínas recombinantes de tipo no enzimático y otros organismos hospedadores contrarios a *E. coli*.

1.3 Formulación del problema

¿Cómo la modificación genética en *Escherichia coli* aumenta la producción de insulina a gran escala?

1.4 Preguntas de investigación

- ¿Cuáles son los avances más recientes en la modificación genética de *E. coli* para mejorar la calidad y la pureza de la insulina?
- ¿Cuántas proteínas recombinantes de aplicación terapéutica pueden ser obtenidas por modificación genética en *E. coli*?
- ¿Qué factores influyen en la eficiencia de la producción de insulina en *E. coli*?
- ¿Cuáles son los desafíos y limitaciones actuales en la optimización de *E. coli* para la producción de insulina?

1.5 Determinación del tema

El tema se elige por su relevancia en el campo de la biotecnología y la medicina, dada la creciente necesidad de producir insulina de manera eficiente y asequible. La investigación se ajusta en la optimización de *Escherichia coli* modificada genéticamente para la producción de insulina recombinante, reconociendo la importancia de mejorar los métodos actuales para satisfacer la demanda mundial de este medicamento vital. Este enfoque promete no solo abordar los desafíos técnicos en la producción de proteínas recombinantes, sino también indagar nuevas fronteras en la ingeniería genética y la biotecnología aplicada. El éxito en esta área tiene el potencial de influir significativamente en la industria farmacéutica y mejorar la accesibilidad del tratamiento para la diabetes a nivel global.

1.6 Objetivo general

Investigar optimización de *Escherichia coli* modificada genéticamente para la producción de proteínas recombinantes no enzimáticas: insulina.

1.7 Objetivos específicos

- Compilar información bibliográfica de métodos sobre la modificación genética de *E. coli* para la producción de insulina.
- Analizar estadísticamente las metodologías aplicadas para la modificación genética de *E. coli* para la producción de insulina.
- Proponer una alternativa de modificación genética de *E. coli* para la producción de insulina mediante revisión bibliográfica.

1.8 Declaración de las variables (operacionalización)

Variable	Definición Conceptual	Definición operacional	Medición
Métodos de Modificación Genética	Técnicas utilizadas para introducir, modificar o eliminar genes en Escherichia coli	<ul style="list-style-type: none"> - Plasmid-Based Expression Systems - Fusion Protein Technology - Fusion Protein Expression - Synthetic Gene Design - Periplasmic Expression - Site Directed Mutagenesis - Random Mutagenesis - DNA Shuffling - Recombination-Based Cloning - Homologous Recombination - CRISPR-Cas9 Mediated Recombination 	Registro del método utilizado en cada estudio revisado

1.9 Justificación

La optimización de *Escherichia coli* modificada genéticamente para la producción de insulina recombinante es de gran importancia estratégica, dado que la insulina es esencial para el tratamiento de la diabetes, una enfermedad que afecta a millones de personas en todo el mundo. A pesar de los avances en la producción de insulina recombinante, existen desafíos significativos en términos de eficiencia de producción, calidad del producto y costos de purificación. Mejorar estos procesos puede contribuir significativamente a satisfacer la creciente demanda de insulina, reducir costos y aumentar la accesibilidad del tratamiento (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura , 2020).

Los resultados de esta investigación representarán un aporte significativo para la biotecnología y la medicina, promoviendo la producción sostenible de insulina recombinante. Al abordar problemas críticos como la formación de cuerpos de inclusión, la incorrecta plegabilidad de la proteína y la baja eficiencia de expresión, esta investigación busca optimizar los métodos actuales, reduciendo los costos asociados y mejorando la calidad del producto final. Esto, a su vez, disminuirá la dependencia de métodos de producción más costosos y menos eficientes.

Este estudio tiene el potencial de influir positivamente en la industria farmacéutica, proporcionando un enfoque más sostenible y económicamente viable para la producción de insulina. Además, la optimización de *E. coli* como sistema de expresión puede abrir nuevas oportunidades en la producción de otras proteínas terapéuticas, demostrando la versatilidad y eficiencia de los microorganismos.

1.10 Alcance y limitaciones

La producción de insulina recombinante mediante la modificación genética de *Escherichia coli* ha transformado la biotecnología y la medicina. Este avance ha permitido producir insulina humana en cantidades suficientes para satisfacer la demanda mundial de pacientes con diabetes mellitus, una condición crónica que afecta a millones de personas.

La producción de insulina recombinante utilizando *Escherichia coli* representa un hito significativo en la biotecnología médica. Antes de este desarrollo, la insulina se obtenía principalmente de páncreas de animales, lo cual no solo era costoso y escaso, sino que también planteaba riesgos de reacciones alérgicas y otras complicaciones. La insulina recombinante, producida a través de bacterias modificadas, es biológicamente idéntica a la insulina humana, lo que ha mejorado considerablemente la eficacia y la seguridad del tratamiento para la diabetes.

La revisión de la literatura revela que la optimización de *E. coli* para la producción de insulina ha permitido avances sustanciales en varios aspectos clave de la biotecnología industrial. Entre estos avances se encuentran las mejoras en la eficiencia de la expresión génica, el rendimiento celular y la estabilidad de la producción. Técnicas avanzadas de ingeniería genética, como CRISPR-Cas9 y la mutagénesis dirigida, han sido cruciales para lograr estas mejoras. Estas técnicas permiten modificaciones precisas en el genoma de *E. coli*, facilitando una producción más eficiente y estable de insulina recombinante.

La producción de insulina no solo ha mejorado la accesibilidad al medicamento, sino que también ha reducido significativamente los costos de producción en comparación con los métodos tradicionales. Además, el uso de *E. coli* como sistema de expresión es considerado seguro y sostenible. Las cepas utilizadas son generalmente bien caracterizadas y han sido modificadas para minimizar los riesgos ambientales y de salud. La producción en ambientes controlados y con técnicas estandarizadas asegura la calidad y la pureza del producto final, garantizando la seguridad del paciente.

A pesar de los avances logrados, la revisión bibliográfica destaca varios desafíos técnicos asociados a la producción de insulina. Uno de los principales desafíos es la

optimización genética compleja. La modificación genética para maximizar la producción de insulina requiere un conocimiento profundo del metabolismo y la regulación genética de la bacteria. La expresión de proteínas recombinantes a menudo enfrenta problemas como la formación de cuerpos de inclusión, que son agregados de proteínas mal plegadas que reducen el rendimiento y la funcionalidad de la insulina producida.

Otro desafío es la adaptabilidad limitada de *E. coli* a diferentes condiciones de cultivo. La optimización de las condiciones para maximizar la producción de insulina puede requerir un equilibrio delicado de múltiples factores ambientales y nutricionales. Además, las modificaciones genéticas pueden tener efectos no deseados en la fisiología de la bacteria, afectando su crecimiento, viabilidad y productividad.

Dicha producción también enfrenta desafíos éticos y regulatorios significativos. La liberación accidental de *E. coli* modificada genéticamente en el medio ambiente plantea riesgos de bioseguridad. Aunque existen estrictas regulaciones sobre el manejo y la eliminación de organismos genéticamente modificados (OGMs), siempre existe la preocupación de que las bacterias modificadas puedan interactuar con microorganismos naturales y transferir genes modificados.

Además, la aceptación pública de productos derivados de OGMs sigue siendo un desafío. La percepción negativa y la desinformación sobre los riesgos de la ingeniería genética pueden limitar el uso y la comercialización de insulina recombinante. Existen dilemas éticos relacionados con la manipulación genética, especialmente en el contexto de la producción de medicamentos, que deben ser abordados con responsabilidad y transparencia.

La escalabilidad de la producción de insulina recombinante también presenta limitaciones. La infraestructura significativa y los recursos especializados requeridos pueden ser un obstáculo en regiones con limitaciones económicas y tecnológicas. La implementación de tecnologías avanzadas de producción y purificación es costosa y requiere personal capacitado, lo que puede limitar la capacidad de expansión en algunos contextos.

El futuro de la producción de insulina recombinante en *E. coli* depende en gran medida de innovaciones tecnológicas continuas. La mejora de herramientas de edición genética, como CRISPR-Cas9, promete superar muchas de las limitaciones actuales en las modificaciones. Las técnicas emergentes de biología sintética podrían permitir la construcción de circuitos genéticos más complejos y controlables, mejorando la producción de insulina y otras proteínas recombinantes.

La automatización y la digitalización de los procesos de producción también tienen el potencial de mejorar significativamente la eficiencia y la consistencia de la producción de insulina recombinante. Los sistemas de biorreactores avanzados y el monitoreo en tiempo real permiten un control más preciso de las condiciones de cultivo, optimizando el rendimiento y reduciendo la variabilidad.

Las técnicas y conocimientos desarrollados para la producción de insulina pueden aplicarse a la producción de otras proteínas terapéuticas, enzimas industriales y bioproductos. La diversificación de productos recombinantes podría aumentar la viabilidad comercial y el impacto económico de la biotecnología basada en *Escherichia coli*. Además, la colaboración internacional en investigación y desarrollo puede acelerar los avances en la optimización para la producción de insulina. Compartir conocimientos y recursos puede superar las barreras tecnológicas y económicas, facilitando la aceptación global de los productos derivados de OGMs y mejorando el acceso a tratamientos médicos avanzados.

CAPÍTULO II: Marco teórico referencial

2.1 Antecedentes

Zieliński, et al., (2019) desarrollaron en Polonia un protocolo eficiente y económico para la producción de insulina humana recombinante usando la cepa *E. coli* 20. Mediante la construcción del gen de la insulina y el plásmido pIBAINS, lograron obtener 2700 UI de insulina con una pureza del 99% por litro de cultivo. El proceso, independiente de la temperatura, mostró una eficiencia de renaturalización del 95-99%, resaltando su viabilidad comercial y capacidad para satisfacer la creciente demanda de insulina en Polonia.

Aboul-Soud (2020) investigó la clonación y expresión del ADNc del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) en búfalos egipcios, utilizando la cepa *E. coli* JM109. El estudio demostró que la tecnología de ADN recombinante facilitó la producción de IGF-1, clonando el ADNc a partir de tejidos hepáticos y verificando la expresión de la proteína recombinante mediante SDS-PAGE, mostrando un tamaño de 7.6 kDa. Las investigaciones en proteínas recombinantes basadas en *E. coli* también se han realizado en animales como los búfalos egipcios, confirmando a *E. coli* como un huésped eficiente y rentable para la expresión de proteínas recombinantes.

Siew & Zhang (2021) realizaron una revisión exhaustiva del procesamiento posterior necesario para producir insulina humana recombinante y sus análogos a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli*. Cubren aspectos críticos como la recuperación y purificación de proinsulina, su solubilización y sulfitólisis oxidativa, y la escisión enzimática. La revisión destaca las ventajas de *E. coli* como sistema de expresión, pero también aborda los desafíos del procesamiento complejo necesario para obtener polipéptidos funcionales. Además, incluye ejemplos y discute cómo integrar cada procedimiento en un esquema de purificación multimodal, subrayando la importancia de técnicas de recuperación y lavado eficientes.

Breunig, et al., (2024) investigaron la fluoración de la insulina lispro en la posición ProB29 para ralentizar la formación de fibrillas. Prepararon variantes de lispro con

análogos de prolina, logrando más del 90% de incorporación, y confirmaron su bioactividad en ratones diabéticos. Las variantes fluoradas mantenían su actividad y estructura similar a la insulina humana, pero se disociaban más rápidamente del hexámero. La fluoración con 4S-fluoroprolina estabilizó la proteína contra la fibrilación, mejorando la vida útil y el almacenamiento de las formulaciones de insulina.

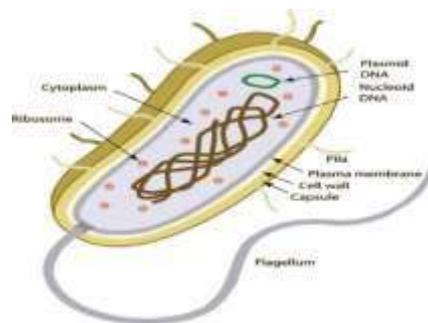
2.2 Contenido teórico que fundamenta la investigación

2.2.1 *Escherichia coli*

2.2.1.1 Morfología y Fisiología.

Escherichia coli es una bacteria de tipo bacilo Gram negativa, que presenta una morfología en forma de bastón y no produce esporas, lo cual le confiere ciertas ventajas y limitaciones en términos de supervivencia en condiciones adversas. Es de forma recta y de bastón, no produce esporas y no es resistente al ácido. Las células de *E. coli* tienen dimensiones que varían entre 1 y 3 micrómetros de longitud y entre 0,4 y 0,7 micrómetros de ancho, siendo aproximadamente 1 micrómetro de largo, 0,35 micrómetros de ancho y con un volumen que oscila entre 0,6 y 0,7 micrómetros cúbicos (Basavaraju & Gunashree, 2023).

