

AREANDINA

Fundación Universitaria del Área Andina

Generación *in silico* de un constructo, para la expresión de la Proteína Morfogénica Ósea 11 (BMP11), en un vector del sistema de expresión de baculovirus tipo Bac-to-Bac

Estefanía Vera Aricapa¹, Stefanía Peña Escobar¹, Carlos Valencia Basto²

Resumen

La proteína morfogénica ósea 11 (BMP11) pertenece a la super familia del Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β). Dicha proteína ha sido clonada solo una vez en vector plasmídico, pero nunca se ha realizado su clonaje en vectores de expresión de tipo viral, con el fin de expresarla de manera heteróloga en cultivos celulares (*in vitro*) con el sistema de baculovirus tipo Bac to Bac, por lo tanto, no se ha generado un constructo *in silico* que permita hacerlo en laboratorio a futuro. El objetivo del presente proyecto fue el diseño de un constructo pFastBac-HT-BMP11 correctamente mapeado, acompañado del diseño de iniciadores que permitan el clonaje direccional de la secuencia del gen BMP11, adaptada al uso de codones para que pueda llevarse a cabo el experimento en el laboratorio en células de *Spodoptera frugiperda* (Sf-9). Para llevar a cabo el clonaje, se usaron de manera alternativa los programas Serial Cloner v 2.6.1 y RF Cloning de uso gratuito, que permitieron el mapeo y el diseño del constructo con todos los parámetros adecuados para un posterior uso de los resultados en el laboratorio.

Palabras Claves

Proteína Morfogénica Ósea 11, clonaje, *in silico*, Baculovirus.

Abstract

Bone morphogenetic protein 11 (BMP11) belongs to the Transforming Growth Factor beta (TGF- β) superfamily. This protein has only been cloned once in a plasmid vector, but it has never been cloned in viral-type expression vectors in order to heterologously express it in cell cultures (*in vitro*) using the Bac to Bac baculovirus system. Therefore, an *in silico* construct has not been generated to allow future laboratory experiments. The objective of this project was the design of a

¹ Estudiantes odontología, Fundación Universitaria del Área Andina sede Pereira

² Docente Investigador grupo GIEE, Fundación Universitaria del Área Andina sede Pereira, cvalencia@areandina.edu.co

correctly mapped pFastBac-HT-BMP11 construct, along with the design of primers for the directional cloning of the BMP11 gene sequence, adapted for codon usage, so that the experiment can be carried out in *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) cells in the laboratory. To perform the cloning, the free software programs Serial Cloner v 2.6.1 and RF Cloning were alternatively used, enabling the mapping and design of the construct with all the appropriate parameters for later use of the results in the laboratory.

Key Words

Bone morphogenetic protein 11, Cloning, *In silico*, Baculovirus

Introducción

Las Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs) pertenecen a la super-familia Factores de Crecimiento Transformantes (TGF) (Winyard et al, 2014), que inducen la formación de hueso nuevo, cartílago, tejido conjuntivo (Bello-Hernández et al, 2016) y facilitan la remodelación de la estructura interna de cada hueso (Yang et al, 2013). Se conocen más de 20 BMP (Wotton et al, 2013), que corresponden a cuatro subclases: la primera BMP2 y BMP4, se diferencian en la región amino terminal (Jain et al, 2013). La segunda subclase BMP5, BMP6, BMP7 y 8 son proteínas de mayor tamaño, con un 70% de aminoácidos idénticos entre sí (Carreira et al, 2014). La tercera subclase BMP9 y BMP10 (Oryan et al, 2014). Por último, el cuarto subgrupo incluye la BMP-3 u osteogenina, que funcionan como BMP inhibidores (Kajimoto et al, 2015). Estas proteínas desempeñan un papel crucial en todos los sistemas de órganos, la embriogénesis y en el mantenimiento de la homeostasis del tejido adulto (Carreira et al, 2014a). Siendo su principal papel la inducción y formación (ectópica) (Santaolalla-Montoya et al, 2012) de cartílago y hueso en un microambiente pro-fibrótico (Zhang et al, 2013; Salazar et al, 2016).

