

INTRODUCCIÓN

1.1 Historia Breve de la Biotecnología

Biotecnología es una de las palabras más usadas y abusadas de la biología moderna, con definiciones que se acomodan a una amplia variedad de aspectos. La definición más utilizada es la que se ocupa de los sistemas biológicos (animales, microorganismos y plantas) y sus aplicaciones a la agricultura, industria, salud y medio ambiente. Muchas aplicaciones no son nuevas y ejemplos de ellas son el ensilado, las industrias alimentarias tradicionales y el tratamiento de aguas residuales, actividades que abarcan varios siglos. El conocimiento actual del público surge, sin embargo, a partir de un cierto número de descubrimientos relativamente recientes, siendo los más significativos el empleo de la tecnología del ADN recombinante para la clonación de genes y su expresión en nuevos ambientes celulares y la fusión de células de bazo y de mieloma para formar hibridomas capaces de producir anticuerpos monoclonales.

Entre las biotecnologías tradicionales y las más modernas innovaciones subyace una historia de acontecimientos con un cierto número de hitos importantes en el camino. En cualquier análisis de estos acontecimientos queda claro que las necesidades estratégicas y económicas, así como la inventiva de los biólogos, químicos e ingenieros han producido los estímulos necesarios para el progreso de la Biotecnología.

Con anterioridad a 1800, la industria de la fermentación tradicional era un arte y la fabricación de cerveza, pan, manufactura del queso, etc. dependían fundamentalmente de la destreza local.

El siglo XIX conoció algunos progresos considerables con el trabajo de Pasteur sobre las "enfermedades de la cerveza" y el reconocimiento de la participación de las levaduras en ésta, la más fundamental de las fermentaciones. Ya en 1896, Hansen usaba cultivos puros de levaduras en la fábrica de cerveza de Carlsberg en Copenhague. La producción del vinagre era también practicada ampliamente, aunque sin un conocimiento de las razones por las cuales las cubetas planas y los filtros eran tan convenientes para este proceso. Los últimos años de ese siglo vieron también el uso del etanol de fermentación como combustible para motores y la lixiviación microbiana de minerales de cobre. Además, se produjeron avances en la microbiología médica con los postulados de Koch, el reconocimiento del papel de las bacterias en las enfermedades humanas y el comienzo de la comprensión del sistema inmunológico y la aplicación de vacunas protectoras.

Entre los logros de los primeros años del presente siglo se pueden incluir la primera planta de digestión anaeróbica a gran escala para el tratamiento de aguas residuales, predecesora de las modernas instalaciones de biogas, y el método de cultivo de superficie en la manufactura del ácido cítrico para la industria empleando *Aspergillus niger*. La Guerra Mundial de 1914-1918, provocó demandas biotecnológicas especiales como el proceso Neuberg para la producción de glicerol (para la manufactura de nitroglicerina) mediante una fermentación "dirigida" de *Saccharomyces cerevisiae* y el proceso Weizmann, usando *Clostridium spp.* para la producción de disolventes como la acetona (para la fabricación de cordita).

El siguiente estímulo llegó 20 años más tarde con otra guerra mundial. La aplicación más sobresaliente que proviene de aquella época fue la producción comercial de la penicilina, inicialmente en cultivo de superficie y más tarde a partir de cultivos

sumergidos de *Penicillium*. Posteriormente, la producción de penicilina a gran escala requirió el uso de sistemas de fermentación asépticos mucho mayores a los empleados anteriormente, con lo cual nace el desarrollo de la tecnología moderna. Además, la penicilina fue el primer antibiótico utilizado en terapéutica y revolucionó el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Poco tiempo después, el trabajo pionero de Waksman llevó a la producción de la estreptomicina. Este trabajo fue de especial importancia, ya que Waksman empezó a seleccionar microorganismos aislados del suelo en función de sus propiedades antimicrobianas. Esta acertada estrategia se sigue empleando desde entonces por las compañías farmacéuticas y ha conducido al aislamiento de miles de compuestos, la mayor parte a partir de estreptomicetos del suelo. Desde los años 40, se han comercializado muchos productos de fermentación, entre los que se incluyen las cefalosporinas (antibióticos), un cierto número de aminoácidos (fundamentalmente como resultado de la investigación japonesa), nucleótidos, vitaminas, enzimas y las giberelinas. Además, la transformación microbiana de esteroides de plantas para obtener hormonas de mamíferos ha producido beneficios médicos y sociales significativos. Estos avances sólo fueron posibles gracias a un incremento en el grado de complejidad y sofisticación en los medios de fermentación y extracción, con el fin de producir esta gama de materiales de forma eficaz y a un costo conveniente. Las fermentaciones por lotes y con alimentación automática han sido los métodos de producción elegidos en estas industrias.

