

# Sistema de expresión recombinante de la proteína de fase aguda “Pig-MAP” para su uso como biomarcador de estrés

\*Carlos A. Castro Roca,<sup>1,3</sup> Yasmin G. De Loera Ortega,<sup>2</sup> José Luis Cerriteño Sánchez,<sup>3</sup> Julieta S. Cuevas Romero<sup>3</sup> y Adelfa del C. García Contreras<sup>4</sup>

**Resumen.** Los cerdos dentro de producciones tecnificadas hacen frente a condiciones que pueden generar estrés, relacionado con la disminución de bienestar animal. El uso de biomarcadores; moléculas que sintetizan y liberan los animales en condiciones específicas, nos pueden ayudar en la medición de parámetros para la evaluación del bienestar animal. Las proteínas de fase aguda son proteínas plasmáticas secretadas en el hígado como respuesta de fase aguda, debido a infecciones, inflamación, daño tisular o estrés. PigMAP es una glicoproteína de fase aguda, secretada por los cerdos. Por ello se seleccionó y clonó la porción N-terminal correspondiente a esta proteína en el vector pJET1.2/blunt y se usó para amplificar y subclonar al vector de expresión pETSUMO (pETSUMO-Nterminal), finalmente, el plásmido recombinante se corroboró mediante PCR y prueba de secuenciación. Por lo tanto, se obtuvo por primera vez un sistema de expresión para la proteína recombinante PigMAP con potencial para desarrollar un sistema de evaluación del bienestar animal en cerdos.

**Palabras clave:** Biomarcadores; Estrés; Bienestar animal; Pig-MAP; Producción porcina.

<sup>1</sup> Maestría en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, CDMX, México.

<sup>2</sup> Licenciatura en MVZ. Departamento de Ciencias Pecuarias, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Edo. de México.

<sup>3</sup> Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP, CDMX, México.

<sup>4</sup> Laboratorio de imagenología Zootécnica y Gestión Ambiental. Departamento Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, CDMX, México.

\* Autor de correspondencia: e-mail: cerriteno.jose@inifap.gob.mx

**Abstract.** Pigs in technical productions face conditions that can generate stress, which is related to a decrease in animal welfare. The use of biomarkers, molecules that are synthesized and released by animals under specific conditions, can help in the measurement of parameters for the evaluation of animal welfare. Acute phase proteins are plasma proteins secreted in the liver as an acute phase response to infections, inflammation, tissue damage, or stress. PigMAP is an acute-phase glycoprotein that is secreted by pigs. Therefore, the N-terminal portion corresponding to this protein was selected and cloned into the pJET1.2/blunt vector and used to amplify and subclone the pETSUMO expression vector (pETSUMO-N-terminal). The recombinant plasmid was confirmed by PCR. and sequencing tests. Therefore, an expression system for the PigMAP recombinant protein was obtained for the first time, with the potential to develop an animal welfare assessment system for pigs.

**Key words:** Biomarkers; Stress; Animal Welfare; PigMAP; Swine Production.

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial se ha generado una gran cantidad de información y metodologías diferentes para cuantificar y evaluar el bienestar de los animales, siguiendo métodos de observación directa para evaluar el comportamiento, utilizando sistemas o protocolos de calificación como herramientas de evaluación, sin embargo, estos indicadores (Cuadro 1) sólo permiten evaluar las condiciones de bienestar animal de forma indirecta durante los procesos de producción (Damian y Ungerfeld, 2012; Muñoz, 2014).

Aunado a ello, existe la posibilidad de realizar evaluaciones de indicadores sanguíneos (Cuadro 1), los cuales se sabe que están relacionados con la presencia de estrés y, por lo tanto, reflejan una alteración en el bienestar animal, sin embargo, se consideran invasivos para el animal al momento de tomar la muestra (Muñoz, 2014; Giergel *et al.*, 2021).