BMP11 se conoce también como Factor de diferenciación y crecimiento 11 (GDF11), se ha vinculado con la regulación del patrón esquelético axial, la formación del esqueleto de las extremidades, incrementando la actividad celular de los osteoblastos (Li et al, 2011). Mutaciones en este gen puede generar braquipodismo en ratones y condrodisplasia en humanos (Chen et al, 2004). Actualmente, se han reportado 89 estudios clínicos principalmente en BMP2, BMP4 y BMP7 de acuerdo con lo reportado en Clinical Trials (<https://clinicaltrials.gov/>), ninguno hasta el momento con BMP11. Sólo hay un ensayo de inducción en la reparación de la dentina en perros adultos, gracias a la sonoporación directa de un constructo (pEGFPTIMP-Gdf11), para la expresión heteróloga de BMP11 (Nakashima et al, 2003).

Con la expresión heteróloga de la proteína BMP11, se busca su producción masiva para potenciales usos clínicos en la cicatrización ósea de fracturas a nivel veterinario y humano. El sistema baculovirus ha probado ser una plataforma que genera niveles altos de expresión para proteínas, de tal modo que el objetivo del presente trabajo es dar inicio con esta producción, a través de la propuesta de un protocolo bioinformático adecuado para el clonaje de la secuencia génica de BMP11, en el sistema de baculovirus Bac-to-Bac para que sea probado *in vitro* posteriormente.

Materiales y métodos

Obtención de las secuencias del vector y del inserto

La secuencia correspondiente al gen BMP11 de *Homo sapiens* se obtuvo de la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), a través de una búsqueda del ARNm en la base de datos RefSeq. La secuencia seleccionada finalmente fue aquella identificada con el Id NM_005811.5, la selección se basó en las características del comentario asociado a ella, en este caso se trata de una secuencia revisada (reviewed) y curada por parte del staff del NCBI. La secuencia del vector pFastBac HT A fue obtenida del repositorio Addgene (<https://www.addgene.org/>).

Análisis *in silico* del plásmido donante pFastBac HT A y del inserto correspondiente a la secuencia BMP11:

El análisis y la ubicación de los hitos moleculares del vector se mapearon en el software Serial Cloner v 2.6.1 (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html). Igualmente, se usó el software para localizar el sitio de clonaje múltiple y determinar la orientación o direccionalidad de la inserción del gen de interés, buscando los sitios de restricción que permitirán dicho clonaje. Una vez seleccionadas los dos sitios de restricción, se realizó la verificación de los sitios de corte en la secuencia del inserto BMP11, esto se realizó con el software NebCutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) (Vincze et al, 2003), con esto se identificaron las enzimas adecuadas que hicieran sólo cortes en el sitio de clonaje múltiple del vector, pero que no lo hicieran en la secuencia del inserto.

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de la secuencia del inserto BMP11, utilizando Blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), con el fin de caracterizar la secuencia de nucleótidos y generar su traducción *in silico* para identificar los dominios de la proteína, los cuales se compararon con las bases de datos de dominios conservados CDD del NCBI (Marchler-Bauer et al, 2015). Posteriormente, se hizo uso de la secuencia proteica de BMP11 identificada en el Genbank con el Id NP_005802.1 para complementar el análisis con el uso de la herramienta InterProScan del EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Quevillon et al, 2005; Mitchell et al, 2019), para identificar la posición de dichos dominios en la secuencia del inserto. Para la identificación del péptido señal, se usó la herramienta Signal IP v 5.0 de Expassy (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

Optimización en el uso de codones

Una vez se seleccionaron los sitios de restricción en el vector pFastBac HT A, estos fueron agregados a los extremos 5' y 3' de la secuencia NM_005811.5 de BMP11, para luego llevar a cabo la optimización en el uso de los codones, con el fin de lograr un adecuado nivel de expresión de la proteína BMP11 con el vector tipo Bac-to-Bac en células de *Spodoptera frugiperda* Sf9, se realizó la optimización en el uso de los codones utilizando Codon Optimization Tool de IDT – Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>), el proceso se llevó a cabo de

manera iterativa (dos veces) hasta lograr un puntaje adecuado para la síntesis de la secuencia optimizada con base en los valores de IDT.

Clonaje *in silico* de la secuencia génica BMP11 optimizada en el vector pFastBac HT A

Para el clonaje *in silico* del inserto BMP11 optimizado, se emplearon dos software de uso gratuito, Serial cloner v 2.6.1 (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) y RF Cloning (<https://www.rf-cloning.org/>) (Bond & Naus, 2012).

Evaluación de la especificidad de los iniciadores y las características fisicoquímicas para la formación de homodímeros, horquillas (hairpins) y heterodímeros:

La especificidad de los iniciadores y el cálculo de su temperatura de fusión se llevó a cabo a través del software Serial Cloner v 2.6.1, los resultados se compararon con los resultados de especificidad obtenidos manualmente usando Blastn (Altschul et al, 1990). Igualmente se analizaron fisicoquímicamente con la formación de homodímeros, horquillas y heterodímeros con el software OligoAnalyzer v 3.1 de IDT (Integrated DNA Technologies - <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) (Owczarzy et al, 2008).