En los años 60, la preocupación por la disponibilidad de proteínas de consumo humano y del ganado coincidió con un suministro abundante y relativamente barato de aceite y de productos relacionados. De esta forma se produjeron proteínas de organismos unicelulares ("single cell protein", SCP) a partir de hidrocarburos, metano y metanol, popularizándose así las fermentaciones continuas a gran escala.

Durante los últimos 35 años aparecieron muchas de las aplicaciones de la "biotecnología microbiana", entre las que se encuentran la producción de jarabes de alto contenido de fructosa, polisacáridos como la goma de xantano e insecticidas bacterianos.

El uso de cultivo de células y tejidos de animales y plantas tiene una larga historia; por ejemplo, el empleo de los primeros en la producción de vacunas. Además, un gran número de productos farmacéuticos, enzimas, aromatizantes y colorantes alimentarios se extraen directamente de plantas cosechadas, o bien el uso de los animales de matadero como fuente de productos farmacéuticos como la insulina. La sangre humana es la fuente de un cierto número de productos entre los que se incluyen el factor de la coagulación VIII y la albúmina sérica. La extracción de la hormona del crecimiento a partir de las glándulas pituitarias, y la enzima uroquinasa que elimina los coágulos sanguíneos a partir de la orina.

Para llevar esta breve historia hasta nuestros días, los sistemas de restricción y modificación en bacterias fueron descritos a finales de los años 60 y la aplicación de las endonucleasas de restricción siguió pocos años después, mientras que Milstein y Köhler publicaron su ahora clásico artículo sobre la formación de hibridomas en 1975. Así, se desarrollaron nuevas compañías para explotar estos descubrimientos, lo cual provocó que estas modernas biotecnologías se encuentren rápidamente protegidas por patentes. Por ejemplo, muchas de las etapas básicas en la clonación de genes están cubiertas por la patente Cohen-Boyer de 1980 y la patente de 1981 concedida a Chakrabarty fue la primera en proteger un microorganismo "fabricado" por el hombre (incluso cuando en ese caso no se utilizó la clonación de genes). Finalmente, un hito que merece resaltarse ocurrió en 1982 cuando la compañía Eli Lilly consiguió la aprobación de la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos para la producción de la "insulina humana" obtenida por clonación molecular en *Escherichia coli*. Siguió otros muchos productos como los interferones, las hormonas del crecimiento humana y bovina, el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y otros muchos más.

Las industrias biotecnológicas dedicadas a los productos de fermentación tradicional, como las bebidas alcohólicas y el queso, son las mayores en términos de volumen de ventas mundiales. Sin embargo, las ventas en biotecnología son pequeñas en

comparación con la industria química y la industria agrícola. Los únicos productos que compiten directamente con materiales comparables de las industrias petroquímicas y agrícolas son el etanol de fermentación, usado como combustible y como materia prima química, y el jarabe de alto contenido de fructosa usado como alternativa al azúcar invertido refinado. El resto son metabolitos microbianos especializados o demasiado complejos y/o costosos para ser preparados por síntesis química. En general, los productos biotecnológicos de mayor éxito son alimentos o ingredientes de alimentos o bien materiales de alto valor para uso en sanidad humana o animal, sobre los que existe una gran demanda. Los nuevos productos obtenidos por clonación molecular van a caer probablemente en esta última categoría en un futuro previsible (1). Uno de estos productos podría ser la HGHR.

1.2 Hormona del Crecimiento Humana (HGH)

La HGH o somatotropina es sintetizada por las células somatotrópicas de la glándula pituitaria anterior. Es la más abundante en ésta y representa aproximadamente el 1-3 % (5-15 mg) del peso total de la glándula (2). La HGH es una proteína globular con un peso molecular de 22005 daltones (22 kDa) y un punto isoeléctrico de 5.1. Esta consiste en una cadena polipeptídica con 191 aminoácidos (Anexo 1), tiene dos enlaces disulfuro intracadena, no presenta residuos de carbohidratos y su estructura secundaria es principalmente α -hélice (3, 4, 5). En base al modelo tridimensional de la hormona del crecimiento porcina, se considera que la HGH está constituida por 4 α -hélices antiparalelas (Figura 1). La molécula presenta dos enlaces disulfuro que conectan la α -hélice 4 con el extremo carboxilo terminal, y la α -hélice 1 con la α -hélice 4 (6). Similarmente, las hormonas del crecimiento (GH) purificadas a partir de glándulas pituitarias de cabras, cerdos y ovejas son también proteínas globulares simples (7). Mientras que aproximadamente el 90 % de la HGH contenida en la glándula pituitaria

tiene un peso molecular de 22 kDa, otras variantes han sido identificadas. Estos péptidos de GH variantes han sido aislados a partir de plasma, tejido pituitario y bibliotecas de ADN complementario (ADNc) pituitario y difieren de la forma de 22 kDa en su peso molecular, movilidad electroforética o su actividad biológica (8).