**Cuadro 1. Indicadores comunes de evaluación del bienestar animal para determinar el desempeño del sistema de producción**

	Indicador de comportamiento	Indicadores sanguíneos
1	Condición corporal	Hormonas: ✓ Adrenocorticotropa (ACTH)- Concentración de cortisol ✓ Catecolaminas ✓ Prolactina
2	Estado de salud	Bioquímica: ✓ Glucosa – incremento de la glicemia ✓ Lactato
3	Presentación de lesiones	Hematológicas: ✓ Leucocitos ✓ Eritrocitos ✓ Monocitos ✓ Linfocitos ✓ Neutrófilos  Proteínas de fase aguda: ✓ Haptoglobina ✓ Proteína C-Reactiva ✓ Proteína amiloide A sérica ✓ Pig-MAP (ITIH4 pig)
4	Diámetro de la zona de fuga	Proteínas de fase aguda: ✓ Haptoglobina ✓ Proteína C-Reactiva ✓ Pig-MAP (ITIH4 pig)
5	Tendencia agresiva, estereotipias	✓ Catecolaminas
6	Comportamiento social	Hormonas: ✓ Catecolaminas ✓ Adrenocorticotropa (ACTH)- Concentración de cortisol ✓ Cromogranina A

Chen *et al.*, 2003; Tadich *et al.*, 2003; Piñeiro *et al.*, 2009; Tadich *et al.*, 2009; Muñoz, 2014; Hernández, 2016; Martínez-Miró *et al.*, 2016; Heegaard *et al.*, 2011; Hennig-Pauka *et al.*, 2019.

Sin embargo, la creación de herramientas de diagnóstico que permitan cuantificar el efecto fisiopatológico generado como respuesta a un estímulo ambiental sobre el individuo, y que sobrepasa su sistema homeostático y con ello, disminuye su eficacia biológica, es fundamental. Estos elementos permitirían de manera predictiva y diagnóstica valorar una alteración mediante la expresión y cuantificación de algunos elementos conocidos también como biomarcadores, definiendo como marcador biológico o biomarcador a una molécula biológica, que se encuentra en la sangre, incluidos otros fluidos o tejidos, que se expresa como un signo de un proceso normal o anormal, o de una condición o enfermedad; de los cuales su presencia está considerada como una respuesta a intervenciones terapéuticas, toxicológicos, de susceptibilidad o riesgo, diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad o condición que puede representar una valoración negativa del bienestar (Muñoz, 2014; Martínez-Miro *et al.*, 2016; Myers *et al.*, 2017; O'Reilly *et al.*, 2018).

Partiendo de ello, una oportunidad práctica y con buenos resultados es la utilización de biomarcadores que permiten identificar aquellos metabolitos que se liberan en el organismo y que repercutirán en la salud, y por ende en la alteración del bienestar animal. Algunos son las llamadas Proteínas de Fase Aguda (PFA), que corresponden a un grupo de proteínas plasmáticas que modifican su concentración en respuesta a procesos de inflamación causados por lesiones tisulares, infecciones, trastornos inmunológicos o estrés. Por lo que, pueden tener una función importante, no solo en el área clínica, sino también en la evaluación de las buenas prácticas de producción animal (Tóthová *et al.*, 2019; Gulhar *et al.*, 2021). La utilización de PFA para la evaluación del bienestar animal durante diferentes eventos dentro del ciclo de vida de la producción porcina puede dar información puntual de los momentos específicos en que estas son producidas y con ello, buscar la mejora en aquellos manejos que están generando su presentación (Martínez-Miró *et al.*, 2016; Gulhar *et al.*, 2021). Las principales PFA positivas reportadas en cerdos son la Haptoglobina, Amiloide A sérico, proteína C reactiva y la Pig Major Phase Protein (Pig-MAP), proteínas que han mostrado su incremento en modelos experimentales relacionados con estrés físico o psicológico, trauma quirúrgico o infecciones bacterianas o virales (Piñeiro *et al.*, 2009; Heegaard *et al.*, 2011; Cray, 2012; Hennig-Pauka *et al.*, 2019).

A lo largo de décadas de investigación sobre las técnicas de recombinación genética se han logrado una serie de avances muy relevantes que en la mayoría de los casos resuelven problemas muy específicos. Por lo que, la generación de herramientas para realizar diagnósticos a nivel molecular, y detectar la presencia de biomarcadores, los cuales identifican la vulnerabilidad a ciertas enfermedades o problemas, es de gran valor dependiendo de las necesidades del mercado o los productores, abarcando distintas especies como porcinos, ovinos, bovinos, abejas, peces, pollos, entre otros. Actualmente

en el mercado internacional hay gran variedad de proteínas recombinantes (PR) para un amplio abanico de aplicaciones, lo que ha llegado a constituir toda una revolución en el mercado biotecnológico y a la vez ha impulsado la investigación en este campo (Amaro, 2014; Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004; Sánchez y Rosales, 2017).