Resultados

Se obtuvo la secuencia de ARNm de BMP4 de *Homo sapiens* de la base de datos RefSeq identificada con el Id: NM_001202.5, para llevar a cabo su caracterización, se comparó con las secuencias de los ARNm maduros reportadas igualmente en el GenBank, específicamente con la variante XM_006719194.3, para lograrlo se usó el algoritmo de alineamiento de dos secuencias de Blastn, con ello se logró identificar la posición de la cola Poli-A para el gen. La caracterización completa se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis y caracterización de la secuencia de ARNm de la proteína BMP11 de *Homo sapiens* identificada con el Id NM_005811.5

Características de la Secuencia	Ubicación (nt)
Tamaño de la secuencia	8801 bp
Ubicación del gen	196 - 1419
Codón de inicio	196 - 198
Codón de parada	1417 - 1419
Cola poli-A	8545 - 8731

Los resultados en Blastx identificaron secuencias consenso que coinciden con la ubicación de la preproteína y la proteína perteneciente a la familia del Factor de Crecimiento Transformante β . De igual modo se utilizó InterProScan para la búsqueda de dominios proteicos y confirmar los hallazgos a través de CDD, de la secuencia BMP11 (NP_005802.1) de *Homo sapiens*.

Tabla 2. Ubicación de dominios proteicos en la secuencia de aminoácidos de la proteína BMP11, de *Homo sapiens*, a partir de la secuencia proteica NP_005802.1

Proteína	Péptido señal	Propéptido	Nudo de Cisteína	Péptido TGF β
BMP11	1 - 24	65 – 275	299 – 407	295 – 407

Datos arrojados por Signal IP e Interproscan en el presente estudio.

En la secuencia de BMP11 se identificó hacia el lado N-terminal de la secuencia, un péptido señal entre los aminoácidos 1 al 24 (Signal IP No TM, Signal IP TM y PHOBIUS) (Tabla 2). Igualmente, entre los aminoácidos 65 y 275, un dominio perteneciente a la familia del Factor de Crecimiento Transformante β (InterPro domain, Pfam), correspondiente a la secuencia identificada en la figura 1 como el propéptido TGF β . Hacia el extremo C-terminal se determinó la presencia de un nudo de cisteína entre los aminoácidos 299 al 407 (Superfamily y CATH) ubicado en el dominio del péptido TGF β (295-407), confirmado igualmente con CDD, coincide con el monómero de BMP11 que actúa como una citoquina.

MVLAAPLLLGLLLALELRPRGEA AEGPAAAAAAAAAAAAAGVGGERSRPAPSVAPEPDGCPV CVWRQ
 HSRELRESIKSQILSKLRLKEAPNISREVVKQLLPKAPPLQILDLHDFQGDALQPEDFLEEDEYHATTETVI
 SMAQETDPAVQTDGSPLCCHFHFSPKVMFTKVLKAQLWVYLRPVP RPATVYLQILRLKPLTGEGTAGGGG
 GGRHIRIRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWFRQPQSNWGIEINAFDPSGTDLA VTSLPGAEGLHPFM
 ELRVLENTKRSRRNLGLDCDEHSSESRCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGQCEYMFQMOKYPH
 THLVQQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNNDKQQIYGGKIPGMVVDRCGCS

Figura 1. Identificación y ubicación de dominios en la secuencia proteica de BMP11 del péptido señal (verde), el propéptido TGF β (rojo), nudo de Cisteína (Subrayado negro) y el péptido TGF β (Amarillo).

Inicialmente, se mapeó el plásmido pFastBac HT A con ayuda de la base de datos addgene, con el fin de caracterizar y reconocer los principales hitos de la secuencia de ADN del vector, identificar la zona de clonaje múltiple y la dirección en la cual el gen deberá ser clonado *in silico*. Para lograrlo se usaron los software Serial cloner v 2.6.1 y RF-Cloning (se puede acceder al proyecto completo en RF-Cloning en el siguiente URL: https://www.rf-cloning.org/rf_cloning_project.php?proj_id=96a6960d2f68fb4fa7a88152b4d2ecde - usando el número de identificación 96a6960d2f68fb4fa7a88152b4d2ecde) (Figura 2).