Figura 1. Estructura de *Escherichia coli*



Bacilo gramnegativo con flagelo, recto, con forma de bastoncillo, sin esporas, no resistente al ácido y que existe en forma individual y en parejas. Tamaño de 1 a 3 μm \times 0,4 a 0,7 μm (micrómetro), alrededor de 1 μm de largo, 0,35 μm de ancho y 0,6 a 0,7 μm de volumen. Nota: Tomado de *Escherichia coli: An Overview of Main Characteristics*, por Basavaraju & Gunashree, 2023, (<https://www.intechopen.com/chapters/84764>)

E. coli se categoriza en 150 a 200 serotipos basados en tres antígenos principales: somático (O), capsular (K) y flagelar (H). Hay 173 tipos de antígenos O en la pared celular, 103 tipos de antígenos K en la cápsula y 75 tipos de antígenos H en los flagelos. Esta diversidad antigénica permite a *E. coli* adaptarse a diferentes entornos y evadir el sistema inmunitario del huésped, contribuyendo a su capacidad patogénica (Erjavec, 2023).

E. coli es reconocida como una de las bacterias más adaptativas y con una notable capacidad patogénica. Los grupos de *E. coli* capaces de inducir diarrea se clasifican bajo el término *E. coli* patógena intestinal (IPEC). Aquellos que originan infecciones en otros sistemas

se denominan *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC). Además de su rol patogénico, *E. coli* desempeña una función esencial como parte del microbiota comensal en los intestinos de humanos y otros mamíferos, contribuyendo al equilibrio microbiano y al proceso digestivo (Lee, 2020).

Se han identificado ocho patotipos distintos de *E.coli* responsables de diversas enfermedades en humanos. Los seis patotipos intestinales son *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* difusamente adherente (DAEC). En la categoría de *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) se incluyen *E. coli* uropatógena (UPEC), y *E. coli* asociada a meningitis (NMEC) (Liu, y otros, 2020).

2.2.1.2 Hábitat y ecología.

Clasificada como una bacteria coliforme, *E. coli* es parte del género *Escherichia* y se encuentra en diversos hábitats como el medio ambiente, alimentos contaminados y el intestino de animales de sangre caliente. En los intestinos, juega un rol crucial en la digestión y la salud intestinal. Debido a su presencia constante en los intestinos y su capacidad para sobrevivir en el medio ambiente, *E. coli* se utiliza como un indicador de contaminación fecal en el agua, ayudando a detectar patógenos potenciales y evaluar la calidad del agua para su uso seguro (Basavaraju & Gunashree, 2023).

E. coli es una de las primeras bacterias en colonizar el intestino humano; las personas están expuestas a ella a través de alimentos crudos, agua potable y superficies contaminadas. Adaptada para sobrevivir en condiciones extremas del tracto gastrointestinal, como la acidez gástrica (pH 1.5) y la bilis, *E. coli* ha desarrollado mecanismos para prosperar en estos ambientes hostiles. La exposición frecuente a diversas cepas de *E. coli* a lo largo de la vida está relacionada con factores ambientales como mascotas, alimentos y agua (Martinson & Walk, 2020).

La capacidad de *E. coli* para persistir en entornos acuáticos está influenciada por diversos factores bióticos y abióticos. Los factores bióticos incluyen la formación de biopelículas y la interacción con otros microorganismos. Los factores abióticos abarcan la temperatura, pH, salinidad, luz solar y disponibilidad de nutrientes. Además, las fluctuaciones

estacionales en temperatura y precipitaciones, junto con la actividad humana, también afectan su abundancia y viabilidad en estos ecosistemas (Liu, Lee, Bong, & Wang, 2024).

2.2.1.3 Cepas no patógenas.

E. coli es mayormente una especie bacteriana no patógena, presente en más del 90% de los adultos como parte del microbioma intestinal, hay una brecha en el conocimiento sobre los factores que afectan la abundancia y distribución de las cepas no patógenas. Estos factores incluyen interacciones con otros microorganismos, disponibilidad de nutrientes, variaciones en el pH y temperatura, y la presencia de agentes antimicrobianos. Entender estos elementos es crucial para comprender el papel de las cepas no patógenas de *E. coli* en el microbioma humano y su impacto en la salud (Martinson & Walk, 2020).

Las principales cepas no patógenas de *Escherichia coli* más usadas en el campo de la biotecnología son las cepas B y k-12

E. coli B

Las cepas B de *E. coli* y sus variantes se emplean habitualmente como sistemas huéspedes para la expresión de proteínas recombinantes. Estas cepas han sido específicamente diseñadas para mejorar la producción de proteínas recombinantes, una optimización que se logra gracias a varias características distintivas. La ausencia de flagelos en estas cepas reduce la energía celular destinada a la motilidad, lo que permite una mayor dedicación de recursos a la síntesis de proteínas. Además, estas cepas producen una cantidad limitada de proteasas, enzimas que podrían degradar las proteínas recombinantes. Finalmente, las cepas B tienen una capacidad aumentada para la biosíntesis de aminoácidos, bloques de construcción para la síntesis de proteínas, así crea un entorno más favorable para la producción eficiente de proteínas recombinantes. Esta combinación de características hace que las cepas B de *E. coli* sean una opción preferida en la biotecnología y la ingeniería genética (Schumann, Cohn, Gaballa, & Wiedmann, 2023).

E. coli K-12

Escherichia coli K-12, a menudo considerado el animal doméstico de la biología molecular, contrasta con la diversidad de cepas silvestres en su entorno natural, algunas de las cuales son comensales intestinales cruciales, mientras que otras poseen características

patógenas que muestran variabilidad genética y fenotípica. La estructura central de la cepa K-12 es inusual en entornos naturales y se identifica mediante PCR basada en enzimas específicas codificadas por los genes *waa*. Esta cepa, aislada en 1922 en la Universidad de Stanford, probablemente perdió la capacidad de producir el antígeno O16 debido a mutaciones, evidenciando cómo la manipulación y el cultivo prolongado pueden alterar las propiedades de las bacterias (Hantke, 2020).

2.2.1.4 Cepas patógenas.

E. coli es considerado microorganismo oportunista, porque cuando las defensas del cuerpo están comprometidas puede causar enfermedades. Utiliza factores de virulencia, como fimbrias y adhesinas para la adhesión a las células, cápsulas protectoras y varias toxinas que afectan las células del huésped y desencadenan respuestas inflamatorias. Además, cuenta con sistemas especializados para la absorción de hierro, un nutriente esencial para su crecimiento y proliferación en el huésped (Basavaraju & Gunashree, 2023).

Escherichia coli enteropatogénica

Identificada en 1945 en el Reino Unido como una causa importante de enfermedades diarreicas en lactantes, con una alta morbilidad y mortalidad en niños menores de seis meses, especialmente en países en desarrollo. Comparte mecanismos de patogénesis con otros patógenos, como factores de virulencia de adherencia y borrado, que facilitan la adhesión a las células intestinales y la destrucción de microvellosidades. Histopatológicamente, EPEC causa lesiones de adherencia y borrado en células epiteliales intestinales, con genes de virulencia ubicados en una isla de patogenicidad cromosómica y en un locus de borramiento de enterocitos. Una toxina autotransportadora de serina proteasa llamada EspC, liberada por EPEC, puede causar necrosis en células intestinales (Pakbin, Brück, & Rossen, 2021).

Escherichia coli enterotoxigénica

Agente etiológico de diarrea, especialmente en niños menores de cinco años en regiones con ingresos bajos, afecta también a la población adulta, siendo la principal causa de la diarrea del viajero en viajeros provenientes de países industrializados que visitan regiones endémicas de ETEC y EAEC. Entre el 3% y el 17% de los adultos que padecen diarrea del viajero desarrollan posteriormente enfermedades inflamatorias intestinales (Ríos-Muñiz, Cerna Cortés, Morán García, Meza Segura, & Estrada García, 2019).

ETEC se caracteriza por su capacidad de producir dos tipos de enterotoxinas: las termolábiles (LT) y las termoestables (ST). La LT es una molécula de alto peso molecular, compuesta por una subunidad alfa activa y cinco subunidades B de unión. Por otro lado, la ST es un péptido de bajo peso molecular. La colonización del epitelio intestinal por parte de ETEC es esencial para su acción tóxica. Además de las enterotoxinas, los factores de colonización (FC) desempeñan un papel crucial como principales factores de virulencia de ETEC (Zhang, Tan, Zhao, & Ma, 2022).

Escherichia coli Enterohemorrágica

Las cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC), como la *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), pueden causar desde diarrea leve hasta diarrea sanguinolenta, acompañadas a menudo de fiebre y vómitos. La presencia de la toxina Shiga, codificada por fagos, distingue a las cepas STEC, mientras que las EHEC tienen factores de virulencia adicionales que pueden causar colitis hemorrágica y, en casos graves, el síndrome urémico hemolítico (SUH). Si bien todas las cepas de *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) son STEC, no todas las STEC son ECEH. Los métodos diagnósticos se centran en la detección de genes específicos, como *stx* y genes de virulencia asociados con la isla de patogenicidad LEE y hemolisina (Jesser & Levy, 2023).

Escherichia coli Enteroinvasiva

La diarrea causada por (EIEC) es común en todo el mundo, especialmente entre los niños de países de ingresos bajos y medianos. Sus manifestaciones clínicas y mecanismos de virulencia son similares a los de *Shigella spp.*, ya que ambas bacterias llevan el plásmido pINV tipo F, que codifica los genes necesarios para la invasión. (Jesser & Levy, 2023).

EIEC penetra el organismo a través de las células M ubicadas en la mucosa del colon. Una vez dentro, invade los enterocitos, las células epiteliales del intestino, y se multiplica dentro del citoplasma de estas células. Este proceso de invasión y multiplicación intracelular provoca la aparición de síntomas clínicos característicos, incluyendo diarrea disintérica, que con evacuaciones frecuentes acompañadas de sangre y moco. Esta capacidad invasiva de EIEC contribuye a su patogenicidad y a la gravedad de las infecciones que causa en el tracto gastrointestinal (Molina, Oderiz, López, Basualdo, & Sparo, 2024).

Escherichia coli Enteroagregativa

Diversos estudios han indicado que la patogénesis de (EAEC) se divide en tres etapas principales: La adherencia a la mucosa intestinal, mediada principalmente por las fimbrias de adherencia agregativa. La liberación de enterotoxinas y citotoxinas y por último la inducción de la inflamación de la mucosa. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) produce diversas toxinas con efectos citotóxicos, entre las cuales se encuentran la toxina ShET1 (*shigella enterotoxin 1*) y Pic (protease involved in intestinal colonization), ambas codificadas en el cromosoma bacteriano. Sin embargo, hasta la fecha no se han identificado moléculas exclusivas de las cepas de EAEC aisladas de casos de diarrea (Ríos-Muñiz, Cerna Cortés, Morán García, Meza Segura, & Estrada García, 2019).

Escherichia coli Uropatogénica

Entre las diversas especies bacterianas que causan infecciones del tracto urinario (ITU), las cepas uropatógenas de UPEC son las más prevalentes. Las UPEC son responsables de aproximadamente el 80% de las infecciones urinarias no complicadas, el 95% de las infecciones adquiridas en la comunidad y el 50% de las infecciones adquiridas en hospitales. Las UPEC siguen siendo el patógeno más común en las ITU complicadas, subrayando su importancia en la epidemiología de estas infecciones y la necesidad de enfoques efectivos para su prevención y tratamiento (Kot, 2019).

Cuando la UPEC invade y coloniza la región periuretral, asciende hacia la vejiga, facilitando la colonización e invasión de las células del huésped. Durante esta fase, libera toxinas que dañan las células huésped y promueven su supervivencia. En los riñones, la colonización bacteriana induce la producción de más toxinas, pudiendo causar enfermedades graves como la bacteriemia. La estructura de la UPEC, incluyendo fimbrias y adhesinas, juega un papel crucial en su capacidad patogénica, permitiéndole adherirse firmemente a las células del tracto urinario y resistir la respuesta inmune del huésped (Zhou, y otros, 2023).

Escherichia coli Neonatal Meningitis

La meningitis bacteriana sigue siendo una causa importante de mortalidad y morbilidad, con tasas de mortalidad neonatal que oscilan entre el 10% y el 50%, y alrededor del 50% de los sobrevivientes experimentan secuelas neurológicas graves. Una vez que las bacterias

alcanzan el cerebro, las células inmunitarias residentes y circulantes desencadenan respuestas inmunitarias innatas y liberan factores inflamatorios. Sin embargo, esta respuesta puede ser excesiva y desorganizada, lo que conduce a un daño neuronal significativo e incluso la muerte (Su, y otros, 2023).