La producción de proteínas recombinantes (PR) se ha utilizado cada vez más en la investigación para obtener proteínas específicas para estudios biofísicos y estructurales, con fines diagnósticos y terapéuticos, así como para aplicaciones emergentes, desarrollando nuevas moléculas recombinantes con propiedades farmacocinéticas mejoradas y descubriendo nuevas aplicaciones clínicas debido a la alta afinidad y especificidad que pueden generar (Oliveira y Domingues, 2018). Por lo que, el objetivo de esta investigación fue la obtención de un sistema de expresión recombinante de Pig-MAP, para su implementación como biomarcador de diagnóstico enfocado en el bienestar animal aplicado a cerdos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de virología II perteneciente al Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) sede palo alto del INIFAP. Se procedió a la estimación de algunas características bioquímicas importantes de la proteína de fase aguda PigMAP, para ello se realizó la predicción de la distribución de epítomos, la estimación del peso molecular y de su estructura terciaria, correspondientes a la proteína Pig-MAP (número de acceso: 7VFR-B5X3016), mediante el uso de diferentes paquetes bioinformáticos disponibles como el software PyMol y DNASTar, (DNASTAR) y sus respectivos métodos de validación para seleccionar la región más adecuada para producir de manera recombinante la proteína de interés.

Se determinó la hidrofobicidad utilizando el algoritmo de Kyte-Doolittle, para el caso de las regiones antigénicas se predijeron mediante el algoritmo de Jameson-Wolf, la probabilidad de superficie se determinó implementando el algoritmo de Emini, mientras que las regiones transmembranales se corroboraron con el servidor TMHMM Server v. 2.0.

Posteriormente se seleccionaron dos regiones adecuadas para su producción y se diseñaron iniciadores que hibridan en los genes que codifican para los dos fragmentos ubicados en el N- y C- terminal de la proteína Pig-MAP. Se procedió a la elección de dichas regiones, ya que contienen los epítomos más inmunogénicos y, por lo tanto,

los mejores candidatos para la clonación y expresión de la proteína de interés para su producción de manera recombinante. Dichos fragmentos fueron amplificados a partir de cDNA obtenido de un bazo de cerdo clínicamente sano, este cDNA fue clonado en un vector comercial de selección positiva o vector de resguardo pJET1.2/blunt (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific) para su mantenimiento en el laboratorio. La porción correspondiente al N-terminal fue subclonada en el vector de expresión pET SUMO (Champion™ pET SUMO expression vector, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) para la expresión de la proteína. A continuación, se realizó la transformación en células competentes de *E. coli* Top 10 (*E. Coli One Shot®* TOP10, Invitrogen Life Sciences) para la obtención del fragmento de interés ligado al vector de expresión para su caracterización por PCR y posterior secuenciación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un punto importante a considerar en el diseño de biomarcadores veterinarios es la relación costo-beneficio y el hecho de poder garantizar que esta sea compatible con métodos de detección para un buen análisis clínico. A día de hoy, la biotecnología ofrece grandes oportunidades para solucionar este tipo de problemas tecnológicos con un alto impacto, un ejemplo de ello, es la utilización de la biología molecular, la cual nos brinda la posibilidad de diseñar las llamadas proteínas recombinantes mediante el uso de *Escherichia coli* (*E. coli*), microorganismo que nos permite la producción de estas proteínas (más de 30.000 proteínas expresadas y purificadas con éxito), con fines diagnósticos, terapéuticos o vacunales (Kielkopf *et al.*, 2021).