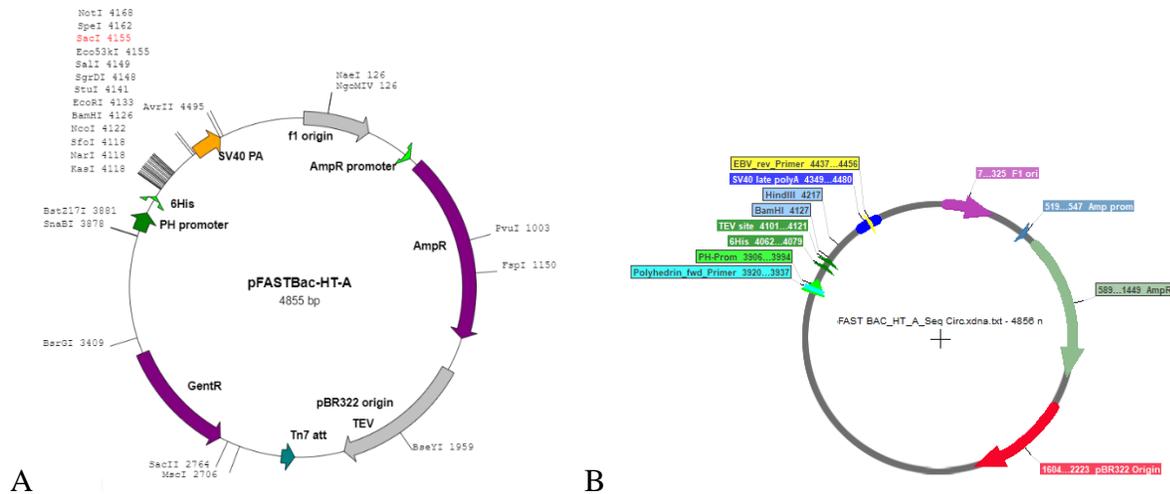


Figura 2. Caracterización y mapeo de la secuencia del plásmido pFastBac HT A, a partir de la secuencia de la base de datos addgene. A. Mapeo con RF-Cloning B. Mapeo con Serial Cloner v 2.6.1.

Con base en la caracterización de la secuencia del plásmido pFastBac HT A, el clonaje *in silico* de la secuencia BMP11 se realizó en el sitio de clonaje múltiple de manera direccional, teniendo en cuenta que el extremo 5' de la secuencia BMP11 quedara orientada corriente abajo después de la secuencia del promotor de poliedrina (PH promoter – Ver Figura 2), para lo cual se evaluaron los sitios de restricción de la región de múltiple clonaje del vector. Una vez hecho esto se seleccionaron los sitios correspondientes a las secuencias blanco de las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, y se evaluó la secuencia de BMP11 en NeBCutter para determinar si las enzimas tenían sitios blancos que escindan el interior de la secuencia del inserto.

Una vez analizada la secuencia del inserto BMP11, se llevó a cabo la optimización en el uso de los codones, dicha optimización se realizó dos veces, de manera iterativa, con el fin de mejorar el puntaje y hacer posible la síntesis posterior del inserto, para su amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el laboratorio. La secuencia editada del inserto BMP11 con los sitios de restricción y optimizada, se evaluó a través de Blastx para predecir si dará lugar a la síntesis de una proteína similar a BMP11 de *Homo sapiens*. Adicionalmente, se llevó a cabo un alineamiento entre la secuencia proteica generada por Blastx y la secuencia proteica de referencia NP_005802.1. El alineamiento realizado en Blastp tuvo un cubrimiento del 88%, ya que el algoritmo de predicción Blastx no generó la proteína con el péptido señal al extremo N-terminal de BMP11, sin embargo, al realizar el alineamiento de las dos secuencias en Blastp, se presentó un 100 % de identidad, no se presentaron gaps entre las secuencias y el resumen gráfico del alineamiento mostró la falta del péptido señal en la secuencia predicha a partir de la secuencia optimizada del inserto.

Posteriormente, se realizó el clonaje direccional *in silico* con Serial cloner v 2.6.1 y RF-Cloning, para generar el constructo pFastBac HT-BMP11. El inserto BMP11 se ubicó adecuadamente en el sitio de clonaje múltiple, corriente abajo de la etiqueta de Histidina para facilitar su purificación y del promotor de poliedrina, como se puede observar en la figura 2.