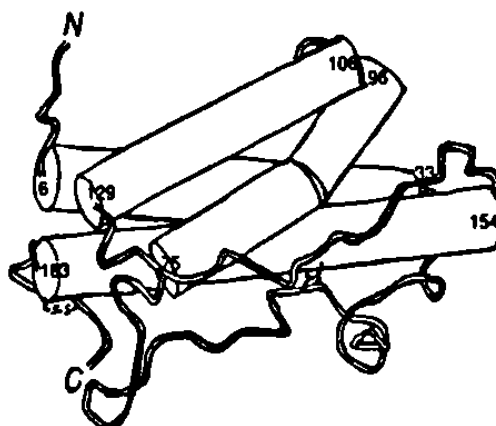


Figura 1. Modelo Estructural de la HGH basado en el Modelo para la Cadena Polipeptídica de la Hormona del Crecimiento Porcina. Los puntos al inicio y al final de las α -hélice están numerados de acuerdo a la secuencia de HGH. N indica el extremo amino terminal y C el extremo carboxilo terminal. Se indican también los dos enlaces disulfuro intracadena.

La HGH es liberada de manera intermitente a partir de las células somatotrópicas bajo el control directo de otras dos hormonas, la hormona liberadora de hormona de crecimiento, que estimula su secreción, y la somatostatina que inhibe su secreción. Ambas hormonas son secretadas y controladas dentro de la circulación portal hipofiseal por neuropéptidos de células del hipotálamo.

La HGH induce el crecimiento de todos los tejidos del organismo capaces de crecer. Aumenta el tamaño celular, estimula la mitosis favoreciendo la proliferación e induce la diferenciación específica de ciertos tipos celulares como las células del crecimiento óseo y las células musculares. Además de su efecto específico en el crecimiento, esta hormona tiene muchos efectos metabólicos generales que incluyen el aumento de la síntesis de proteínas en todas las células del organismo, la liberación de ácidos grasos del tejido

adiposo, el aumento del aprovechamiento de los mismos para producir energía y la disminución del índice de utilización de glucosa en todo el organismo. En consecuencia, la HGH aumenta las proteínas del organismo, favorece el empleo de los depósitos de grasa y conserva los carbohidratos. La HGH actúa directamente sobre las células blanco o por medio de intermediarios de tipo hormonal llamados somatomedinas, un grupo de péptidos sintetizados por el hígado y el cartílago (9).

La importancia de la HGH y su aplicación práctica en el área biofarmacéutica se refleja en los usos que ha tenido en el tratamiento de obesos mediante la remoción de ácidos grasos, en el mejoramiento de la vascularización y la promoción de la ganancia de masa muscular en los ancianos, en el tratamiento de úlceras y fracturas óseas, en la regeneración de tejidos dañados y en el tratamiento de daño renal (10). Por otro lado, el empleo de la HGH en pacientes con enanismo hipofisiario se ha popularizado recientemente, gracias a la disponibilidad de la hormona recombinante (HGHR) producida en microorganismos reprogramados por ingeniería genética. Esta ha sustituido el empleo de la hormona recuperada a partir de cadáveres, la cual se venía utilizando hasta antes de la implementación de la producción de la forma recombinante, y que incluso se ha prohibido debido al fallecimiento de varios pacientes tratados a causa de contaminación con virus lentos que afectan el sistema nervioso central (11, 12). En 1985, la FDA de EUA aprobó la salida al mercado de PROTROPIN, nombre que Genentech dio a su HGHR producida por ingeniería genética.

1.3 Biosíntesis de la Hormona del Crecimiento Humana Recombinante (HGHR)

1.3.1 Sistemas de Expresión en *Escherichia coli*

Existen numerosos productos génicos de interés biológico, los cuales no pueden ser obtenidos a partir de su fuente natural en cantidades suficientes para su análisis físico y bioquímico detallado. Una solución a este problema ha sido el desarrollo de sistemas de expresión con plásmidos recombinantes diseñados para asegurar la transcripción eficiente de los genes insertados en ellos e introducidos en *E. coli* (13).

Los elementos que constituyen un plásmido de expresión procariótica y que son necesarios para alcanzar un buen nivel de síntesis de una proteína heteróloga son entre otros: un origen de replicación para asegurar la propagación del plásmido, un marcador de selección para su mantenimiento en la bacteria y regiones reguladoras de la expresión del gen de interés como es el caso de un promotor de la transcripción (como los promotores Tac, Trc o pL) y un sitio de unión a ribosoma o región Shine-Dalgarno (complementaria a la subunidad 16S del ARN ribosomal) (Figura 2). En ocasiones, algunos plásmidos portan su propio codón de iniciación para asegurar la traducción, e incluso sitios únicos de restricción que facilitan la inserción del ADNc en la fase de lectura apropiada. Otros plásmidos llevan la información que codifica para el extremo amino o carboxilo de un péptido, lo que produciría una proteína de fusión o híbrida, la cual deberá ser modificada para liberar la proteína de interés (14).