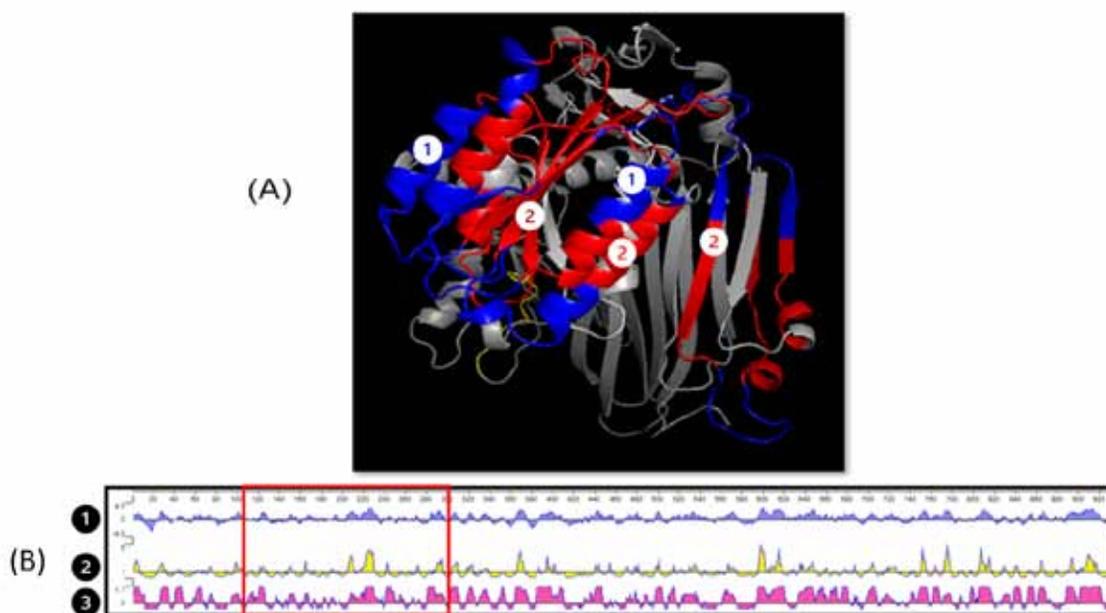
Para poder generar la síntesis de una proteína recombinante, es necesario considerar las propiedades químicas y biológicas (Blanco *et al.*, 2010), por ello, el primer paso de esta investigación fue identificar el peso molecular y las características bioquímicas básicas de la proteína de interés, en este caso de la Pig-MAP. Los primeros resultados obtenidos nos permitieron estimar el peso molecular, el cual fue de 100.36 kDa con 907 residuos de aminoácidos, de acuerdo con la literatura, el peso molecular reportado para Pig-MAP se encuentra en un rango de 26, 43-55, 115-120 kDa respectivamente (Lampreave *et al.*, 1994; González-Ramón *et al.*, 1995; Piñeiro *et al.*, 2004; Heegaard *et al.*, 2013).

Posteriormente, se observó una región hidrofóbica en el extremo N-terminal de la proteína, siendo el resto de la proteína altamente hidrofílica. Esta característica de hidrofobicidad puede ocasionar problemas en la purificación y solubilización de la proteína,

además de que no contiene epítomos de interés, por ello se descartó para expresión, además se puede considerar con un carácter variable, el cual puede estar influenciado por características ambientales como el origen de la cepa aislada (Blanco *et al.*, 2010).

Adicionalmente, se pudo determinar en la proteína Pig-MAP la presencia de dos porciones ubicadas en el N-terminal y C-terminal, las cuales expresan el mayor índice de antigenicidad, de probabilidad de superficie, sin regiones hidrofóbicas y más de 10 epítomos (Figura 1).

Figura 1. Predicción de las principales características estructurales de la proteína Pig-MAP



[A] Predicción de la estructura terciaria de la proteína Pig-MAP (ITIH4 Pig).

[A-1] Estructura que corresponde a un fragmento del N-Terminal, seleccionado en este trabajo.

[A-2] Las zonas de los principales epítomos presentes, seleccionados como mejores candidatos a expresión.

[B] Algoritmos de predicción de: Hidrofobicidad a partir del algoritmo Kyte-Doolittle.

[B-1] Probabilidad de superficie de Emini.

[B-2] Índice de antigenicidad de Jameson-Wolf.