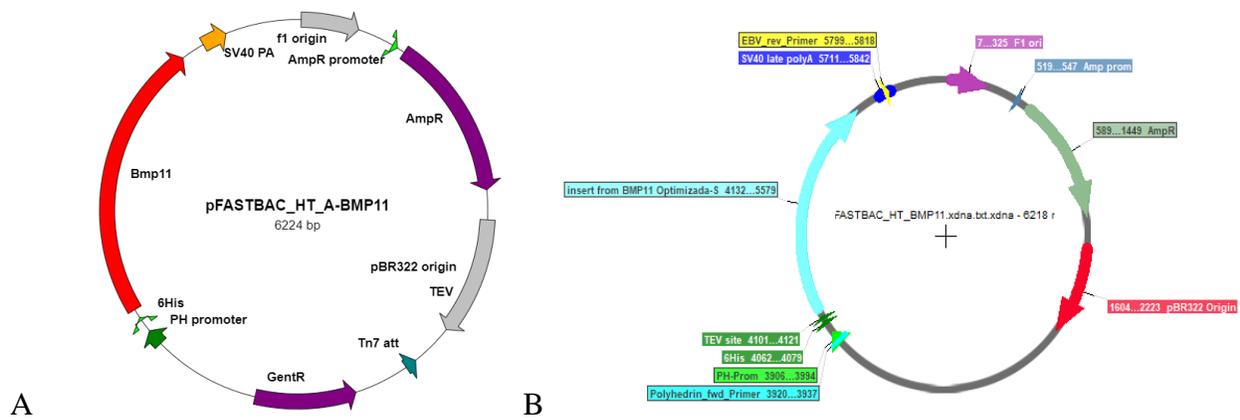


Figura 2. Mapeo del constructo pFastBac HT-BMP11. A. Resultado del clonaje con RF-Cloning, inserto en color rojo. B Resultado del clonaje con Serial cloner v 2.6.1, inserto en color claro.

Finalmente, se diseñaron los iniciadores para la amplificación por PCR en el laboratorio, para ello se empleó RF-Cloning (Tabla 3). Y se realizó la evaluación de su especificidad (Figura 3) y sus características fisicoquímicas (Tabla 3).

Tabla 3. Evaluación de las características fisicoquímicas de los iniciadores diseñados en RF-Cloning.

Iniciador	Secuencia	T _m	Horquilla	Homodímeros	Heterodímeros
Sentido	5'- GAGAGGATCCCGTCCGAGACCTC-3'	62,2	SI	NO	NO
Antisentido	5'- GAGAAAGCTTAATTATGGAGAACTGGCCATAGTA -3'	59,2	SI	NO	NO

Desde el punto de vista fisicoquímico, ambos iniciadores (sentido y antisentido) presentaron un ΔG de -1,5 y -1,68 Kcal/mol, respectivamente, para la formación de horquillas. La energía libre de Gibbs arrojó un resultado negativo, lo que indica la aparición espontánea de este tipo de estructuras gracias a las características inherentes de las secuencias, en ambos casos tienen temperaturas de fusión (T_m) de 38,9 y 41,3 °C, respectivamente, lo que indica que se puede controlar la formación de estas estructuras con ayuda del manejo de temperaturas en el termociclador en el laboratorio. Para las otras características como homodímeros y heterodímeros, los iniciadores presentaron ΔG muy bajos, asociados con la no conformación de este tipo de estructuras, por lo que no interferirán con el proceso de PCR.

Por otro lado, se evaluó igualmente la especificidad de los iniciadores, para ello se usó Serial cloner v 2.6.1, ya que el software tiene la ventaja de evaluar el segmento idéntico a la secuencia blanco (para este caso la del inserto BMP11) y el segmento no idéntico (Figura 3).