E. coli ha sido y continua siendo el "caballito de batalla" en el campo de la expresión genética. Ningún otro sistema desarrollado ha permitido tanto la expresión de un gran número de productos génicos conocidos en niveles suficientes para su análisis bioquímico, así como la expresión de secuencias codificantes indefinidas (marcos de lectura abierta) en cantidades suficientes para determinar la identidad del producto génico y caracterizar su función (13).

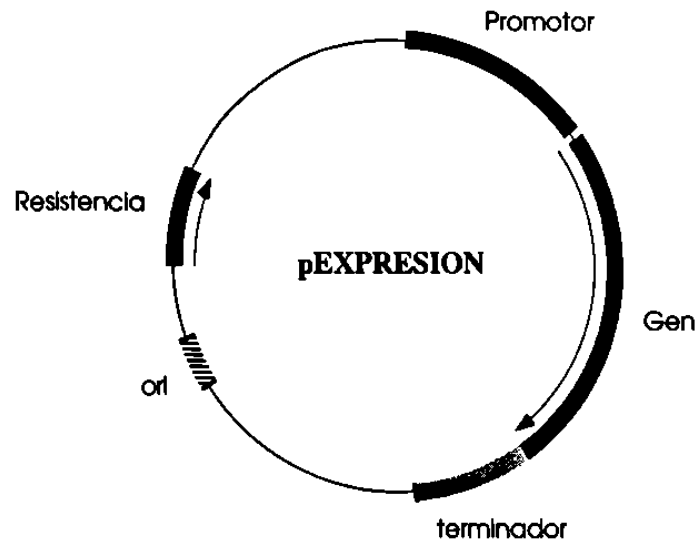


Figura 2. Plásmido Típico de Expresión Procariótica. Estos plásmidos portan algunos elementos necesarios para su replicación (ori), genes de resistencia ó selección, un promotor de la transcripción (Tac, Trc), terminador de la transcripción y el gen que se desea expresar.

En los últimos años ha sido acumulada considerable experiencia sobre los sistemas de expresión en *E. coli*. Frecuentemente se asume que cualquier proteína de tamaño intermedio, no muy hidrofóbica y que no contenga muchos residuos de cisteínas puede ser producida en *E. coli*. Por otro lado, *E. coli* es un hospedero adecuado para un gran número de otras necesidades de expresión. Han sido desarrollados en *E. coli* sistemas de expresión directa, de expresión de proteínas de fusión y de secreción, cada uno de los cuales tiene sus ventajas y desventajas particulares.

Las estrategias de expresión de proteínas de fusión aseguran el inicio de la traducción y frecuentemente permiten evitar los problemas de inestabilidad que pueden ser encontrados con los péptidos pequeños. Además, el alto grado de efectividad de la expresión mediante este sistema, lo hace un método preferido para la generación de inmunógenos. El uso de estos sistemas presenta algunas ventajas en los procesos de purificación, aprovechando la insolubilidad de la proteína de fusión y el patrón de fusión.

El sistema de expresión directa es usualmente el método ideal para la producción de una proteína heteróloga de 100-300 aminoácidos en *E. coli*, con la condición de que dicha

proteína no presente un alto contenido de cisteínas, ya que el ambiente reductor en el citosol de *E. coli* no permite la formación de enlaces disulfuro en este tipo de proteínas, requerida para la obtención de la conformación apropiada de la misma. Sin embargo, este problema puede ser evitado mediante la secreción de la proteína hacia un ambiente oxidante. Algunas ventajas de la secreción son entre otras, la eliminación de residuos de metionina no deseados en el extremo amino terminal, el correcto plegamiento de la proteína secretada y la simplificación de los procesos de purificación (15).

1.3.2 Biosíntesis de la HGHr en *Escherichia coli*

El gen de hGH (16) ha sido clonado y su secuencia nucleotídica ha sido determinada. Este está constituido por cinco exones y cuatro intrones, al igual que otros miembros de la familia génica como el lactógeno placentario (16) y la prolactina (17).

El ADNc se clonó y se utilizó para expresarlo en *E. coli* como proteína de fusión con el producto del gen *trpD*, del operón del triptófano de *E. coli*, lo que resultó en un 3 % de producción de proteína de fusión en relación a la proteína total (18). A la vez se reportó la modificación del extremo 5' del ADNc de hGH mediante el uso de ADN sintético, de tal manera que codificaba únicamente para la proteína madura bajo el control del promotor Lac, con lo que se produjo por vez primera en *E. coli* un polipéptido humano en su forma madura (19).