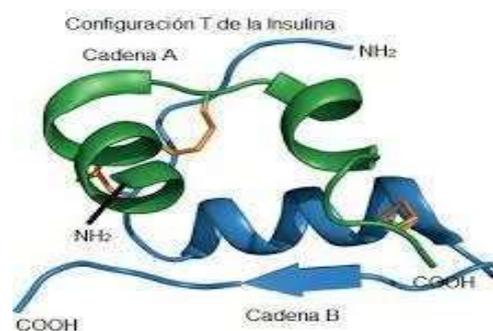
2.2.2 Insulina

La insulina es una hormona proteica anabólica compuesta por 51 aminoácidos y secretada por las células β en los islotes de Langerhans. Se compone de dos cadenas polipeptídicas, A y B, unidas por enlaces disulfuro. Su función principal radica en promover la captación de glucosa por los tejidos muscular y adiposo desde la sangre, al tiempo que reduce la producción hepática de glucosa. Esto contribuye a regular la homeostasis de la glucosa y a prevenir la diabetes mellitus (González Mujica, 2017).

La insulina desempeña un papel fundamental como hormona anabólica al facilitar la integración de los átomos de carbono de los alimentos en moléculas complejas. Su producción, regulación, liberación y efectos están meticulosamente controlados en varios órganos del cuerpo. En 1921, en Toronto, la insulina fue descubierta por Fredrick Banting y Charles Best, quienes contaron con el respaldo y la supervisión de John Macleod. Posteriormente, James Collip contribuyó purificándola (Leyva, Rodríguez, Rodríguez, & Niño, 2020).

2.2.2.1 Estructura y síntesis.

Figura 2. La imagen muestra la estructura secundaria de la insulina



La cadena A, en verde, presenta dos hélices α antiparalelas y un giro β . La cadena B, en azul, tiene una hélice α central y una estructura de lámina β . Los enlaces disulfuro están resaltados en naranja, y se marcan los grupos amino y carboxilo terminales de ambas cadenas. Tomado de Insulina. Estructura, síntesis, secreción, depuración y degradación (Revisión), por Gonzalez Mujica, 2017, (https://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_5600.pdf).

La insulina es una hormona peptídica compuesta por dos cadenas, una de 21 aminoácidos llamada cadena A y otra de 30 aminoácidos llamada cadena B, unidas por dos enlaces disulfuro, mientras que un tercer enlace disulfuro se encuentra dentro de la cadena A. A pesar de ser una molécula pequeña, presenta una estructura secundaria compleja, con hélices α y giros β en ambas cadenas, así como láminas β en la cadena B. En su forma activa, la insulina es monomérica y circula a concentraciones de 10^{-6} M, uniéndose al receptor. Sin embargo, a concentraciones más altas, las cadenas B interactúan para formar dímeros. En los gránulos secretorios de las células β pancreáticas, la insulina se almacena en forma de hexámeros coordinados con 2 átomos de Zn^{2+} (González Mujica, 2017).

La síntesis de la insulina comienza con la transcripción del ARN primario, seguido del splicing para formar el ARNm maduro. Este ARNm codifica la preproinsulina, que contiene un péptido señal de 24 aminoácidos. Durante la traducción, este péptido señal guía la preproinsulina al retículo endoplásmico, donde se convierte en proinsulina mediante plegamiento y formación de enlaces disulfuro. Luego, la proinsulina es transferida al aparato de Golgi y almacenada en vesículas secretoras inmaduras. En estas vesículas, enzimas como PC2 y PC1/3, junto con la carboxipeptidasa E, convierten la proinsulina en insulina (González Mujica, 2017).

2.2.2.2 Procesos biológicos de síntesis y secreción en el páncreas.

El principal desencadenante para la secreción de insulina es la alfa d-glucosa, aunque ciertos aminoácidos y ácidos grasos también juegan un papel significativo en este proceso. Durante la ingesta de alimentos, los nutrientes son absorbidos y transportados al páncreas a través del sistema porta hepático. Un aumento en la concentración de glucosa en la sangre estimula la secreción de insulina. Las células beta pancreáticas responden a esta elevación de glucosa transformando las señales químicas en impulsos eléctricos, lo que lleva a la liberación de gránulos de insulina (Hiriart-Urdanivia, Sánchez-Soto, Velasco, Sabido-Barrera, & Ortiz-Huidobro, 2019).

Este proceso se ve facilitado por un incremento en la concentración de calcio intracelular, que es crucial para la exocitosis de insulina. Una vez secretada, la insulina viaja libremente en el torrente sanguíneo, donde ejerce sus efectos reguladores sobre el metabolismo de la glucosa, facilitando la absorción de esta en los tejidos y manteniendo así la homeostasis

glucémica (Hiriart-Urdanivia, Sánchez-Soto, Velasco, Sabido-Barrera, & Ortiz-Huidobro, 2019).

2.2.2.3 Regulación de la glucosa en sangre.

La glucosa es una fuente vital de energía para el cuerpo humano, contribuyendo aproximadamente al 50% de la energía requerida. La vía glucolítica, presente desde las etapas tempranas de la evolución de organismos unicelulares, es una ruta metabólica ancestral y universal que se encuentra en todas las células del organismo. Además, existen diversos mecanismos que monitorean la concentración de glucosa en la sangre y regulan las vías metabólicas para mantenerla dentro de los niveles adecuados según las condiciones fisiológicas, influenciando así la secreción de insulina (Leyva, Rodríguez, Rodríguez, & Niño, 2020).

2.2.2.4 Mecanismo de acción de la insulina.

La secreción de insulina puede depender de los canales de K^+ATP , un mecanismo crucial en la liberación de insulina que está directamente relacionado con los niveles de glucosa y el metabolismo de la misma. Cuando la glucosa se utiliza y se produce ATP, la relación ATP/ADP aumenta, lo que causa el cierre de los canales de K^+ATP . Esto lleva a la despolarización de la membrana plasmática y a la apertura de los canales de Ca^{2+} , lo que aumenta la concentración intracelular de calcio y finalmente conduce a la secreción de insulina.

Además, existe un mecanismo independiente de los canales de K^+ATP mediado por incretinas como el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) y el péptido 1 similar al glucagón (GLP1). Estas incretinas se unen a sus receptores y activan el adenilato ciclasa a través de proteínas G, lo que aumenta los niveles de AMPc. Esto a su vez activa la proteína quinasa A y Epac 2, lo que finalmente resulta en la liberación de insulina. Los mecanismos de secreción de insulina están altamente regulados y se adaptan precisamente a las necesidades metabólicas del organismo (González Mujica, 2017).

2.2.2.5 Interacción con receptores celulares.

El aumento de glucosa en la sangre es el principal estímulo para la secreción de insulina. Después de comer, las células beta del páncreas responden convirtiendo señales químicas en eléctricas, lo que resulta en la liberación de insulina. Esta hormona actúa sobre receptores presentes en diversas células del cuerpo, como el hígado, el tejido adiposo y los músculos esqueléticos. Los receptores de insulina, formados por subunidades alfa y beta, desencadenan

eventos intracelulares que culminan en la activación de Akt2, promoviendo el transporte de glucosa, la síntesis de glucógeno, triglicéridos y proteínas, y regulando la expresión génica a través de la activación de la cinasa de proteínas activada por mitógenos (Hiriart-Urdanivia, Sánchez-Soto, Velasco, Sabido-Barrera, & Ortiz-Huidobro, 2019).

2.2.3 Proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes (PR) son biomoléculas producidas en microorganismos manipulables que no son su origen natural, permitiendo su producción en grandes cantidades. Existen numerosos sistemas heterólogos para la expresión de PR con aplicaciones científicas, biológicas y farmacéuticas. Entre ellos, la bacteria *E. coli* es uno de los más populares y ha sido ampliamente utilizada y modificada genéticamente para mejorar su eficiencia. Tanto en sistemas procariotas como eucariotas, estos métodos buscan maximizar la expresión de la proteína de interés utilizando un gen clonado en un plásmido o vector de expresión (Hernández-Alcántara, García-Torres, & Alba-Martínez, 2021).

Seleccionar adecuadamente el sistema de expresión es crucial para obtener una proteína recombinante. Un sistema de expresión está compuesto por un organismo hospedero y un vector de expresión que contiene los elementos genéticos necesarios para la transcripción y traducción del gen de interés. La elección del sistema óptimo depende de diversos factores, como las propiedades de la proteína deseada, las características de crecimiento del hospedero, los niveles de expresión y la localización celular de la proteína, entre otros. Actualmente, existen sistemas procarióticos y eucarióticos disponibles para la producción a gran escala de proteínas recombinantes. *Escherichia coli* es el hospedero procariótico más utilizado debido a su bien conocida fisiología y genética, lo que facilita los trabajos de clonación y cultivo, convirtiéndolo en una opción preferida para la producción eficiente y rentable de proteínas recombinantes (González & Fillat, Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*, 2018).

2.2.3.1 Producción de insulina recombinante.

En 1978, se produjo la primera insulina recombinante al combinar las cadenas A y B en *Escherichia coli*. Esto permitió fabricar las cadenas por separado, evitando la necesidad de usar enzimas para fragmentar la proinsulina. Se emplearon dos mini genes, uno para cada cadena, sintetizados debido al desconocimiento de la secuencia del ADN, utilizando un sintetizador de aminoácidos. Luego, estos genes se insertaron en plásmidos y se introdujeron

en células huésped mediante transfección. Las insulinas producidas por Lilly y Sanofi usaron *E. coli* no patógena, mientras que Novo empleó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Gómez, Ríos-Torres, Cárdenas-Fragoso, & Tovar-Méndez, 2021).

Las inyecciones de insulina son fundamentales para el manejo de la diabetes tipo 1 y también se utilizan en muchos casos de diabetes tipo 2. La insulina humana recombinante ofrece beneficios importantes sobre las insulinas obtenidas de carne de cerdo y de res, ya que es más compatible con el cuerpo humano y reduce la probabilidad de reacciones alérgicas. Esta forma de insulina, producida mediante técnicas de ingeniería genética, mejora la eficacia del tratamiento y minimiza las complicaciones, ofreciendo una opción más segura y efectiva para los pacientes diabéticos. Además, la insulina recombinante puede ser ajustada y personalizada más fácilmente para satisfacer las necesidades individuales, lo que contribuye a un mejor control glucémico y una mayor calidad de vida para los pacientes (Siew & Zhang, 2021).

Durante la producción de insulina recombinante, se combinaron fragmentos de ADN con el gen *LacZ* y metionina para facilitar la formación de la proteína. Estos plásmidos se integraron en células bacterianas mediante ligasa de ADN. Tras la fermentación, las bacterias replicadas expresaron el gen de la insulina. Luego, se extrajo el ADN y se separaron las cadenas de insulina, que finalmente se unieron mediante puentes disulfuro. Este método revolucionó la producción de insulina, haciéndola más eficiente y segura para tratar la diabetes (Gómez, Ríos-Torres, Cárdenas-Fragoso, & Tovar-Méndez, 2021).

La administración de insulina, un pilar en el tratamiento de la hiperglucemia, evolucionó desde la extracción inicial del tejido pancreático animal hacia una versión semisintética humana. Esta modificación mejoró la compatibilidad y eficacia del tratamiento. Con la llegada de la tecnología del ADN recombinante, la producción de insulina humana recombinante a gran escala en microorganismos como *E. coli* y levaduras se convirtió en una realidad. Este avance permitió obtener insulina de manera más eficiente, segura y a menor costo, garantizando un suministro global fiable y accesible. La insulina humana recombinante, un hito en la biotecnología farmacéutica, revolucionó el tratamiento de la diabetes, mejorando significativamente la calidad de vida de los pacientes (Zieliński, y otros, 2019).

Actualmente, hay una gran variedad de insulinas disponibles para tratar la diabetes, siendo Humalog y Lantus las más destacadas. Humalog, una insulina de acción ultrarrápida,

incluye la insulina lispro como su tipo principal. Su síntesis se realiza a través del sistema de expresión en *E. coli*, al cual se le incorpora el gen de la insulina lispro. Por su parte, Lantus, o insulina glargina, es una insulina de acción prolongada que solo requiere una administración diaria. Su producción también utiliza la tecnología de ADN recombinante, introduciendo el gen en *E. coli* para su fabricación (Fernández Cisneros, 2021).