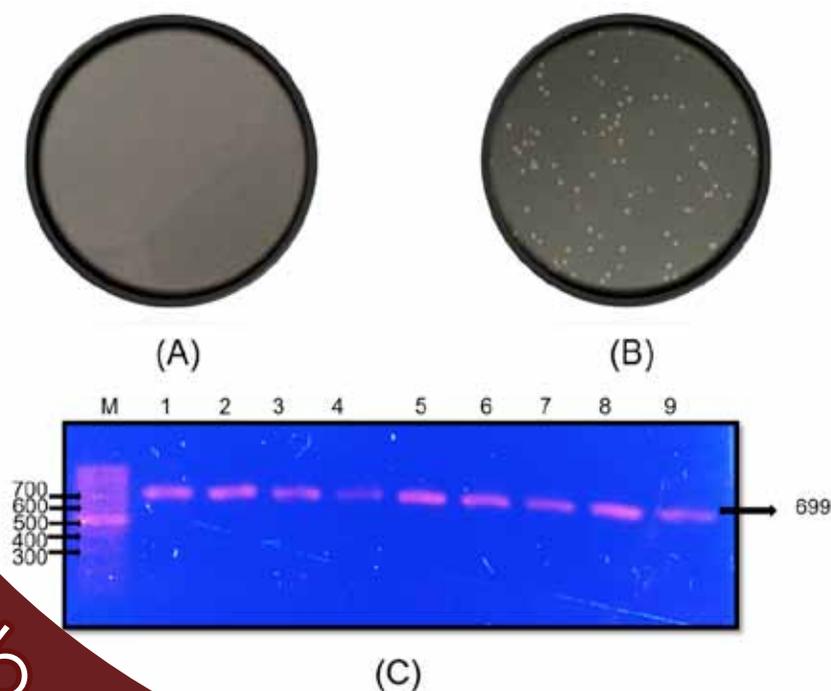
[B-3] En recuadro rojo se muestra la ubicación de la porción N-terminal seleccionada en este trabajo.

Haciendo uso de la técnica de PCR, se logró la amplificación de dos importantes regiones (correspondientes a 699 y 846 pb), adecuadas para el desarrollo de un sistema de expresión recombinante utilizando *E. coli*, debido a que esta presenta un rápido crecimiento y un alto rendimiento, así como bajos costos de producción, en comparación con otros posibles huéspedes, y mejora el rendimiento (Cardoso *et al.*, 2020). Un sistema de expresión lo conforma un organismo hospedero y un vector de expresión o fragmentos de DNA que posee los elementos génicos necesarios para elaborar procesos de transcripción y traducción en dicho organismo hospedero (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004).

Los avances en biotecnología permiten mejorar ampliamente la expresión de proteínas recombinantes utilizando *E. coli*, incluido el desarrollo de promotores y el uso de etiquetas de proteínas o dominios de fusión de proteínas removibles o para ayudar a optimizar su pureza, homogeneidad y solubilidad (Bugli *et al.*, 2014; Oliveira y Domingues, 2017).

Como parte de los elementos identificados durante esta investigación, el producto de PCR proveniente de la región seleccionada en el N-terminal, fue exitosamente ligado en el vector de expresión pETSUMO. Posteriormente se realizó la transformación con el producto de la ligación en células competentes TOP10 para su caracterización (Figura 2). Este sistema de expresión pETSUMO en conjunto con la proteína de fusión SUMO, mejora la solubilidad y protege la proteína expresada de la degradación proteolítica lo cual permite una purificación y detección más fácil de la proteína, que en conjunto con las características de *E. coli* garantizan una clonación rápida y eficiente, elementos que son componentes principales en la producción de proteínas recombinantes (Tan *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022).

Figura 2. Transformación de células competentes *E. coli* TOP 10 con el vector de expresión pETSUMO-NTerminal



[A] Control negativo de crecimiento de la prueba de transformación.

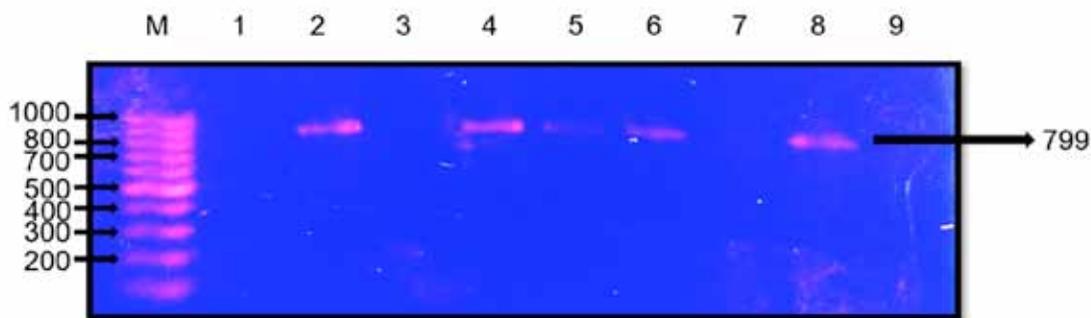
[B] Colonias transformadas con el vector de expresión pETSUMO-NTerminal; crecidas en medio LB+Kanamicina. [C] Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio de la prueba PCR punto final; cargado con los productos de la PCR a partir de plásmidos extraídos de colonias que fueron positivas a crecimiento en placas con antibiótico.