Para obtener una proteína recombinante correctamente plegada y funcional, se ha recurrido a su producción de tal manera que la proteína madura sea secretada hacia el espacio periplásmico de la bacteria, en donde el ambiente oxidante de este compartimento celular permite la conformación precisa de la proteína. La secreción de HGHr al periplasma se ha logrado siguiendo varias estrategias. Una de ellas consistió en utilizar el ADNc de hGH en fusión con la región que codifica para el péptido señal del gen de la fosfatasa alcalina de *E. coli*, con lo cual se logró la secreción de la proteína madura (20) y

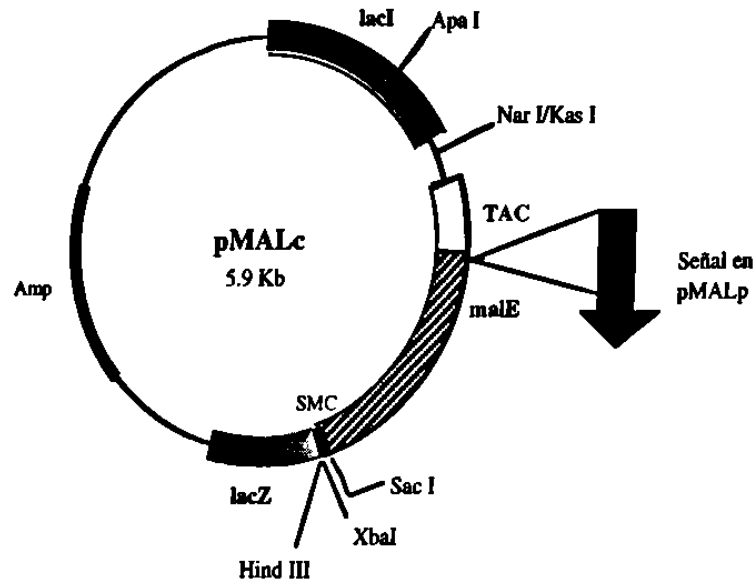
la producción se incrementó cuando se alteraron los codones que codifican para el péptido señal (21). También se ha usado el péptido señal de la proteína de membrana externa (OMP) de *E. coli* para lograr producir una forma madura en periplasma, la cual fue correctamente procesada en el espacio periplásmico produciendo hasta 15 mg de HGhr por L de medio de cultivo (22).

En otra estrategia, el ADNc de hGH fue fusionado a la región codificante para el péptido señal de la enterotoxina II termoestable de *E. coli*, utilizando la inducción del promotor del gen de la fosfatasa alcalina de esta misma bacteria, el cual se encontraba regulando a la proteína de fusión enterotoxina-HGhr. En este sistema las células sintetizaron de 15 a 25 mg de HGhr por L de medio de cultivo, lo que representaba de un 6 a un 10 % de la proteína total, de ésta el 90 % era procesada y secretada al espacio periplásmico (23).

Una alternativa potencial para la producción de proteínas recombinantes es la excreción hacia el medio de cultivo durante la fermentación, ya que esto permite que los procesos de purificación sean más rápidos y eficientes. El uso de la proteína liberadora de la bactericina permitió que la HGhr, la cual había sido secretada al periplasma gracias a la presencia del péptido señal de OMP y bajo el control transcripcional del promotor Tac, fuera excretada hacia el medio de cultivo, con un rendimiento de hasta 70 mg de HGhr por L de medio de cultivo (24).

Las proteínas de fusión fueron los primeros recursos empleados para producir proteínas de mamíferos en *E. coli*. Las razones para emplear proteínas de fusión van desde el evitar la degradación proteolítica por la bacteria hasta facilitar estrategias de purificación sencillas, e incluso dirigir la proteína a diversos compartimentos celulares (25). Algunos de los sistemas de fusión génica permiten diferentes ventajas. Entre éstos tenemos a la proteína de unión a fosfato (PhoS) (26) y la glutatión S transferasa (27, 28). A éstas se le añade la proteína de unión a maltosa (MBP), la cual fue utilizada en este trabajo.