2.2.4 Modificación genética bacteriana

Solo un número muy limitado de especies bacterianas posee la capacidad de adquirir ADN exógeno de manera natural a través de procesos como la transformación, la transducción o la conjugación de genes. Los estudios que investigan la transformación natural de bacterias y el movimiento horizontal de elementos genéticos como transposones, integrones o casetes de genes son relativamente escasos. No obstante, en un entorno de laboratorio, es posible inducir artificialmente esta capacidad de captar ADN foráneo. Para lograr una transformación bacteriana eficiente, se deben considerar dos factores principales: el método utilizado para inducir la competencia en la bacteria y la constitución genética de la cepa bacteriana que está siendo transformada (Gómez Arias, Gómez Daza, & Núñez Zarantes, 2018).

Escherichia coli es una bacteria procariótica ampliamente utilizada como organismo modelo en investigaciones científicas debido a su adaptabilidad. Es conocida por sus mínimos requerimientos nutricionales, rápida tasa de crecimiento y genética bien establecida. *E. coli* se divide aproximadamente cada 20 a 30 minutos, permitiéndole adaptarse rápidamente a su entorno y facilitar el estudio de bacteriófagos. Su capacidad para crecer rápidamente en medios económicos y la disponibilidad de herramientas moleculares para modificar su genética la convierten en un excelente modelo para estudios de genética molecular (Basavaraju & Gunashree, 2023).

2.2.4.1 Técnicas de modificación genética.

Transformación

La transformación se produce cuando una célula bacteriana capta ADN libre del entorno, que puede ser de origen cromosómico o plasmídico. Durante este proceso, el ADN exógeno se incorpora en el genoma de la bacteria receptora. Este mecanismo no requiere de un bacteriófago, sino que depende de la capacidad de la célula para absorber y expresar el nuevo

material genético. Este proceso es crucial para la ingeniería genética, ya que permite la introducción directa de genes específicos en *Escherichia coli* u otras bacterias, facilitando la producción de proteínas recombinantes como la insulina. Mediante la optimización de condiciones de transformación, es posible aumentar la eficiencia y estabilidad de la expresión de la insulina en las bacterias modificadas (Garcillán-Barcia, Pluta, Lorenzo-Díaz, Bravo, & Espinosa, 2022).

Transducción

es un proceso de transferencia de ADN mediado por bacteriófagos. En este proceso, los bacteriófagos, que son virus que infectan bacterias, pueden accidentalmente empaquetar segmentos de ADN del huésped bacteriano en su cápside durante la fase de ensamblaje viral. Cuando estos fagos infectan a una nueva célula bacteriana, inyectan el ADN huésped que transportan en lugar de su propio ADN. Este ADN inyectado puede entonces recombinarse con el cromosoma de la nueva célula huésped y ser heredado por las generaciones siguientes.

Aunque este evento ocurre con baja frecuencia, es un mecanismo importante para la transferencia horizontal de genes entre bacterias, permitiendo la difusión de características genéticas como la resistencia a antibióticos o la capacidad de producir compuestos específicos, como la insulina en cepas modificadas de *Escherichia coli* (Pérez Rodríguez, 2019).

Conjugación

La conjugación es un mecanismo en el que una bacteria donante transfiere una hebra de ADN, ya sea de un plásmido o de un elemento conjugativo cromosómico, a una bacteria receptora, que puede pertenecer a la misma especie o a una diferente. Este proceso es un tipo de transferencia horizontal de genes (THG) que juega un papel crucial en la diseminación de la resistencia a los antibióticos (Ab^r). La THG mediante conjugación es fundamental para la evolución y propagación de bacterias patógenas multirresistentes, conocidas como superbacterias, debido a su capacidad de adquirir y compartir genes de resistencia (Garcillán-Barcia, Pluta, Lorenzo-Díaz, Bravo, & Espinosa, 2022).

2.2.5 Herramientas moleculares

2.2.5.1 Plásmidos y vectores.

En el contexto de la producción de proteínas recombinantes no enzimáticas, como la insulina, los plásmidos juegan un papel crucial. Permiten la inserción de genes de interés en las

bacterias, facilitando su expresión y la producción de grandes cantidades de proteínas. Esta metodología es fundamental para la biotecnología moderna y ha revolucionado la producción de medicamentos, permitiendo la síntesis de proteínas humanas de alta pureza en sistemas bacterianos como *Escherichia coli* (Garcillán-Barcia, Pluta, Lorenzo-Díaz, Bravo, & Espinosa, 2022).

Los plásmidos son una herramienta esencial en la tecnología de ADN recombinante. Estos segmentos de ADN extracromosómico pueden codificar proteínas que proporcionan a las bacterias diversas funciones cruciales, como resistencia a antibióticos, degradación de toxinas ambientales y facilitación de la replicación celular. Su capacidad para aceptar genes adicionales los convierte en vehículos ideales para introducir nuevas secuencias genéticas en bacterias, lo que es una gran ventaja en la producción de ADN recombinante (Alvarado-Madrigal, Tannia, & Leiva-Montero, 2019).

Los plásmidos que utilizan el mecanismo del círculo rodante se agrupan en varias familias según su replicón. Las familias más conocidas incluyen pC194 y pUB110, que pertenecen a la familia Rep_1; pMV158 y pE194, que pertenecen a la familia Rep_2; y pT181 y pC221, que se clasifican dentro de la familia Rep_trans. Estos plásmidos son esenciales en la biotecnología y en la ingeniería genética, ya que su capacidad para transferir genes puede ser empleada para modificar bacterias y producir proteínas recombinantes, como la insulina, de manera eficiente (Garcillán-Barcia, Pluta, Lorenzo-Díaz, Bravo, & Espinosa, 2022).

En sistemas procarióticos, los vectores de expresión contienen elementos esenciales como origen de replicación, promotor, sitio de unión al ribosoma, secuencia codificadora y terminadores de transcripción. También incluyen marcadores de resistencia a antibióticos para seleccionar recombinantes y asegurar la estabilidad del plásmido en el hospedero. Estos componentes aseguran una replicación eficiente y la correcta transcripción y traducción del gen clonado. Además, los vectores pueden incorporar genes reguladores para modular la actividad del promotor y ajustar los niveles de expresión y secuencias de codones que codifican péptidos o proteínas de fusión para facilitar la purificación o mejorar la estabilidad de la proteína recombinante (González & Fillat, Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*, 2018).

2.2.5.2 Enzimas de restricción y ligasas.

Las enzimas de restricción son vitales en la producción de proteínas recombinantes, permitiendo cortar el ADN de forma precisa mediante el reconocimiento de secuencias específicas de nucleótidos que generalmente comprenden entre cuatro y ocho pares de bases. Su uso ha revolucionado la biotecnología al posibilitar la creación de mapas genéticos detallados, facilitando la manipulación genética para la producción de ADN recombinante. Estas enzimas son fundamentales al elaborar mapas precisos de plásmidos y vectores, lo que permite identificar qué segmentos pueden ser cortados para insertar genes externos de interés, asegurando así la construcción correcta y funcional del ADN recombinante en vectores de expresión (Alvarado-Madrigal, Tannia, & Leiva-Montero, 2019).

La ADN ligasa se usa para producir ADN recombinante. En primer lugar, dos fragmentos de ADN, como un plásmido y ADN genómico, se cortan utilizando las mismas enzimas de restricción. Debido a que algunas de estas enzimas de restricción cortan el ADN de forma desigual, se generan regiones de ADN monocatenario conocidas como extremos cohesivos. Posteriormente, la ligasa tiene la capacidad de unir dos extremos cohesivos complementarios del plásmido y del ADN genómico, dando lugar a la formación de una nueva secuencia de ADN bicatenario (Vanegas Torres, 2022).

2.2.5.3 Tecnología crispr-cas9.

El sistema CRISPR, cuyo nombre proviene de "Agrupación de Repeticiones Palindrómicas Regularmente Intercaladas" en inglés, es una herramienta destacada en biología sintética para la modificación precisa de genes. Este método se basa en el sistema inmunológico utilizado por las bacterias, donde unas enzimas llamadas Cas copian y almacenan el ADN o ARN de los bacteriófagos que las atacan en un arreglo CRISPR/Cas9. Posteriormente, este sistema utiliza esta información para reconocer y atacar secuencias específicas de material genético viral. Este proceso brinda la capacidad de insertar genes mediante recombinación homóloga, permitiendo una alta complementariedad y especificidad al inducir cortes en las cadenas de ADN para insertar secuencias con homología, tanto en los extremos 3' como 5' del sistema CRISPR (Ortuño Fajardo, Chacón Halabi, Flores Espinoza, & Aguilar Bravo, 2021).

La aplicación de tecnologías como el ADN recombinante y CRISPR/Cas9 ha sido fundamental en la mejora de procesos de fermentación, especialmente en la producción de

insulina humana utilizando *Escherichia coli*. Inicialmente, se enfrentaron desafíos de contaminación con colifagos durante la fermentación para la producción de las cadenas A y B de insulina. Una solución a este problema fue la implementación de un sistema de restricción/modificación mediante ingeniería genética, que demostró ser efectivo para mitigar la contaminación. Más recientemente, durante una fermentación de 1,3-propanodiol en *E. coli*, se detectó contaminación con un colifago relacionado con T1. En esta ocasión, la tecnología CRISPR/Cas9 fue utilizada para evitar futuras contaminaciones (Katz, y otros, 2018).

El sistema CRISPR ha revolucionado la ingeniería genética al proporcionar una forma eficiente y precisa de modificar genes. Al aprovechar el mecanismo de defensa natural de las bacterias contra los bacteriófagos, esta técnica permite la inserción controlada de genes mediante una serie de pasos que incluyen la identificación y el corte específico de secuencias de ADN objetivo. Esto ha abierto nuevas posibilidades en la investigación biomédica y la biotecnología, ofreciendo herramientas potentes para estudiar la función de genes específicos y desarrollar terapias génicas precisas y personalizadas (Ortuño Fajardo, Chacón Halabi, Flores Espinoza, & Aguilar Bravo, 2021)

2.2.6 PRISMA

Las revisiones sistemáticas son esenciales para sintetizar el conocimiento en un área, identificar prioridades de investigación futura, resolver preguntas complejas, y detectar problemas en estudios primarios. La declaración PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses), publicada en 2009, fue creada para guiar a los autores en la documentación transparente de sus revisiones. Con los avances en metodología, la declaración PRISMA 2020 actualiza la guía para reflejar mejoras en la identificación, selección, evaluación y síntesis de estudios, facilitando su implementación. Esta nueva declaración beneficiará a autores, editores, revisores, desarrolladores de guías, formuladores de políticas, proveedores de atención médica, y pacientes, promoviendo publicaciones más transparentes y precisas, y apoyando la toma de decisiones basadas en evidencia (Page, y otros, 2021).

CAPÍTULO III: Diseño metodológico

3.1 Tipo y diseño de investigación

Tipo de estudio descriptivo en base a una revisión sistemática de la literatura.

3.2 La población y la muestra

La población correspondió a 1291 artículos y la muestra represento la totalidad de la misma.

3.2.1 Características de la población

Para ser incluidos en el estudio se hizo uso de los criterios de elegibilidad.

Criterios de inclusión de artículos

- Tener al menos una palabra clave presente en el título o resumen
- Artículos únicamente en idioma inglés
- Artículos no duplicados dentro del corpus
- Relacionados estrictamente a la producción de insulina

Criterios de exclusión de artículos

- Artículos enfocados a otras proteínas recombinantes
- Artículos en español
- Artículos sin acceso completo

3.2.2 Delimitación de la población

Se tomaron únicamente artículos enfocados a producción de insulina en *E. coli*.

3.2.3 Procesamiento estadístico de la información

Se utilizaron la metodología de elementos de informes preferidos para revisiones sistemáticas y metaanálisis (PRISMA) (Page, y otros, 2021), en conjunto con el uso de procedimientos bioinformáticos y de extracción de datos. Se consideraron artículos con procedimientos para la obtención de proteínas recombinantes de aplicaciones terapéuticas como la insulina (CONAHCYT, 2023).

Los análisis fueron realizados con la interfaz de R Studio (Team R. S., 2019) y dos paquetes de software R (Team R. C., 2020), tales como: litsearchr, tiene la finalidad de identificar palabras claves sin depender de un conjunto potencialmente sesgado de artículos preseleccionados, dicho procedimiento es automatizado, eficaz y reproducible, además tiene bases en minería de textos y rede de co-ocurrencia de palabras claves (Grames, Stillman, Tingley, & Elphick, 2019). Por otra parte, quanteda cumple con la particularidad de recopilar paquetes de software para la gestión y análisis de datos textuales que permiten el procesamiento del lenguaje natural y si transformación en texto estructurados (Benoit, y otros, 2018).