(M) Marcador de peso molecular.

(1-9) Diferentes plásmidos analizados que presentaron el inserto de interés de 699 pb provenientes del vector pETSUMO-NTerminal.

Posteriormente, se determinó, mediante PCR punto final, la correcta orientación del fragmento de interés con respecto del vector de expresión pETSUMO, esto se desarrolla en una prueba de PCR punto final, usando el iniciador delantero diseñado para la amplificación del gen N-terminal de Pig-MAP, así como el oligo reverso T7, que hibrida en una parte de la región terminadora del vector pETSUMO, esperando con ello visualizar un producto de aproximadamente 799 pb, lo cual se puede observar en la Figura 3.

Figura 3. PCR punto final para determinar la correcta orientación de los insertos de interés respecto al vector de expresión pETSUMO



Fragmento N-Terminal en sentido (carriles 2, 4, 5, 6, 8).

(M) Marcador de peso molecular.

(1-9) Plásmidos evaluados.

Lo anterior, nos indica que el inserto N-terminal de Pig-MAP quedó en fase con el vector de expresión, característica esencial para producir la proteína de interés. Finalmente, esto nos permite seleccionar los plásmidos positivos para su subsecuente transformación en la cepa BL21(DE3) que es una cepa de expresión utilizada para la inducción por medio de análogos de la lactosa como el isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) para inducir la expresión de la proteína recombinante.

Estos sistemas de expresión se caracterizan por su capacidad para mejorar la producción de proteínas, mejorando el plegamiento y solubilidad para facilitar su purificación y detección (Tan *et al.*, 2020). Considerando al sistema de expresión pETSUMO como componente de fusión que facilita la expresión y purificación de la proteína re-

combinante en *E. coli* (Bugli *et al.*, 2014; Peroutka III *et al.*, 2011). Los resultados nos indican que se obtuvo por primera vez un sistema de expresión recombinante para la proteína Pig-MAP que contiene todas las características necesarias para expresarse en *E. coli*, lo cual, nos permiten considerar el uso de esta proteína para continuar con la subsecuente expresión y caracterización más específica de la proteína y con ello más vías de investigación relacionadas con sus características bioquímicas, estructurales y para poder desarrollar una herramienta de alto valor diagnóstico en la producción de animales de granja como indicador de alteraciones.

## CONCLUSIONES

Mediante esta investigación por primera vez, se logra la obtención de un sistema de expresión recombinante para la proteína de fase aguda Pig-MAP, que contiene todos los elementos necesarios para la producción de la proteína de manera recombinante, como son la elección de la cepa, el vector de expresión, el cultivo y las estrategias de purificación más apropiadas para su correcta producción en bacterias.

Dado que el bienestar animal hoy en día está vinculado a la certificación de buenas prácticas de producción se requiere estandarizar metodologías o herramientas que permitan mejor la evaluación de dicho bienestar en las prácticas de producción ganaderas. En el mercado europeo ya existen algunos desarrollos para uso en veterinaria que implementan la utilización de proteínas de fase aguda, sin embargo, los tiempos de envío, las dificultades que conlleva su importación, las necesidades de manejo y conservación en refrigeración, así como los costos derivados, pone en desventaja a México para obtener estas herramientas de manera comercial. Motivo por el cual, esta investigación presenta un potencial importante en el contexto de la ciencia aplicada directamente a la evaluación del bienestar animal enfocado a cerdos, para poder generar una herramienta de evaluación y diagnóstico con una buena relación costo-beneficio, en el manejo de todo su ciclo de vida, lo cual conllevaría a una repercusión económica y social importante, para definir aquellos procesos que comprometan el bienestar y buen estado de salud de los animales.

## AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio LABIMA-GA, UAM-X, en especial al Laboratorio de Epizootiología CE-NID-SAI del INIFAP y al Proyecto SEP-CONACYT 288942, por el apoyo y facilidades para el desarrollo de esta investigación. CVU: 1143807

## BIBLIOGRAFÍA

- Amaro M. 2014. Retos y oportunidades para el desarrollo de la biotecnología agroalimentaria en México. *Revista Innovación y Competitividad de la Asociación Mexicana de Directivos de la Investigación Aplicada y el Desarrollo Tecnológico AC*.
- Betancourt L. 2008. La Zootecnia, su quehacer en el pasado, presente y retos para el futuro. *Revista de la Universidad de La Salle*, 2008(45), 112-116.
- Blanco M., Sacristán B., Lucio L., Blanco J., Pérez G. C., Gómez G. A. 2010. La hidrofobicidad de la superficie celular como indicador de otros factores de virulencia en *Candida albicans*. *Revista iberoamericana de micología*, 27(4), 195-199.
- Bugli F., Caprettini V., Cacaci M., Martini C., Sterbini F., Torelli R., Della L. S., Papi M., Palmieri V., Giardina B., Posteraro B., Sanguinetti M., Arcovito A. 2014. Synthesis and characterization of different immunogenic viral nanoconstructs from rotavirus VP6 inner capsid protein. *International journal of nanomedicine*, 9, 2727.
- Cardoso V. M., Campani G., Santos M. P., Silva G. G., Pires M. C., Gonçalves V. M., Zangirolami T. C. 2020. Cost analysis based on bioreactor cultivation conditions: Production of a soluble recombinant protein using *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Biotechnology reports*, 26, e00441.
- Chen H., Lin J., Fung H., Ho L., Yang P., Lee W., Lee Y., Chu R. 2003. Serum acute phase proteins and swine health status. *Canadian journal of veterinary research, Revue canadienne de recherche veterinaire*, 67(4), 283-290.
- Čobanović N., Stanković S. D., Dimitrijević M., Suvajdžić B., Grković N., Vasilev D., Karabasil N. 2020. Identifying Physiological Stress Biomarkers for Prediction of Pork Quality Variation. *Animals*, 10(4), 614. doi:10.3390/ani1004061
- Cray C. (2012). Acute phase proteins in animals. *Progress in molecular biology and translational science*, 105, 113-150.
- Damián J., Ungerfeld R. 2012. Indicadores de bienestar animal en especies productivas: una revisión crítica. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. Universidad de la República, Uruguay. Pp. 103-113.

- Giergel M., Olejnik M., Jabłoński A., Posyniak A. 2021. *The markers of stress in swine oral fluid*, J Vet Res 65, 487-495, 2021. DOI:10.2478/jvetres-2021-0065
- González R. N., Sarsa J. A., Pin M., Escartin A. 1995. *The major acute phase serum protein in pigs is homologous to human plasma kallikrein sensitive PK-120*. Febs Letters, 371(3), 227-230.
- Guerrero M., Cab B. E., Galán W. L., Viader S. J. 2004. Biotecnología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura. *Avances en nutrición Acuícola. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. Hermosillo, Sonora. México, 245-258.
- Gulhar R., Ashraf M., Jialal I. 2021. Physiology, Acute Phase Reactants. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519570>
- Heegaard P. M., Stockmarr A., Piñeiro M., Carpintero R., Lampreave F., Campbell F. M., Eckersall P. D., Toussaint M., Gruys E., Sorensen N. S. (2011). Optimal combinations of acute phase proteins for detecting infectious disease in pigs. *Veterinary Research*, 42(1), 1-13.
- Heegaard P. M., Miller I., Sorensen N. S., Soerensen K. E., Skovgaard K. 2013. Pig  $\alpha$ 1-acid glycoprotein: characterization and first description in any species as a negative acute phase protein. *PLoS One*, 8(7), e68110.
- Hennig P. I., Menzel A., Boehme T., Schierbaum H., Ganter M., Schulz J. (2019). Haptoglobin and C-Reactive Protein—Non-specific Markers for Nursery Conditions in Swine. *Frontiers in Veterinary Science*, 6. doi:10.3389/fvets.2019.00092
- Hernández J. 2016. *Elaboración y validación de un instrumento de evaluación de bienestar animal para cerdas en gestación y lactancia*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos>
- Lampreave, F., González Ramón, N., Martínez Ayensa, S., Hernández, M. A., Lorenzo, H. K., García Gil, A., Piñeiro, A. 1994. Characterization of the acute phase serum protein response in pigs. *Electrophoresis*, 15(1), 672-676.
- Martínez M. S., Tecles F., Ramón M., Escribano D., Hernández F., Madrid J., Orengo J., Martínez S. S., Manteca X., Cerón J. 2016. Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update. *BMC Veterinary Research*. 12(1). doi:10.1186/s12917-016-0791-8
- Myers M. J., Smith E. R., Turfle P. G. 2017. Biomarkers in veterinary medicine. *Annual Review of Animal Biosciences*, 5, 65-87.
- Muñoz R. 2014. Bienestar animal: un reto en la producción pecuaria. *Spei Domus*, 10(20), 31-40. doi: 10.16925/sp.v10i20.884