La MBP de *E. coli* es una proteína periplásmica que facilita la difusión de la maltosa y maltodextrinas a través de la membrana externa, induce la respuesta quimiotáctica y permite la translocación del sustrato a través de la membrana citoplásmica. Tiene un péptido señal que permite la secreción de la proteína madura, y que es removido en dicho proceso (29). Se ha aprovechado al gen de la MBP (gen *malE*) para construir vectores de expresión que poseen algunas ventajas para la sobreproducción de proteínas difíciles de expresar en *E. coli*, tales como el uso de las regiones reguladoras de la expresión bastante potentes y propias del vector, señales para el corte proteolítico y subsecuente liberación de la proteína expresada en fusión (30, 31, 32). La serie de plásmidos pMAL portan elementos que permiten la expresión de genes en fusión con MBP. Tienen un fuerte promotor de la transcripción: Tac (33), y las señales del inicio de la traducción del gen *malE*, las cuales permiten la expresión del gen clonado. El gen clonado es integrado hacia el extremo 3' del gen *malE*, gracias a la presencia de un sitio de clonación múltiple. Estos plásmidos expresan una proteína de fusión entre MBP y LacZ. Existe también la opción de un plásmido que además del gen *malE* incluye su péptido señal (pMALp), lo cual permite la secreción de la proteína al periplasma o uno carente de dicho péptido (pMALc) cuya expresión es citoplásmica. Los vectores portan el gen *lacI* que codifica para el represor Lac, el cual mantiene apagada la expresión del promotor Tac, debiéndose utilizar isopropil- β -tiogalactopiranosido (IPTG), un análogo de la galactosa, para desreprimir el promotor e iniciar la transcripción. Estos vectores llevan la señal de reconocimiento para la proteasa factor Xa (fXa), localizada en la región 5' del sitio de clonación múltiple, lo que permite que la MBP sea separada de la proteína de interés (Figura 3). El rendimiento de la expresión observado en estos sistemas es bastante alto y los altos niveles de producción facilitan la purificación de la proteína por métodos convencionales, como la purificación de cuerpos de inclusión en el caso de la acumulación citoplásmica.



Sitio Múltiple de Clonación

SacI KpnI EagI BamHI SmaI

mal E.... TCG AGC TCG GTA CCC GGC CGG GGA TCC ATC GAG GGT AGG CCT
 ILE GLU GLY ARG

EcoRI BamHI XbaI SalI PstI

GAA TTC AGT AAA ACC CTC GAT GGA TCC TCT AGA GTC GAC CTG CAG GCA

HindIII

AGC TTG..... *Lac Z*

Figura 3. Mapa de Restricción de los Plásmidos pMAL. Esta serie de plásmidos permite la sobreexpresión de proteínas en fusión con la proteína de unión a maltosa. El sitio múltiple de clonación facilita la inserción del gen de interés en la región donde se fusionan los genes *malE* y *lacZ*.

1.3.3 Biosíntesis de HGHR en Otros Hospederos

La HGHR ha sido también producida en otros hospederos de tipo bacteriano, así como en levaduras, hongos y células de mamífero. Los rendimientos obtenidos y los niveles de expresión encontrados han sido muy variables. La HGHR ha sido producida en *S. cerevisiae* en donde Tokunaga reportó en 1985 de 1.4 a 4.7 moléculas por célula (2.5 a 8.5 mg/L) (34) y en *Pichia pastoris* se obtuvo la HGHR secretada al medio de cultivo con

niveles de producción de 12.3 mg/L (35). En 1991, Franchi y col. reportó una producción de HGHR hacia el medio de cultivo en *Bacillus subtilis* de 35 mg/L (36).

Por otro lado, varios investigadores han reportado la biosíntesis de HGHR en células de mamífero, sin embargo los rendimientos obtenidos han sido muy bajos, encontrándose por el orden de $\mu\text{g/L}$ (37, 38).

1.4 Purificación de Hormonas del Crecimiento (GHs)

1.4.1 Purificación de GH a partir de su fuente natural

Veinte años atrás, sólo se podía obtener una proteína para su posterior estudio físico y/o bioquímico mediante su aislamiento a partir de su fuente natural. Las proteínas cuya estructura era conocida se encontraban en forma abundante en algún tejido fácilmente obtenible. En el ámbito de las hormonas del crecimiento se han reportado diversas metodologías de aislamiento y purificación a partir de tejido hipofisiario. Inicialmente se emplearon técnicas cromatográficas en columna abierta con una estrategia que usaba varios modos cromatográficos en forma secuencial. Chapman y col. (39) purificaron HGH de 20 kDa a partir de cadáveres humanos combinando la cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-100 y la cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-celulosa. Obtuvieron también un dímero de la HGH de 20 kDa. Wood y col. (40) purificaron BGH de hipófisis empleando inicialmente una extracción y posteriormente cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-celulosa; las fracciones obtenidas se controlaron por CLAR en fase reversa y SDS-PAGE. Rand-Weaver y col. (41) describieron un método rápido y sencillo de aislamiento de GH de hipófisis de rata, el cual se basa en una extracción alcalina y una combinación de una cromatografía de exclusión en Sephadex G-75 y cromatografía de fase reversa. En general, estos métodos

son largos y difíciles de implementar, sin embargo, los recientes avances en CLAR hacen a esta técnica, la opción más adecuada para analizar y/o purificar cualquier compuesto orgánico. Giard-Pasquier y col. (42) emplearon un equipo automatizado diseñado específicamente para aislar proteínas, el cual es una modificación de la CLAR denominada cromatografía de líquidos de proteínas rápida (FPLC). Este equipo se utilizó para purificar prolactina y hormona de crecimiento canina haciendo uso de una combinación de una cromatografía de intercambio aniónico y una de filtración en gel. Pan y col. (43) describieron una metodología en un solo paso que emplea CLAR en una columna de fase reversa para purificar hormonas del crecimiento a partir de hipófisis. Para ello, hicieron uso de una nueva metodología patentada por la compañía Waters de columnas de compresión radial que aumenta la eficacia de la columna cromatográfica.