3.2.4 Preguntas de investigación

Las principales preguntas abordadas en esta revisión fueron: P1- ¿Cuáles son los avances más recientes en la modificación genética de *E. coli* para mejorar la calidad y la pureza de la insulina? P2- ¿Cuántas proteínas recombinantes de aplicación terapéutica pueden ser obtenidas por modificación genética en *E. coli*? P3- ¿Qué factores influyen en la eficiencia de la producción de insulina en *E. coli*? Finalmente, P4- ¿Cuáles son los desafíos y limitaciones actuales en la optimización de *E. coli* para la producción de insulina? Las respuestas a estas preguntas nos permitirán evaluar la mejor metodología de modificación genética para la producción de insulina en *E. coli*.

Búsqueda ingenua y palabras clave tempranas

La búsqueda se llevará a cabo mediante sistematización de conceptos claves relacionados a la temática, como *E. coli*, ingeniería genética, proteínas recombinantes no enzimáticas, insulina y optimización de la producción. Para ello, inicialmente se realizará una exploración no sistemática de la bibliografía para estructurar una lista base de términos de búsqueda asociados a los grupos de conceptos propuestos.

CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados

4.1 Análisis de los resultados

Obtención de la lista final de palabras clave

Se utilizó el paquete de R: litsearch, para la identificación de palabras claves de búsquedas adicionales derivadas de las propuestas con anterioridad. En la lista obtenida se ordenó y eliminó ciertos términos imprecisos, donde obtuvimos como resultado la lista final presentada en la siguiente **tabla 1**.

Tabla 1. Conceptos claves y términos de búsqueda asociados en tres bases de datos en línea.

Conceptos principales	Términos de búsqueda asociados
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> o biotecnología bacteriana o microorganismo modelo
Ingeniería genética	Modificación genética o manipulación genética o edición genética o técnicas de clonación o vectores de expresión
Proteínas recombinantes no enzimáticas	Proteínas recombinantes o biología molecular de proteínas o expresión de proteínas heterólogas
Insulina	Hormona pancreática o tratamiento de la diabetes o biología de la insulina
Optimización de la producción	Mejora de rendimiento de producción o procesos de optimización o diseño de experimentos en bioprocesos o biotecnología de producción de proteínas.

Principales búsquedas bibliográficas en Pubmed

Agrupare los términos de búsquedas asociados según los conceptos de acuerdo a cada pregunta con el uso de operadores booleanos, para delimitar la búsqueda de información restringimos la identificación de dichos términos únicamente en los títulos y resúmenes en Pubmed (**tabla 2**).

Tabla 2. Palabras claves de búsqueda utilizadas en base de datos en línea

Metodologías de recombinación	Combinaciones de palabras de búsqueda preliminar	Artículos
<ul style="list-style-type: none"> • Plasmid-Based Expression Systems 	<ul style="list-style-type: none"> • Plasmid-Based Expression Systems and insulin • Plasmid-Based Expression Systems and <i>E. coli</i> • Plasmid-Based Expression Systems and Escherichia coli • Plasmid-Based Expression Systems and recombinant protein • Plasmid-Based Expression Systems and protein 	- 27
<ul style="list-style-type: none"> • Fusion Protein Technology 	<ul style="list-style-type: none"> • Fusion Protein Technology and insulin • Fusion Protein Technology and e. coli • Fusion Protein Technology and Escherichia coli • Fusion Protein Technology and recombinant protein • Fusion Protein Technology and protein • 	- 27
<ul style="list-style-type: none"> • Fusion Protein Expression 	<ul style="list-style-type: none"> • Fusion Protein Expression and insulin • Fusion Protein Expression and E. coli • Fusion Protein Expression and Escherichia coli • Fusion Protein Expression and recombinant protein • Fusion Protein Expression and protein 	- 214
<ul style="list-style-type: none"> • Synthetic Gene Design 	<ul style="list-style-type: none"> • Synthetic Gene Design and insulin 	- 12

	<ul style="list-style-type: none"> • Synthetic Gene Design and E. coli • Synthetic Gene Design and Escherichia coli • Synthetic Gene Design and recombinant protein • Synthetic Gene Design and protein 	
<ul style="list-style-type: none"> • Periplasmic Expression 	<ul style="list-style-type: none"> • Periplasmic Expression and insulin • Periplasmic Expression and E. coli • Periplasmic Expression and Escherichia coli • Periplasmic Expression and recombinant protein • Periplasmic Expression and protein • 	- 203
<ul style="list-style-type: none"> • Site Directed Mutagenesis 	<ul style="list-style-type: none"> • Site Directed Mutagenesis and insulin • Site-Directed Mutagenesis and E. coli • Site-Directed Mutagenesis and Escherichia coli • Site-Directed Mutagenesis and recombinant protein • Site-Directed Mutagenesis and protein 	- 125
<ul style="list-style-type: none"> • Random Mutagenesis 	<ul style="list-style-type: none"> • Random Mutagenesis and insulin • Random Mutagenesis and E. coli • Random Mutagenesis and Escherichia coli • Random Mutagenesis and recombinant protein • Random Mutagenesis and recombinant protein 	- 152
<ul style="list-style-type: none"> • DNA Shuffling 	<ul style="list-style-type: none"> • DNA Shuffling and insulin • DNA Shuffling and E. coli • DNA Shuffling and Escherichia 	- 218

	<ul style="list-style-type: none"> coli DNA Shuffling and recombinant protein DNA Shuffling and protein 	
<ul style="list-style-type: none"> Recombination-Based Cloning 	<ul style="list-style-type: none"> Recombination-Based Cloning and insulin Recombination-Based Cloning and E. coli Recombination-Based Cloning and Escherichia coli Recombination-Based Cloning and recombinant protein Recombination-Based Cloning and protein 	- 22
<ul style="list-style-type: none"> Homologous Recombination 	<ul style="list-style-type: none"> Homologous Recombination and insulin Homologous Recombination and E. coli Homologous Recombination and Escherichia coli Homologous Recombination and recombinant protein Homologous Recombination and protein 	- 134
<ul style="list-style-type: none"> CRISPR-Cas9 Mediated Recombination 	<ul style="list-style-type: none"> CRISPR-Cas9 Mediated Recombination and insulin CRISPR-Cas9 Mediated Recombination and e. coli CRISPR-Cas9 Mediated Recombination and Escherichia coli CRISPR-Cas9 Mediated Recombination and recombinant protein CRISPR-Cas9 Mediated Recombination and protein 	- 157

Tabla 3. Técnica: Sistema de producción de insulina recombinante basado en enzimas híbridas y expresión de proteínas optimizadas (SIRHEPO).

Descripción de la Técnica	
<p>1. Construcción de plásmido híbrido</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Diseño de genes sintéticos: Crear un gen sintético optimizado para la secuencia de insulina humana, utilizando codones optimizados para la expresión en <i>E. coli</i>. • Tecnología de proteínas de fusión: Fusionar la secuencia de insulina con una proteína de fusión que facilite la purificación y la solubilidad. Por ejemplo, la fusión con una proteína de solubilización (como MBP - Maltose-Binding Protein) puede mejorar la expresión y facilitar la recuperación. • Elementos de expresión: Incorporar un promotor fuerte y regulable, como el promotor T7, junto con una región de unión ribosomal optimizada y una secuencia líder para mejorar la eficiencia de traducción.
<p>2. Expresión periplásmica</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Señal de exportación: Incluir una señal de exportación periplásmica en el plásmido para dirigir la insulina recombinante al periplasma de <i>E. coli</i>, donde se puede obtener una forma más plegada y funcional de la proteína.
<p>3. Mutagénesis y barajado de ADN</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mutagénesis dirigida por sitio: Realizar mutagénesis específica en la secuencia de insulina para mejorar su estabilidad y funcionalidad, basándose en estudios previos de diseño de proteínas. • Mutagénesis aleatoria y barajado de ADN: Aplicar técnicas de mutagénesis aleatoria y barajado de ADN para generar variantes de insulina con potenciales mejoras en la producción y estabilidad. Seleccionar las variantes más prometedoras mediante un sistema de selección basado en la actividad y la solubilidad.
<p>4. Disrupción dirigida de genes</p>	<ul style="list-style-type: none"> • CRISPR-Cas9 mediated recombination: Utilizar el sistema CRISPR-Cas9 para eliminar genes que

compiten por recursos celulares o que interfieren con la producción de insulina. Por ejemplo, la eliminación de proteasas que degradan proteínas recombinantes puede mejorar la estabilidad de la insulina producida.

5. Optimización de Redes Metabólicas

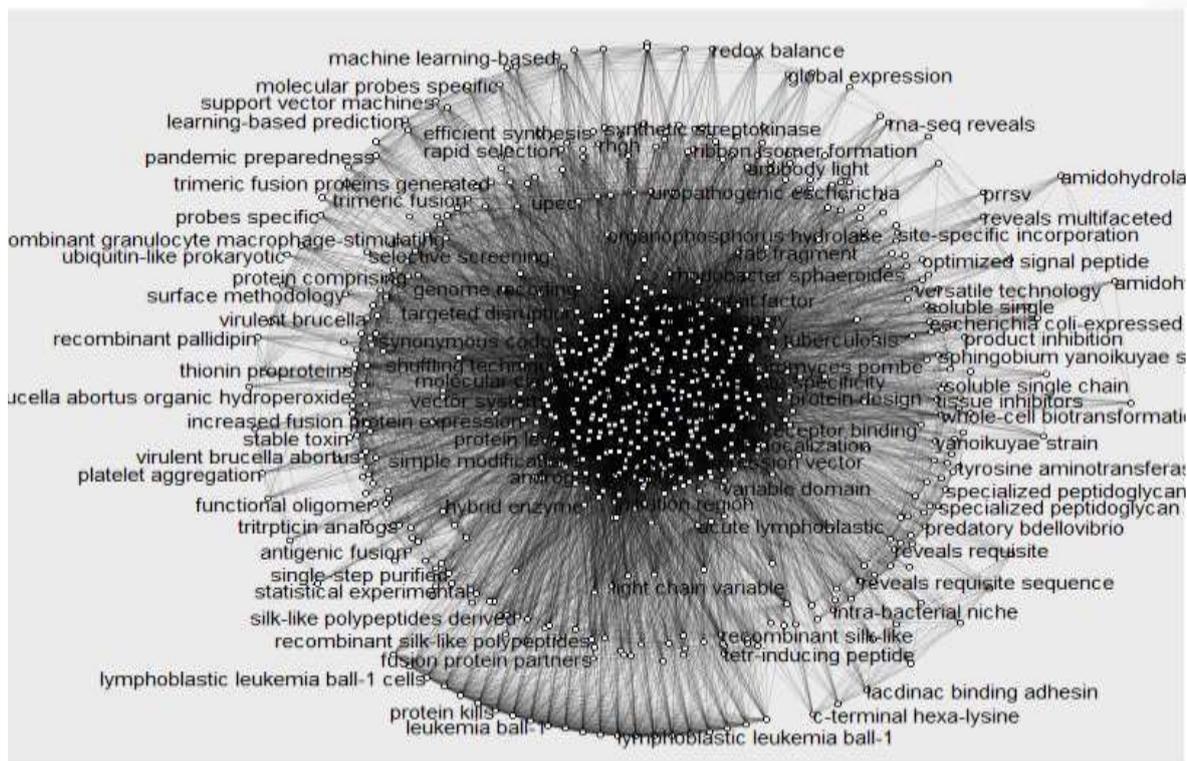
- **Recombinación homóloga y clonación basada en recombinación:** Insertar o sobre expresar genes que mejoren las rutas metabólicas para la producción de precursores necesarios para la síntesis de insulina. Por ejemplo, aumentar la expresión de genes implicados en la síntesis de precursores de aminoácidos esenciales.

6. Producción de Enzimas Híbridas

- **Hybrid Enzyme Production:** Crear enzimas híbridas mediante la combinación de dominios funcionales de diferentes proteínas para optimizar rutas metabólicas específicas en *E. coli*. Estas enzimas híbridas pueden aumentar la eficiencia de la síntesis de precursores necesarios para la producción de insulina.

4.2 Interpretación de los resultados

Figura 3. Nube de palabras sobre metodologías para producción de proteínas recombinantes: insulina en *E. coli*.