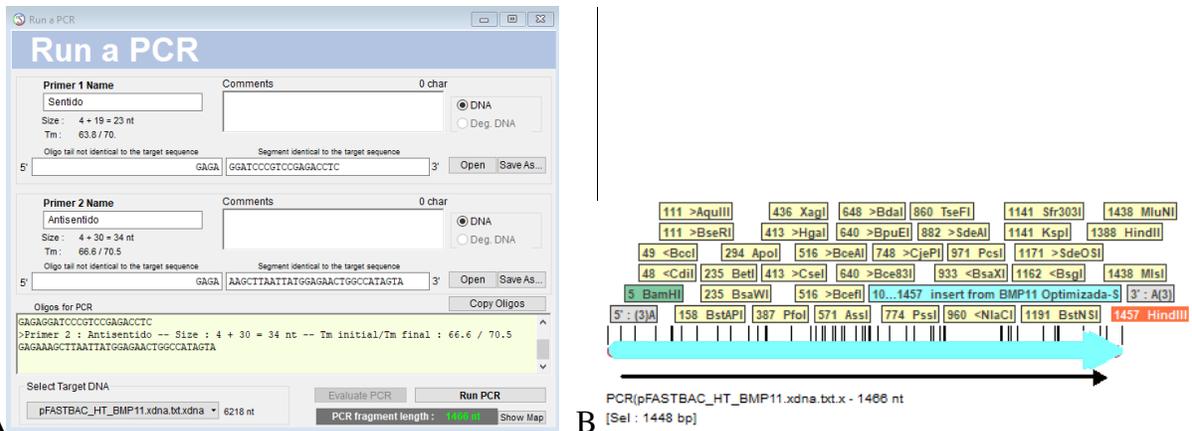


Figura 3. Evaluación de la especificidad de los iniciadores generados por RF-Cloning A. muestra los resultados del fragmento amplificado usando los iniciadores B. muestra que el amplicón generado coincide con el inserto BMP11 y muestra los sitios donde harán blanco las endonucleasas de restricción *BamHI* y *HindIII*.

Discusión

El clonaje molecular de una secuencia de ADN en un vector de expresión es una técnica de biología molecular que permite la expresión heteróloga de gen en un cultivo celular procarionte o eucariote según las necesidades de producción. Es una estrategia biotecnológica con el fin de obtener purificados de proteínas funcionales para determinados tratamientos exógenos o para la inmovilización en matrices o andamios. Para lograr esto en el laboratorio y luego pretender escalarlo productivamente, se debe iniciar con la planificación de una estrategia *in silico* que permite soslayar los posibles imponderables que puedan llegar a presentarse en el laboratorio, con el fin de allanar el camino experimental, y en la medida de lo posible, ahorrar tiempo y dinero durante el proceso de experimentación *in vitro*.

Se realizó un análisis de la secuencia seleccionada (BMP11) para el experimento *in silico* de clonaje. El inserto de elección debe ser caracterizado en su secuencia primaria a nivel nucleotídico y aminoácido, con el fin de minimizar las posibilidades de error en el procedimiento. En este sentido, se realizó un alineamiento de la secuencia de ARN seleccionada NM_005811.5 con los ARNm maduros reportados en Blastn, con ello se pudo verificar que la secuencia codificante consta de dos exones que se encuentran adyacentes, y una cola de poliadenilación que se encuentra a una distancia de 7126 bp (Ver Tabla 1). Igualmente, se llevó a cabo una búsqueda con Blastx, cuyo algoritmo permite la traducción de la secuencia nucleotídica en los diferentes marcos de lectura, con el fin de comparar la secuencia proteica generada aquellas reportadas en la base de datos. Con la secuencia generada, se realizó un alineamiento en Blastp con la secuencia aminoácida reportada NP_005802.1.

La comparación inicial permitió observar que el alineamiento sin gaps sólo iniciaba a partir del aminoácido 47 de la secuencia NP_005802.1, lo que sugiere la presencia de un péptido señal en el extremo N-terminal de la proteína (Tabla 2), por lo que se realizó un análisis más completo de la proteína con InterProScan (Quevillon et al, 2005) y se hizo una búsqueda simultánea en diferentes bases de datos (familias, dominios, sitios y repeticiones) como: InterPro family, Smart, Prosite, Pfam, PANTHER, Superfamily, CATH (Mitchell et al, 2019), para caracterizar la secuencia

primaria de la proteína (Figura 1), con todo esto se definió la secuencia nucleotídica que se utilizó como inserto en la elaboración del constructo.

El mapeo del vector de expresión pFastBac HT A (Figura 2) permitió la identificación de los hitos más importantes de la secuencia, especialmente la ubicación del promotor de poliedrina, importante para la producción de la proteína, ya que se trata de un promotor muy fuerte que en baculovirus controla la expresión tardía de poliedrina, y además por la ubicación de la producción, facilitará la purificación de la proteína heteróloga expresada bajo su control (Beljelarskaya, 2011; Ono et al, 2018). Además, se logró la localización del sitio de clonaje múltiple, con el cual se facilitó la elección de los sitios de restricción para las endonucleasas que escindieron la secuencia del vector y permitir así la inserción de la secuencia de BMP11. Así que se realizó el análisis de los potenciales sitios blanco de las endonucleasas de restricción seleccionadas (*Bam*HI y *Hind*III) dentro de la secuencia de BMP11, para verificar que no digirieran la secuencia, lo que en el laboratorio significaría la generación de fragmentos y el potencial clonaje de los mismos sin dirección alguna, con consecuencias notables en el tipo de proteína que se buscará producir *in vitro*.