1.4.2 Purificación de GHs recombinantes (GHR)

Actualmente es posible aislar un gen, ponerlo bajo la regulación de un promotor e introducirlo y expresarlo en un microorganismo, de tal forma que muchas proteínas pueden ser producidas en varios órdenes de magnitud superiores a los niveles en que se encuentran en su tejido específico. A la proteína así producida se le da el calificativo de recombinante.

Un fenómeno frecuente en la producción de proteínas recombinantes es su acúmulo en el citoplasma bacteriano en forma de agregados de monómeros desnaturalizados. A dichos agregados proteicos se les llama cuerpos de inclusión, que se identifican morfológicamente por microscopía electrónica de transmisión (44, 45) y aparecen en el citoplasma de la célula como agregados proteicos amorfos no rodeados por una membrana. Así, se identificaron por primera vez en pacientes con hemoglobina anormal (46, 47). Los cuerpos de inclusión, además de la proteína producida, contienen las cuatro subunidades de la ARN polimerasa, algunas de las proteínas de la membrana externa

(OmpC, OmpF, OmpA), ARN ribosomal 16S y 23S, ADN plasmídico circular y fragmentos del mismo (48). Actualmente se desconoce con certeza como un estado desnaturalizado se genera en las condiciones nativas del interior celular. Mitraki y King (49) proponen que la formación de cuerpos de inclusión proviene de intermediarios en las rutas de plegamiento de la proteína intracelular y no de la proteína nativa o totalmente desplegada. En proteínas que contienen puentes disulfuro, los errores para alcanzar la conformación correcta se han asociado con la formación incorrecta de puentes disulfuro (50), sin embargo el entorno citoplasmático de *E. coli* es reductor (51), por lo que probablemente la formación incorrecta de puentes disulfuro ocurre al contacto con el aire después de la lisis celular en el proceso de purificación. Cuando las células se rompen, los cuerpos de inclusión permanecen como partículas densas que sedimentan a baja velocidad (52). Como resultado de la sedimentación rápida y estabilidad de los cuerpos de inclusión, se ha empleado la purificación preparativa de los mismos y posterior naturalización *in vitro*. En estos casos se vuelve crítico la eficiencia de este paso. La formación de cuerpos de inclusión puede ser estimulada o inhibida según se desee variando la temperatura de crecimiento bacteriano. Así, se ha descrito que si se emplean temperaturas de fermentación mayores de 30°C está favorecida la formación de cuerpos de inclusión, mientras que a temperaturas inferiores se inhibe dicha formación (53, 54). Otros autores también muestran resultados análogos (55, 56, 57, 58).

Langley y col. (59) aprovecharon la formación de cuerpos de inclusión para aislar BGHr expresada en *E. coli*, ya que la encontraron mayoritariamente en la fracción insoluble obtenida después de la lisis celular. Análogamente, Binder y col. (60) aislaron una quimera de BGHr y posteriormente la purificaron por métodos cromatográficos con Sefarosa 6B, DEAE-celulosa y CLAR en fase reversa. Sugimoto y col. (61) aislaron y caracterizaron la hormona del crecimiento de anguila (eGH) recombinante y algunas variantes de la misma a partir de cuerpos de inclusión, realizando una naturalización y cromatografía de intercambio iónico. Estos autores obtuvieron un 95 % de pureza,

analizada por CLAR de filtración en gel y SDS-PAGE. Las variantes se detectaron por CLAR en fase reversa. Se identificaron 5 variantes con ayuda de digestión proteolítica y espectroscopía de masas, las cuales se agruparon en tres tipos: forma desaminada Asp-147, forma sulfóxido de metionina y forma formilada de la metionina N-terminal. Lopatin y col. (62) purificaron HGhr y mutantes de la misma expresadas en *E. coli*.; a partir de cuerpos de inclusión y posterior naturalización, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de quelante metálico. Los autores indican que esta metodología es útil para todas las mutantes de HGhr, ya que es prácticamente independiente de la estructura primaria.

Los cuerpos de inclusión no se forman cuando la proteína expresada se secreta al espacio periplásmico. Dicha secreción no sólo reduce la formación de cuerpos de inclusión sino que facilita el proceso de purificación de la misma. Con esta idea, Klein y colaboradores (63) produjeron BGhr en el espacio periplásmico de *E. coli* hacia en un nivel de 1 a 2 mg/l/DO₅₅₀. La purificación la llevaron a cabo mediante un paso simple y efectivo de choque osmótico y posterior diálisis, cromatografía en DE-52 y CLAR de fase reversa en columna C₈.