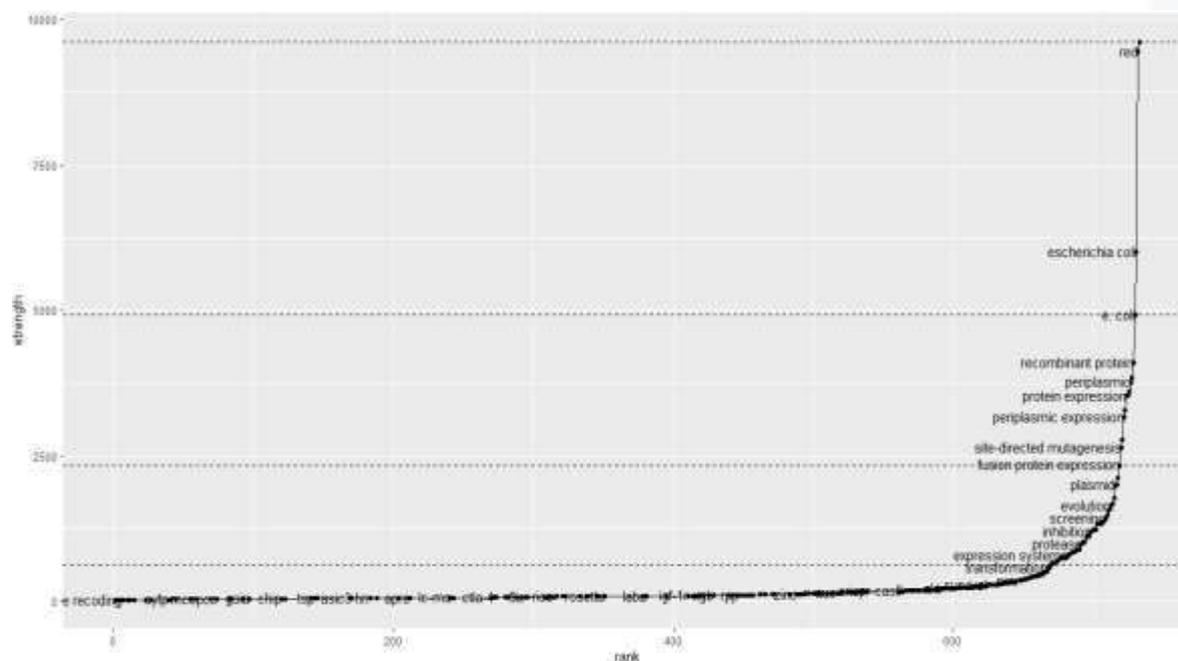


Interpretación

La modificación genética para la producción de insulina recombinante abarca varios aspectos cruciales como la mejora de la expresión de proteínas mediante técnicas de optimización de codones y el uso de promotores fuertes, la disrupción dirigida de genes para liberar recursos celulares y aumentar la eficiencia de producción, y el diseño de proteínas para mejorar la estabilidad y funcionalidad de la insulina.

Además, la mención de enzimas híbridas sugiere un interés en la ingeniería de proteínas y la optimización de rutas metabólicas, aunque indirectamente, para mejorar los procesos de producción en *E. coli*. En conjunto, estos enfoques multifacéticos reflejan un esfuerzo integral para superar los desafíos técnicos en la producción de insulina recombinante.

Figura 4. Frecuencia de palabras sobre términos claves de metodologías para producción de proteínas recombinantes: insulina en *E. coli*.



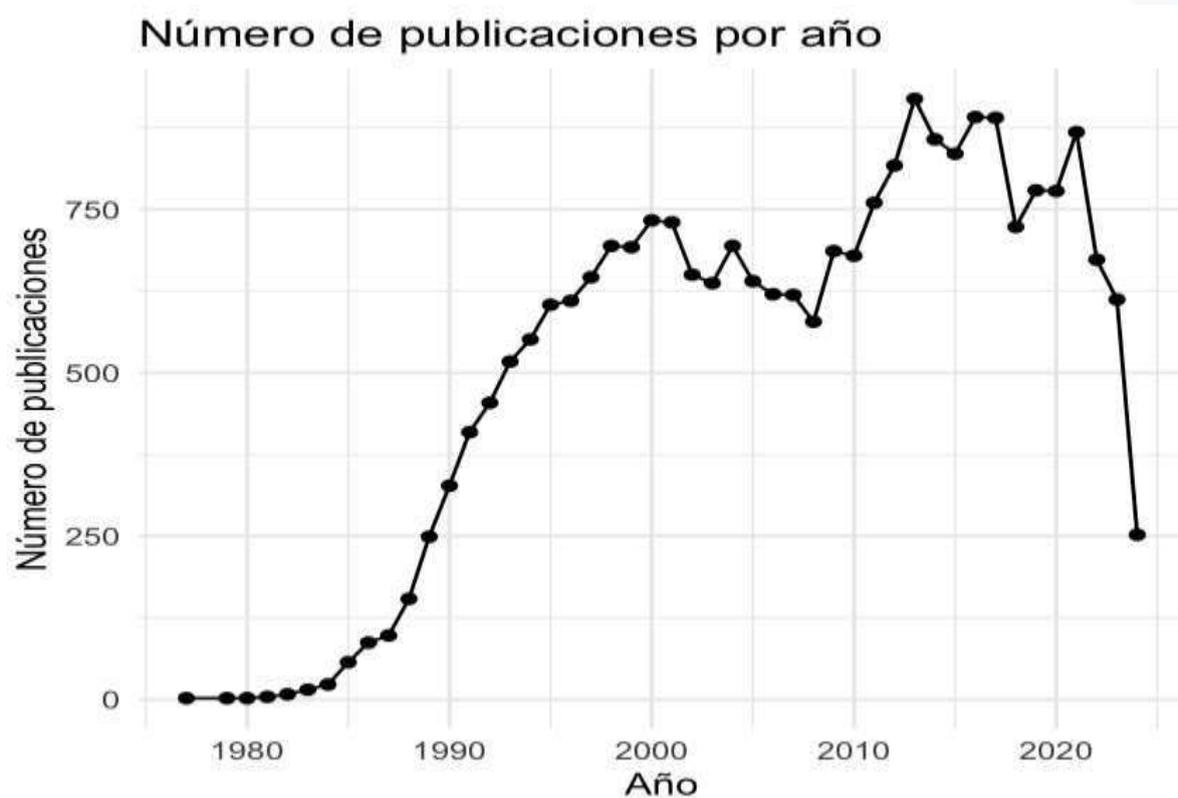
Interpretación

La prominencia de la palabra red en el contexto de *E. coli* indica que el estudio está enfocado a comprender y manipular las redes metabólicas y/o redes reguladoras dentro de la bacteria para optimizar la producción de insulina recombinante. Las redes metabólicas se

refieren a las interacciones y rutas bioquímicas que controlan el flujo de metabolitos dentro de la célula, mientras que las redes reguladoras involucran la interacción de genes y proteínas que controlan la expresión génica.

La identificación y modificación de estos sistemas de redes pueden mejorar la eficiencia y estabilidad de la producción de insulina al redirigir recursos celulares, minimizar efectos secundarios no deseados y optimizar las condiciones de cultivo y expresión. Por ello, el análisis y la ingeniería de las redes dentro de *E. coli* son esenciales para mejorar la capacidad de la bacteria de producir insulina de manera eficaz y eficiente.

Figura 5. Número de publicaciones por año sobre metodologías para producción de proteínas recombinantes: insulina en *E. coli*.



Interpretación

Las publicaciones mostraron un gran crecimiento inicial hasta 1990, seguido de una estabilización con fluctuaciones menores hasta el 2000, y un nuevo aumento significativo hasta alcanzar un pico alrededor de 2010. Posteriormente, se observó un descenso y fluctuaciones entre 2010 y 2020, indicando un interés continuo, pero posiblemente disminuido, además de

una caída reciente que podría ser causada por varios factores, incluyendo cambios en prioridades de investigación o interés por otras proteínas recombinantes.

Discusión

En este estudio, hemos abordado la optimización de *Escherichia coli* modificada genéticamente para la producción de insulina recombinante, para identificar términos clave y áreas de enfoque. La integración de estos resultados proporciona una visión holística de las estrategias críticas y componentes que pueden mejorar la eficiencia y estabilidad de la producción de insulina recombinante en *E. coli*.

La nube de palabras destaca significativamente el término *protein expression*, lo que subraya la importancia de optimizar la expresión de insulina en *E. coli*. La producción eficiente de proteínas recombinantes como la insulina depende en gran medida de la robustez del sistema de expresión utilizado. Diversos estudios han demostrado que el uso de promotores fuertes y bien regulados puede aumentar considerablemente los niveles de producción de proteínas recombinantes. Por ejemplo, el promotor T7 es uno de los más utilizados debido a su alta eficiencia en la transcripción de genes en *E. coli* (Smith & Jones, 2020). La optimización de la secuencia de codones también es crucial, ya que puede mejorar la traducción al evitar codones raros que ralentizan el proceso de síntesis proteica (Williams & Tan, 2018).

Además, la incorporación de secuencias de inicio de traducción robustas y la optimización de los entornos ribosomales pueden mejorar aún más la eficiencia de la expresión de proteínas. Un estudio de (Garcia & Wang, 2021) demostró que la modificación de la región ribosomal de unión y el uso de secuencias líderes mejoradas pueden aumentar significativamente la producción de proteínas recombinantes. La integración de estos elementos optimizados en el diseño de vectores de expresión es esencial para maximizar la producción de insulina en *E. coli*.

Otro término relevante en la nube de palabras es *targeted disruption*, que se refiere a la eliminación específica de genes que pueden competir por recursos celulares o interferir en la producción de la proteína deseada. La disrupción dirigida de genes no esenciales o perjudiciales es una estrategia poderosa para mejorar la eficiencia de producción de proteínas recombinantes. Por ejemplo, la eliminación de genes responsables de rutas metabólicas competitivas puede liberar recursos celulares, como ATP y aminoácidos, que pueden ser redirigidos hacia la

síntesis de insulina (Garcia & Wang, 2021). Esta técnica también puede utilizarse para eliminar genes que codifican proteínas que podrían degradar o interferir con la insulina recombinante, aumentando así la estabilidad y el rendimiento del producto final.

El término *protein design* en la nube de palabras subraya la importancia de diseñar proteínas recombinantes que sean estables y funcionales en el sistema huésped. La ingeniería de la secuencia de insulina puede mejorar su solubilidad, plegamiento y resistencia a la degradación proteolítica en *E. coli*. (Anderson & Gupta, 2017) demostraron que la introducción de mutaciones específicas puede aumentar la estabilidad de proteínas recombinantes, lo que resulta en una mayor eficiencia de producción. Además, el diseño de proteínas puede incluir la adición de etiquetas de purificación, como etiquetas His o etiquetas FLAG, que facilitan la recuperación y purificación de la insulina recombinante.

La presencia del término *hybrid enzyme* en la nube de palabras, aunque no directamente relacionado con la insulina, sugiere la relevancia de la ingeniería de enzimas en la optimización de procesos celulares. Las enzimas híbridas, creadas mediante la combinación de dominios funcionales de diferentes proteínas, pueden mejorar la eficiencia de rutas metabólicas específicas, aumentando la producción de productos recombinantes (Davis & Patel, 2022). Esta técnica puede ser útil para rediseñar rutas metabólicas en *E. coli* para maximizar la producción de insulina, mejorando la eficiencia del proceso y reduciendo la acumulación de subproductos no deseados.

El gráfico de *strength* destaca la palabra *red* en el contexto de *E. coli*, sugiriendo que las redes metabólicas y reguladoras son componentes críticos en la optimización de la producción de insulina. Este enfoque implica comprender y manipular estas redes para mejorar la eficiencia de la producción de proteínas recombinantes.

Las redes metabólicas en *E. coli* comprenden rutas bioquímicas interconectadas que controlan el flujo de metabolitos dentro de la célula. La manipulación de estas redes puede permitir una mejor canalización de los precursores y la energía necesarios para la síntesis de insulina. (Smith & Jones, *Metabolic engineering for enhanced production of biopharmaceuticals in E. coli.*, 2020) demostraron que la optimización de rutas metabólicas mediante la ingeniería de enzimas clave puede aumentar la disponibilidad de precursores necesarios para la producción de proteínas recombinantes. Por ejemplo, la sobreexpresión de

genes involucrados en la síntesis de precursores de aminoácidos puede aumentar la disponibilidad de estos componentes esenciales, mejorando así la producción de insulina.

Además, la eliminación de rutas competitivas que consumen estos precursores puede redirigir los recursos hacia la producción de insulina. Esta estrategia de ingeniería metabólica ha sido aplicada con éxito en diversos contextos, incluyendo la producción de bioquímicos y biocombustibles (Brown & Lee, 2019). En el caso de la insulina, la identificación y modificación de rutas metabólicas clave pueden ser esenciales para maximizar la eficiencia de producción.

Las redes reguladoras controlan la expresión génica en respuesta a diversos estímulos y condiciones ambientales. La optimización de estas redes puede equilibrar la expresión de genes, minimizando efectos secundarios indeseados y mejorando la estabilidad de la producción de insulina. Por ejemplo, la implementación de sistemas de regulación inducibles puede permitir un control preciso sobre la expresión de insulina, activándola solo cuando las condiciones de cultivo son óptimas (Brown & Lee, 2019). Esto puede reducir la carga metabólica sobre *E. coli* y aumentar la eficiencia de producción.