Una vez analizada la secuencia con NeBCutter, se añadieron manualmente las secuencias blanco de las endonucleasas de restricción a la secuencia, *Bam*HI en el extremo 5' y *Hind*III en el extremo 3', posteriormente se realizó la optimización del uso de codones, con el fin de sustituir codones sinónimos que puedan ser expresados sin inconvenientes en *Spodoptera frugiperda*, esta decisión no cambia la secuencia aminoacídica de la proteína resultante, con la ventaja de que los sistemas de expresión viral resisten un gran número de sustituciones sinónimas, siempre y cuando se conozcan las estructuras biológicas relevantes de la proteína (Montes et al, 2012). Al parecer la tasa de expresión es controlada por la eficiencia en el inicio y la elongación de la traducción, las cuales pueden verse afectadas en el sistema de expresión, en caso de no haber realizado una optimización en el sesgo de los codones utilizados (Quax et al, 2015; Markina et al, 2020), lo que genera una alta tasa de expresión de la proteína de interés (Papamichail et al, 2018; Bornelöv et al, 2019).

Una vez adaptada la secuencia con los sitios de restricción flanqueantes y la optimización de codones, se realizó el clonaje con ayuda de los algoritmos de Serial cloner y RF-Cloning, con los que se generó el constructo pFastBac HT-BMP11 (Figura 2). El mapa del constructo permite visualizar la secuencia del inserto en la dirección correcta y ubicado corriente debajo de la etiqueta de Histidina y el promotor de poliedrina. Finalmente, se diseñaron los iniciadores con el algoritmo de RF-Cloning (Tabla 3) y se evaluó su especificidad con Serial cloner (Figura 3). Las características fisicoquímicas inherentes de las secuencias de los oligos se evaluaron termodinámicamente para identificar la probabilidad en la formación de estructuras secundarias tipo horquillas, homodímeros y heterodímeros que pueden interferir posteriormente con las reacciones *in vitro* (Bonnet et al, 1999). Los valores de ΔG representan la energía requerida para romper la estructura secundaria formada; para el caso de los dos iniciadores evaluados, la probabilidad de formar homodímeros y heterodímeros es tan baja, que los oligos mantendrán su estructura lineal con muy poca energía (Haasnoot et al, 1983; Elkins, 2011), incluso para la estructura tipo horquilla identificada en el análisis, a pesar de los valores negativos de ΔG encontrados, la energía requerida para desnaturalizar las estructuras es de -1,5 y -1,68 Kcal/mol,

por lo que se requerirán temperaturas de fusión programadas en el termociclador por encima de los 45 °C para mantener la estabilidad lineal de las estructuras de ambos oligos.

El presente trabajo se desarrolló no sólo como un ejercicio académico sino como un primer paso de un proyecto de largo aliento para la producción de proteínas heterólogas que puedan ser purificadas para ensayos *in vivo* en cultivos celulares y modelos animales, o para ser embebidas en andamios que faciliten la proliferación y diferenciación celular, en un enfoque relacionado con la ingeniería de tejidos. El sistema baculovirus es una de las plataformas biotecnológicas que ha demostrado una gran eficiencia productiva en este aspecto, por lo que se espera que esta aproximación *in silico* pueda ser evaluada a mediano plazo en ensayos *in vitro*.

Referencias Bibliográficas

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215(3):403-410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Beljelarskaya SN. Baculovirus expression systems for production of recombinant proteins in insect and mammalian cells. *Mol Biol.* 2011;45(1):123-138. doi:10.1134/S002689331101002X

Bello-Hernández C, Pérez-Romero G, Reyes-Velázquez J. Respuesta histológica al uso de proteína morfogenética ósea tipo 2 (rhBMP-2) en defectos óseos provocados en ratas Wistar. *Estudio Experimental. Rev Sanid Milit;* 2016; 66(2): 83-88.