- Murata H. 2007. Stress and acute phase protein response: an inconspicuous but essential linkage. *Veterinary journal* (London, England.1997), 173(3), 473-474. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.05.008>
- O'Reilly E., Bailey R., Eckersall P. 2018. A comparative study of acute-phase protein concentrations in historical and modern broiler breeding lines. *Poultry Science*. doi:10.3382/ps/pey272
- Peroutka III R., Orcutt S., Strickler J., Butt T. 2011. SUMO fusion technology for enhanced protein expression and purification in prokaryotes and eukaryotes. *Heterologous Gene Expression in E. coli*, 15-30.
- Piñeiro M., Andres M., Iturralde M., Carmona S., Hirvonen J., Pyorala S., Alava M. A. 2004. ITIH4 (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4) is a new acute-phase protein isolated from cattle during experimental infection. *Infection and Immunity*, 72(7), 3777-3782.
- Piñeiro M., Piñeiro C., Carpintero R., Morales J., Campbell F., Eckersall P., Toussaint M., Lampreave F. 2007. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *The Veterinary Journal*, 173(3), 669–674. doi:10.1016/j.tvjl.2006.02.006
- Puicón V. H., Gutiérrez A. F. 2022. Sistema silvopastoril, alimentación y biotecnología para una producción animal sustentable. *Revista de Veterinaria y Zootecnia Amazónica*, 2(2), e408-e408.
- Sánchez M., Rosales M. A. 2017. Panorama general de la biotecnología en México y el mundo. *Las vicisitudes de la innovación en biotecnología y nanotecnología en México*, 33. ISBN UAM: 978-607-28-1197-3 ©Universidad Autónoma Metropolitana. Sección de Publicaciones de la División de Ciencias Sociales y Humanidades.
- Sarabia V. J. 2020. *Evaluación del bienestar animal en cerdos de engorda aplicando el protocolo Welfare Quality*. Tesis. Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias.
- Serrano E., Mantecon A. 2003. Bases para un desarrollo ganadero sostenible: la consideración de la producción animal desde una perspectiva sistémica y el estudio de la diversidad de las explotaciones. *Revista Española de Estudios Agrosociales y Pesqueros*. 199, 159-191. <http://hdl.handle.net/10261/8316>
- Tadich N., Gallo C., Brito M. L., Broom D. M. (2009). Effects of weaning and 48 h transport by road and ferry on some blood indicators of welfare in lambs. *Livestock Science*, 121(1), 132-136.
- Tadich N., Gallo C., Echeverría R., Van Schaik G. (2003). Efecto del ayuno durante dos tiempos de confinamiento y de transporte terrestre sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en novillos. *Archivos de medicina veterinaria*, 35(2), 171-185.

- Tan M. S., Teh Y. H., Ho K. L., Stanslas J. 2020. An application of pET SUMO protein expression system in *Escherichia coli*: Cloning, expression, purification, and characterisation of native Kras4B G12V oncoprotein. *The protein journal*, 39, 54-61.
- Te Pas M., Hoekman A., Smits M. 2011. Biomarkers as management tools for industries in the pork production chain. *Journal on Chain and Network Science*, 11(2), 155-166. doi:10.3920/jcns2011.qpork
- Tothova C., Novotny J., Nagy O., Hornakova P., Zert Z., Varga M., Medvecký L., Vdoviaková K., Danko J., Petrovova E. 2019. Changes in the Acute-Phase Protein Concentrations and Activities of Some Enzymes in Pigs Following the Repair of Experimentally Induced Articular Cartilage Defects Using Two Types of Biocement Powder. *Animals*. 9(11), 931. doi:10.3390/ani9110931
- Zhang Z. X., Wang Y. Z., Nong F. T., Xu Y., Ye C., Gu Y., Huang H. 2022. Developing a dynamic equilibrium system in *Escherichia coli* to improve the production of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(18), 6125-6137.