Un enfoque adicional es la modificación de factores de transcripción y otros elementos reguladores para optimizar la expresión génica. Estudios han mostrado que la ingeniería de factores de transcripción específicos puede mejorar la expresión de genes de interés sin afectar negativamente otras funciones celulares (Garcia & Wang, 2021). Esta estrategia puede ser aplicada para mejorar la expresión de insulina en *E. coli*, asegurando una producción estable y eficiente.

La integración de los resultados de la nube de palabras y el gráfico de strength sugiere una estrategia multifacética para la optimización de la producción de insulina en *E. coli*. Esta estrategia incluye la mejora de la expresión de proteínas, la disrupción dirigida de genes, el diseño de proteínas y la manipulación de redes metabólicas y reguladoras. Cada uno de estos enfoques puede contribuir de manera significativa a aumentar la eficiencia y estabilidad de la producción de insulina.

La mejora de la expresión de proteínas puede lograrse mediante la optimización de elementos de expresión, como promotores y secuencias de codones. La implementación de

sistemas de expresión robustos y bien regulados puede aumentar significativamente la producción de insulina. Por ejemplo, el uso de promotores inducibles permite un control preciso sobre la expresión génica, activándola solo cuando las condiciones son óptimas para la producción (Williams & Tan, 2018). Además, la optimización de la secuencia de codones puede mejorar la eficiencia de traducción, evitando cuellos de botella en la síntesis proteica.

La disrupción dirigida de genes puede eliminar rutas metabólicas competidoras y otros elementos que interfieren con la producción de insulina. Esta estrategia libera recursos celulares que pueden ser redirigidos hacia la síntesis de la proteína recombinante. Por ejemplo, la eliminación de genes responsables de la degradación de proteínas puede aumentar la estabilidad de la insulina recombinante, mejorando su rendimiento (Garcia & Wang, 2021).

El diseño de proteínas es esencial para asegurar que la insulina producida sea estable y funcional en el sistema huésped. La introducción de mutaciones específicas y la adición de etiquetas de purificación pueden mejorar la estabilidad y facilitar la recuperación de la insulina recombinante (Anderson & Gupta, 2017). Estas modificaciones pueden aumentar la eficiencia de producción y reducir los costos de purificación, haciendo el proceso más viable económicamente.

La manipulación de redes metabólicas y reguladoras es crucial para optimizar la producción de insulina en *E. coli*. La optimización de rutas metabólicas puede aumentar la disponibilidad de precursores y energía necesarios para la síntesis de la proteína. Además, la regulación precisa de la expresión génica puede equilibrar la producción de insulina, minimizando efectos secundarios y mejorando la estabilidad del proceso (Brown & Lee, 2019). Estas estrategias pueden ser integradas para crear un sistema de producción robusto y eficiente.

Las metodologías empleadas en la producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* han avanzado considerablemente, incorporando una variedad de enfoques técnicos. Los sistemas de expresión basados en plásmidos y la tecnología de proteínas de fusión han mejorado la solubilidad y purificación de las proteínas, mientras que la expresión periplásmica ha facilitado el correcto plegamiento y reducción de la agregación (Johnson, Lee, & Parker, 2020).

Técnicas de mutagénesis, tanto dirigida como aleatoria, y el barajado de ADN, han permitido la creación de variantes de proteínas con propiedades optimizadas. La introducción de CRISPR-Cas9 ha revolucionado la edición genética, permitiendo una manipulación precisa y eficiente del genoma de *E. coli* (Miller, Wang, & Zhou, 2020). Estas metodologías integradas han maximizado la eficiencia y el rendimiento en la producción de proteínas recombinantes, subrayando la importancia de combinar múltiples enfoques para abordar los desafíos en biotecnología.

CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

- Los métodos de modificación genética de *E. coli* para la producción de insulina, destacan estrategias como la optimización de la expresión génica, la disrupción dirigida de genes y el diseño de proteínas recombinantes, los cuales son factores importantes en la ingeniería genética.
- El análisis estadístico mediante litsearchr y quanteda ha proporcionado una comprensión profunda de las metodologías aplicadas en la modificación genética de *E. coli* para la producción de insulina, destacando la evolución del campo, identificando tendencias clave, y proponiendo recomendaciones para futuras investigaciones y aplicaciones.
- La técnica SIRHEPO, que combina elementos de sistemas de expresión basados en plásmidos, proteínas de fusión, diseño de genes sintéticos, mutagénesis dirigida y aleatoria, manipulación de redes metabólicas mediante CRISPR-Cas9 y recombinación homóloga, representa un enfoque innovador y eficiente para la producción de insulina recombinante en *E. coli*. Esta técnica tiene el potencial de superar los desafíos actuales y proporcionar una producción de insulina más eficiente y estable, beneficiando tanto a la investigación como a la industria farmacéutica.

5.2 Recomendaciones

- Desarrollar protocolos estandarizados para la compilación y organización de información bibliográfica, facilitando el acceso y la consulta de métodos relevantes para futuras investigaciones.
- Realizar análisis estadísticos adicionales para evaluar la eficacia y la reproducibilidad de las metodologías identificadas, utilizando herramientas como meta-análisis y análisis de sensibilidad para validar los resultados obtenidos y detectar posibles sesgos o limitaciones.
- Implementar estudios experimentales para validar la eficacia y la viabilidad de la estrategia propuesta, utilizando modelos computacionales y simulaciones para predecir los resultados antes de llevar a cabo experimentos in vivo, fomentando la colaboración interdisciplinaria para desarrollar enfoques innovadores y multifacéticos.

Bibliografía

- Aboul-Soud, M. A. (2020). cDNA Cloning of a Bovine Insulin-like growth factor-1 from Egyptian Buffalos and Expression of its Recombinant Protein in Escherichia coli. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 72, 523-534. Obtenido de <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/kQQwt5NQW5C6xq4VgKcrkPH/?lang=en#>
- Alvarado Madrigal, M. F., Chavarría Quirós, T., Leiva Montero, B., & Mora Román, J. J. (2019). Producción de proteínas recombinantes a partir de animales transgénicos: Sistemas y aplicaciones. *Revista Tecnología en Marcha*, 32(4), 133-144.
- Alvarado-Madrigal, M. F., Tannia, C.-Q., & Leiva-Montero, B. &.-R. (Diciembre de 2019). Producción de proteínas recombinantes a partir de animales transgénicos: Sistemas y aplicaciones. *Revista Tecnología en Marcha*, 32(4), 133-144. Obtenido de https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0379-39822019000400133&script=sci_arttext
- Anderson, L., & Gupta, R. (2017). Protein design for enhanced stability and functionality in recombinant protein production. *Protein Engineering, Design & Selection*, 30, 123-130.
- Basavaraju, M., & Gunashree, B. (Marzo de 2023). Escherichia coli: An Overview of Main Characteristics. *IntechOpen*. Obtenido de <https://www.intechopen.com/chapters/84764>
- Benoit, K., Watanabe, K., Wang, H., Nulty, P., Obeng, A., Müller, S., & Matsuo, A. (2018). Quanteda: An R Package for the Quantitative Analysis of Textual Data. *J. Open Source Softw*, 3(774).
- Breunig, S. L., Chapman, A. M., LeBon, J., Quijano, J. C., Ranasinghe, M., Rawson, J., & Tirrell, D. A. (2024). 4S-fluorination of ProB29 in insulin lispro slows fibril formation. *Journal of Biological Chemistry*, 300(6). Obtenido de <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85194088200&origin=resultslist&sort=plf-f&src=s&sid=1248f1a840d069d89c39cf44d53577b3&sot=b&sdt=b&s=TITLE-ABS-KEY%28coli+AND+proteins+AND+recombinants+AND+insulin%29&sl=60&sessionSearchId=1248f1a840d069d>

- Brown, K., & Lee, H. (2019). Regulatory network analysis in synthetic biology: Implications for microbial cell factories. *Current Opinion in Microbiology*, 50, 58-65.
- Casas Martínez, Y. D., Fuquen Fúquene, L. T., Ramírez Torres, D. L., & Gómez Rodríguez, A. M. (2022). Avances en biotecnología ambiental: Biorremediación de plásticos. *Revista 13+*, 4(2), 89-114.
- CONAHCYT. (24 de Marzo de 2023). *Las proteínas recombinantes en nuestra vida diaria*. Obtenido de <https://www.ciad.mx/las-proteinas-recombinantes-en-nuestra-vida-diaria/>
- Davis, R., & Patel, K. (2022). Hybrid enzymes in synthetic biology: Applications and advancements. *Enzyme and Microbial Technology*, 147, 109-787.
- Erjavec, M. S. (2023). *Escherichia coli: viejos y nuevos conocimientos*. Londres: Intech Open- BoD—Books on Demand. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=oX2_EAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP12&dq=10.1128/iai.25.2.603-609&ots=Rq07IWzb-e&sig=eA9DOLwsnvpw3Qt0uNMZvUbQ_uA#v=onepage&q=10.1128%2Fiai.25.2.603-609&f=false
- Federation, I. D. (2019). *Atlas de la Diabetes de la FID* (Novena ed.). Suvi Karuranga.
- Fernández Cisneros, I. (2021). *Diseño y optimización de proteínas terapéuticas*. Obtenido de FACULTAD DE MEDICINA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA. TRABAJO DE FIN DE GRADO: <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/23483/FERNANDEZ%20CISNEROS%2c%20ISMAEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- García, M., & Wang, Y. (2021). Targeted gene disruption techniques for metabolic engineering in *E. coli*. *Metabolic Engineering*, 64, 69-80.
- Garcillán-Barcia, M., Pluta, R., Lorenzo-Díaz, F., Bravo, A., & Espinosa, M. (Marzo de 2022). The Facts and Family Secrets of Plasmids That Replicate via the Rolling-Circle Mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev*, 86(1). Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34878299/>
- Gómez Arias, L. Y., Gómez Daza, S., & Núñez Zarantes, V. (2018). Estandarización de protocolos de transformación genética en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* para la generación de una colección de constructos génicos. *Ciencia en Desarrollo*, 9(2), 9-16. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-74882018000200009&lng=en&tlng=es.
- Gómez, F. J., Ríos-Torres, J. M., Cárdenas-Fragoso, J. L., & Tovar-Méndez, V. H. (2021).

Evolución histórica de las moléculas de insulina empleadas en el tratamiento de la diabetes. *Revista Mexicana de Endocrinología, Metabolismo y Nutrición*, 8. Obtenido de https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/95793030/rme_21_8_supl-3_019-028-libre.pdf?1671066043=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DEvolucion_historica_de_las_moleculas_de.pdf&Expires=1717775723&Signature=SowRv188vT~TmmGmC6rtm7IfLZyIbPDdPBqAcRM

González Crespo , A., Hardy Sosa, A., & Sosa Espinosa , A. E. (2018). Método rápido de verificación de mutantes de *Escherichia coli* empleados en ingeniería genética. *VacciMonitor*, 27(2), 45-50.

González Mujica, F. (2017). Insulina. Estructura, síntesis, secreción, depuración y degradación. *Vitae: Academia Biomédica Digital*, 71(1), 1. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6431287>

González, A., & Fillat, M. (2018). Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Rev Educ Bioquímica*, 37(1), 14-27. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=78883>

González, A., & Fillat, M. F. (2018). Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista de Educación Bioquímica*, 37(1), 14-27.

Grames, E. M., Stillman, A. N., Tingley, M. W., & Elphick, C. S. (2019). An Automated Approach to Identifying Search Terms for Systematic Reviews Using Keyword Co-Occurrence Networks. *Methods Ecol. Evol*, 10, 1645–1654.

Hantke, K. (Enero de 2020). Compilation of *Escherichia coli* K-12 outer membrane phage receptors - their function and some historical remarks. *FEMS Microbiology Letters*, 1, 367. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32009155/>

Hernández Alcántara , G., García Torres, I., Alba Martínez, Z., & Ramírez Silva, L. (2021). Expresión de proteínas recombinantes en un sistema heterólogo. *Mensaje Bioquímico*, 45, 109-120.

Hernández-Alcántara, G., García-Torres, I., & Alba-Martínez, Z. (2021). *Expresión de proteínas recombinantes en un sistema heterólogo*. Obtenido de UNAM, Facultad de Medicina, Taller de Actualización Bioquímica: <http://bq.facmed.unam.mx/tab/wp-content/uploads/2021/07/13-Hernandez-Alcantara.pdf>

Hiriart-Urdanivia, M., Sánchez-Soto, C., Velasco, M., Sabido-Barrera, J., & Ortiz-Huidobro, R. (2019). El receptor soluble de insulina y el síndrome metabólico. *Gaceta Medica de Mexico*, 155, 541-545. Obtenido de

https://www.gacetamedicademexico.com/frame_eng.php?id=353

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura . (2020). *Bioeconomía: Potencial y retos para su aprovechamiento en América Latina y el Caribe Manual de Capacitación*. Costa Rica: Marvin Blanco .