Bond SR, Naus CC. RF-Cloning.org: an online tool for the design of restriction-free cloning projects. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Web Server issue):W209-W213. doi:10.1093/nar/gks396

Bonnet G, Tyagi S, Libchaber A, Kramer FR. Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(11):6171-6176. doi:10.1073/pnas.96.11.6171

Bornelöv S, Selmi T, Flad S, Dietmann S, Frye M. Codon usage optimization in pluripotent embryonic stem cells. *Genome Biol.* 2019;20(1):119. Published 2019 Jun 7. doi:10.1186/s13059-019-1726-z

Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications. *Arch Biochem Biophys.* 2014;561:64-73. doi:10.1016/j.abb.2014.07.011

Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res.* 2014a;93(4):335-345. doi:10.1177/0022034513518561

Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 2004;22(4):233-241. doi:10.1080/08977190412331279890

Haasnoot CA, de Bruin SH, Berendsen RG, et al. Structure, kinetics and thermodynamics of DNA hairpin fragments in solution. *J Biomol Struct Dyn.* 1983;1(1):115-129. doi:10.1080/07391102.1983.10507429

Jain AP, Pundir S, Sharma A. Bone morphogenetic proteins: The anomalous molecules. *J Indian Soc Periodontol.* 2013;17(5):583-586. doi:10.4103/0972-124X.119275

Kajimoto H, Kai H, Aoki H, et al. BMP type I receptor inhibition attenuates endothelial dysfunction in mice with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2015;87(1):128-136. doi:10.1038/ki.2014.223

Li Z, Zeng F, Mitchell AD, Kim YS, Wu Z, Yang J. Transgenic overexpression of bone morphogenetic protein 11 propeptide in skeleton enhances bone formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;416(3-4):289-292. doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.019

Marchler-Bauer, A; Lu, S; Anderson, JB; Chitsaz, F; Derbyshire, MK; DeWeese-Scott, C et al. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids. Res* 2015; 43: D222 – D226.

Mitchell AL, Attwood TK, Babbitt PC, et al. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D351-D360. doi:10.1093/nar/gky1100

Montes P, Memelli H, Ward CB, Kim J, Mitchell JSB, Skiena S. Optimizing restriction site replacement for synthetic genomes. *Information and computation* 2012; 213: 59-69 Published 2012 Apr. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ic.2012.02.003>

Nakashima M, Tachibana K, Iohara K, Ito M, Ishikawa M, Akamine A. Induction of reparative dentin formation by ultrasound-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11. *Hum Gene Ther.* 2003;14(6):591-597. doi:10.1089/104303403764539369

Ono C, Okamoto T, Abe T, Matsuura Y. Baculovirus as a Tool for Gene Delivery and Gene Therapy. *Viruses.* 2018;10(9):510. Published 2018 Sep 19. doi:10.3390/v10090510

Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Bigham-Sadegh A. Bone morphogenetic proteins: a powerful osteoinductive compound with non-negligible side effects and limitations. *Biofactors.* 2014;40(5):459-481. doi:10.1002/biof.1177

Owczarzy R, Tataurov AV, Wu Y, et al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Web Server issue):W163-W169. doi:10.1093/nar/gkn198

Papamichail D, Liu H, Machado V, Gould N, Coleman JR, Papamichail G. Codon Context Optimization in Synthetic Gene Design. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform.* 2018;15(2):452-459. doi:10.1109/TCBB.2016.2542808

Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, et al. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Web Server issue):W116-W120. doi:10.1093/nar/gki442

Salazar VS, Gamer LW, Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(4):203-221. doi:10.1038/nrendo.2016.12

Santaolalla-Montoya F, Martinez-Ibargüen A, Sánchez-Fernández JM, Sánchez-del-Rey A. Principles of cranial base ossification in humans and rats. *Acta Otolaryngol.* 2012;132(4):349-354. doi:10.3109/00016489.2011.642814

Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3688-3691. doi:10.1093/nar/gkg526

Winyard PJ, Price KL. Experimental renal progenitor cells: repairing and recreating kidneys?. *Pediatr Nephrol.* 2014;29(4):665-672. doi:10.1007/s00467-013-2667-5

Wotton KR, Alcaine Colet A, Jaeger J, Jimenez-Guri E. Evolution and expression of BMP genes in flies. *Dev Genes Evol.* 2013;223(5):335-340. doi:10.1007/s00427-013-0445-9

Yang X, Yang ZJ, Liu FX, et al. Inhibition of mTOR and HIF pathways diminishes chondro-osteogenesis and cell proliferation in chondroblastoma. *Tumour Biol.* 2013;34(5):3111-3119. doi:10.1007/s13277-013-0879-8

Zhang, Y., Jiang, X., & Guo, Y. Influence of bone morphogenetic protein on articular cartilage regeneration following periosteal grafting. *J Biomed Sci Eng.* 2013; 6: 25 – 30. doi: <http://dx.doi.org/10.4236/jbise.2013.61004>