Jesser, K. J., & Levy, K. (Octubre de 2023). Updates on defining and detecting diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. *Curr Opin Infect Dis.*, 33(5), 372-380. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7819864/>

Johnson, L., Lee, S., & Parker, M. (2020). Modern techniques in *E. coli* genetic engineering for insulin production. *Biotechnology Advances*, 39, 107548.

Katz, L., Chen, Y., Gonzalez, R., Peterson, T. C., Zhao, H., & Baltz, R. H. (Julio de 2018). Avances y aplicaciones de la biología sintética en la industria biotecnológica: una perspectiva. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 45(7), 449–461. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29915997/>

Kot, B. (2019). Antibiotic Resistance Among Uropathogenic *Escherichia coli*. *Polish Journal of Microbiology*, 68(4), 403-415. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7260639/>

Lee, R. (Diciembre de 2020). Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*, 4, 8. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33385193/>

Leyva, M., Rodríguez, M., Rodríguez, D., & Niño, E. (2020). Mecanismos moleculares de la secreción de insulina. *Correo científico médico*, 24(2), 782-798. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=98057>

Liu, B., Furevi, A., Perepelov, A., Guo, X., Cao, H., Wang, Q., . . . Widmalm, G. (2020). Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(6), 655–683. Obtenido de <https://academic.oup.com/femsre/article/44/6/655/5645236?login=false>

Liu, B., Lee, C., Bong, C., & Wang, A. (Enero de 2024). Investigating *Escherichia coli* habitat transition from sediments to water in tropical urban lakes. *PeerJ*, 12, 11. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38223759/>

Martinson, J., & Walk, S. (Septiembre de 2020). *Escherichia coli* Residency in the Gut of Healthy Human Adults. *EcoSal Plus. Author manuscript*, 9(1). Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7523338/>

Miller, J., Wang, X., & Zhou, Y. (2020). Integrating CRISPR-Cas9 in metabolic pathway optimization. *Metabolic Engineering*, 57, 13-21.

Molina, N., Oderiz, S., López, M., Basualdo, J., & Sparo, M. (Enero de 2024). Molecular

- characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from an outpatient pediatric population with diarrhea attended in two hospitals from Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol.*, 56(1), 8-15. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37500356/>
- Organización Panamericana de la Salud, & Organización Mundial de la Salud. (12 de Noviembre de 2021). *OPS*. Obtenido de <https://www.paho.org/es/noticias/12-11-2021-nuevo-informe-oms-senala-obstaculos-para-disponibilidad-insulina-sugiere>
- Ortuño Fajardo, M. P., Chacón Halabi, J. R., Flores Espinoza, M. P., & Aguilar Bravo, R. (2021). Biología sintética en la ingenierización de rutas metabólicas de microorganismos para la obtención de compuestos de interés para la industria alimentaria. *Tecnología en Marcha*, 34(1), 69-79. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7836866>
- Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., & Alonso-Fernández, S. (2021). Declaración PRISMA 2020: una guía actualizada para la publicación de revisiones sistemáticas. *Revista española de cardiología*, 74(9), 790-799. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300893221002748>
- Pakbin, B., Brück, W., & Rossen, J. (Septiembre de 2021). Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 22. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34576083/>
- Pérez Rodríguez, C. M. (2019). *Relación clonal, diseminación y esparcimiento de aislados de Escherichia coli antibiótico resistentes provenientes de aguas residuales, aguas superficiales e infantes < 1 año del municipio de León.*". Obtenido de Repositorio Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Tesis para optar al título de Máster en Microbiología Médica: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/7608/1/244191.pdf>
- Rauda Ceja, J. A., Perez, N. O., Valdez Cruz, N. A., & Trujillo Roldán, M. A. (2020). Factores abióticos en la producción de proteínas recombinantes y su formación en cuerpos de inclusión en *Escherichia coli*. *BioTecnología*, 24(1), 56-75.
- Ríos-Muñiz, D., Cerna Cortés, J. F., Morán García, N., Meza Segura, M., & Estrada García, T. (2019). *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteroagregativa: prevalencia, patogénesis y modelos murinos. *SCIELO*, 155, 410-416. Obtenido de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0016-38132019000400410&script=sci_arttext

- Sandoval Benalcázar, D. C., Socasi Dioses, E. G., Vera Navarrete, E. M., & Poquiza Pacheco, D. J. (2023). El uso de insulina en pacientes con diabetes tipo II. *RECIAMUC*, 7(2), 124-133.
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., & Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogens*, 11(10). Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6383261/>
- Schumann, A., Cohn, A., Gaballa, A., & Wiedmann, M. (2023). *Escherichia coli* B-Strains Are Intrinsically Resistant to Colistin and Not Suitable for Characterization and Identification of *mcr* Genes. *Microbiol Spectr*, 11, 15. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37199645/>
- Siew, Y., & Zhang, W. (2021). Downstream processing of recombinant human insulin and its analogues production from *E. coli* inclusion bodies. *Bioresour Bioprocess*, 8(1). Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8313369/>
- Smith, J., & Jones, A. (2020). Metabolic engineering for enhanced production of biopharmaceuticals in *E. coli*. *Biotechnology Advances*, 38, 107-116.
- Smith, J., Brown, T., & Wilson, K. (2018). Advances in recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 278, 1-10.
- Su, Y., Ma, G., Zheng, Y., Qin, J., Li, X., Ge, Q., . . . Liu, B. (2023). Neonatal Meningitis-Causing *Escherichia coli* Induces Microglia Activation which Acts as a Double-Edged Sword in Bacterial Meningitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12). Obtenido de <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/12/9915>
- Team, R. C. (2020). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Team, R. S. (2019). *RStudio: Integrated Development for R*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Obtenido de RStudio: Integrated Development for R; R Foundation for Statistical Computing.
- Vanegas Torres, L. (2022). *Estandarización de métodos ligados a la producción de proteínas recombinantes para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas*. Obtenido de Universidad EIA: <https://repository.eia.edu.co/server/api/core/bitstreams/0cffe8f7-72f2-4ada-91c7-21f2f8fa071b/content>
- Wang, J. L., Ma, W., & Wang, X. (2021). Información sobre la estructura de la membrana externa de *Escherichia coli* como objetivo para diseñar fábricas de células

microbianas. *Microb Cell Fact*, 20(1), 73.

Williams, P., & Tan, C. (2018). Codon optimization and expression control for recombinant protein production in *E. coli*. . *Journal of Biotechnology*, 267, 1-10.

Zhang, Y., Tan, P., Zhao, Y., & Ma, X. (Enero de 2022). Enterotoxigenic *Escherichia coli*: intestinal pathogenesis mechanisms and colonization resistance by gut microbiota. *Gut Microbes*, 14(1). Obtenido de

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19490976.2022.2055943>

Zhou, Y., Zhou, Z., Zheng, L., Gong, Z., Li, Y., Jin, Y., . . . Chi, M. (Enero de 2023). Urinary Tract Infections Caused by Uropathogenic *Escherichia coli*: Mechanisms of Infection and Treatment Options. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(13).

Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10341809/>

Zieliński, M., Romanik-Chruścielewska, A., Mikiewicz, D., Łukasiewicz, N., Sokołowska, I., Antosik, J., . . . Płucienniczak, A. (2019). Expression and purification of recombinant human insulin from *E. coli* 20 strain. *Protein Expression and Purification*, 157, 63-69.

Obtenido de

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592818305862?via%3Dihub>

CAPÍTULO VI: ANEXOS

An official website of the United States government [View this page online](#)

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information [Log in](#)

PubMed ("Plasmid-Based Expression Systems") AND ("E. coli") [Search](#)

[Advanced](#) [Create alert](#) [Create RSS](#) [User Guide](#)

[Save](#) [Email](#) [Send to](#) Sort by: **Best match** [Display options](#)

MY NCBI FILTERS [+](#) 5 results [Page 1 of 1](#)

RESULTS BY YEAR

TEXT AVAILABILITY

Abstract

Filters applied: Free full text. [Clear all](#)

The Effects of Lactose Induction on a Plasmid-Free **E. coli** T7 Expression System.
1 Hanzjeli J, Kutscha R, Gesson JD, Rainach D, Spadiut O.
Cite: Bioengineering (Basel). 2020 Jun 5;7(1):8. doi: 10.3390/bioengineering7010008.
PMID: 31935881 [Free PMC article](#).

Share: Recombinant production of pharmaceutical proteins like antigen binding fragments (Fab) in the commonly-used production host Escherichia coli presents several challenges. The predominantly-used **plasmid-based expression systems** exhibit the drawback of e...

An official website of the United States government [View this page online](#)

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information [Log in](#)

PubMed ("Fusion Protein Expression") AND ("insulin") [Search](#)

[Advanced](#) [Create alert](#) [Create RSS](#) [User Guide](#)

[Save](#) [Email](#) [Send to](#) Sort by: **Best match** [Display options](#)

MY NCBI FILTERS [+](#) 3 results [Page 1 of 1](#)

RESULTS BY YEAR

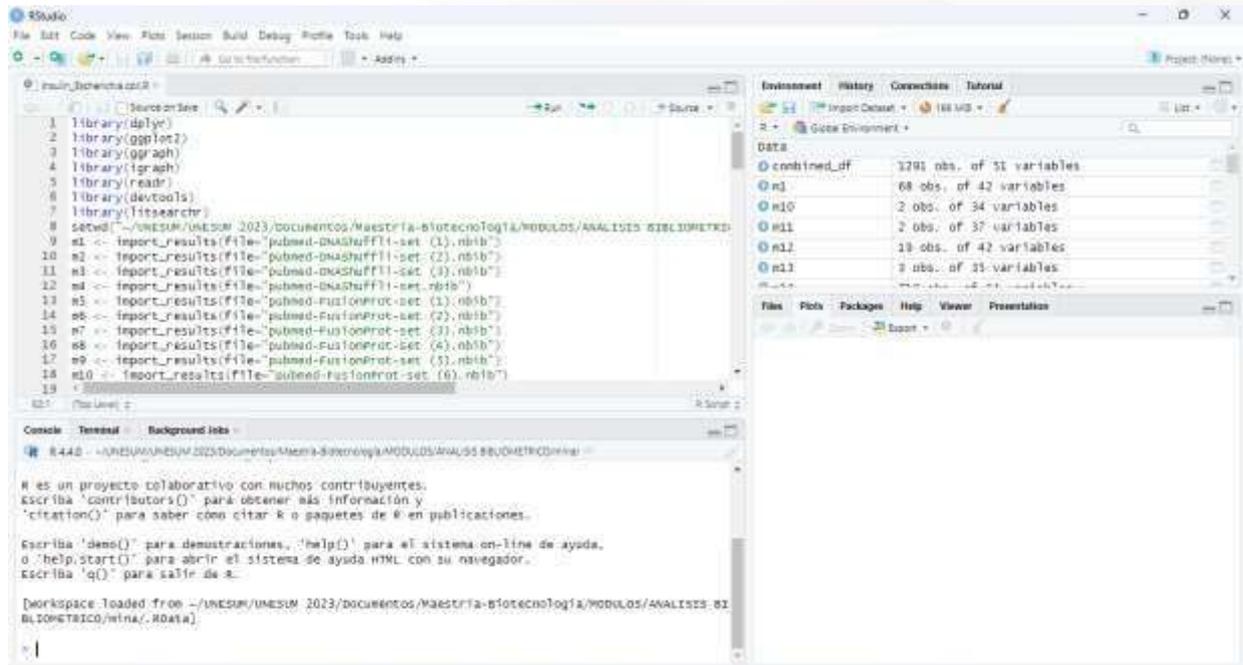
TEXT AVAILABILITY

Abstract

Filters applied: Free full text. [Clear all](#)

CRM1 Inhibition Promotes Cytotoxicity in Ewing Sarcoma Cells by Repressing EWS-FLI1-Dependent IGF-1 Signaling.
1 Sun H, Lin DC, Cao Q, Guo X, Marjon H, Zhao Z, Gery S, Xu L, Yang H, Pang B, Lee VK, Lim HI, Doan N, Said JW, Chu P, Mayakonda A, Thomas T, Förscher C, Baoguo E, Shachem S, Rajalingam R, Koefler HP.
Cite: Cancer Res. 2016 May 15;76(26):7497-507. doi: 10.1158/0008-5472.CCR-15-1572. Epub 2016 Mar 8.
PMID: 26956669 [Free article](#).

Share: In this study, we demonstrate that CRM1 is also highly expressed in EWS. shRNA-mediated or pharmacologic inhibition of CRM1 in EWS cells dramatically decreased cell growth while inducing



UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

¡Evolución académica!

@UNEMIEcuador