1.4.2.1 Purificación HGhr

Olson y col. (64) produjeron HGhr empleando *E. coli* como hospedero y la purificaron a homogeneidad controlada por SDS-PAGE. La Met-HGhr se aisló mediante una lisis celular, eliminación de ácidos nucleicos y componentes de membrana mediante precipitación con polietilenamina, precipitación con sulfato de amonio y una combinación de cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-celulosa), intercambio catiónico (CM-celulosa) y de exclusión (Sephacryl S-200). Además, muestran que la Met-HGhr es biológicamente activa. Flodh (65) produjo HGhr en *E. coli* y la purificó del lisado celular mediante tres columnas de intercambio iónico y una de filtración en gel.

Los avances recientes en CLAR han hecho posible separar proteínas con pequeñas diferencias estructurales. Gellefors y col. (66) emplearon cromatografía de interacciones hidrofóbicas (CIH), cromatografía de fase reversa (CFR), cromatografía de intercambio aniónico (CIA) y cromatografía de filtración en gel (CFG), para separar e identificar variantes de HGH. Analizaron éstas en tres grupos: el primer grupo lo constituyeron agregados de formas recombinantes como dímeros y polímeros, y una forma mutante que carece de los aminoácidos 65 y 66. El segundo grupo comprendió hormonas recombinantes con rupturas proteolíticas en el extremo N-terminal o en la secuencia, como entre la Thr-142 y Tir-143. El tercer grupo fueron formas oxidadas y desaminadas que generan pequeños cambios estructurales. La separación de dímeros o polímeros se realizó por cromatografía de permeación en gel. La HGH y la mutante se separaron por CIH. De forma análoga se analizaron las formas des-Phe, HGH, Met-HGH que tienen 190, 191 y 192 residuos aminoacídicos respectivamente. Según sus tiempos de retención estas variantes son de hidrofobicidad creciente. La CIH también pudo separar la HGH, de la forma "Clip" (ruptura proteolítica Thr-142 y Tir-143, donde se mantienen unidos los dos fragmentos por puentes disulfuro). Los productos de oxidación de las Met-14 y Met-125 por el oxígeno para formar los derivados sulfóxidos de estos aminoácidos (incremento del peso molecular menor del 0.2 %), se pudieron determinar por CFR. La importancia de determinar estos productos es con el fin de llevar un control de calidad exhaustivo de la HGHr utilizada con fines terapéuticos. Las formas desaminadas se analizaron por CIA.

1.5 Producción de Anticuerpos Monoclonales

1.5.1 La Tecnología del Hibridoma y la Producción de Anticuerpos Monoclonales

Köhler y Milstein (1975) iniciaron una nueva era en la investigación inmunológica mostrando que la hibridación de células somáticas puede ser utilizada para generar una línea continua celular (hibridoma) productora de un solo tipo de anticuerpo (monoclonal). Así, la tecnología del hibridoma ha permitido resolver uno de los más grandes problemas que tenían los inmunólogos: la producción rutinaria y masiva de anticuerpos homogéneos.

El desarrollo de la tecnología para la producción de anticuerpos monoclonales por Köhler y Milstein (67) proporcionó una enorme oportunidad de examinar diferentes campos de investigación. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales han sido usados en radioinmunoensayos, ensayos inmunoabsorbentes unidos a enzima (ELISA), inmunocitopatología, citometría de flujo para diagnóstico *in vitro* y en inmunoterapia y diagnóstico de enfermedades humanas *in vivo*. Sin embargo, en el campo de la inmunoterapia, el uso de los anticuerpos monoclonales se encuentra en su fase inicial y promete llegar a ser de gran utilidad, debido a la alta especificidad de reconocimiento y unión selectiva de éstos a antígenos celulares.

Los biotecnólogos han explotado la selectividad y especificidad de los anticuerpos para detectar y purificar varios ligandos, para diagnóstico, tratamiento y desarrollo de vacunas contra un amplio rango de enfermedades, para ensayos de unión a receptores y para reacciones catalíticas.

El uso diagnóstico de los anticuerpos data desde hace cuatro décadas con la introducción de los métodos basados en precipitina. La introducción del radioinmunoensayo (RIA) por Yalow y Berson reveló la extrema sensibilidad alcanzable

con anticuerpos de alta afinidad. Desde entonces, los inmunoensayos rápidos y sensibles han sido aplicados a una amplia variedad de moléculas. Los anticuerpos monoclonales han sido utilizados ampliamente en el diagnóstico. Por otro lado, su uso monoclonales contra epítopes microbianos únicos ha hecho posible la discriminación entre organismos estrechamente relacionados y aún más, contra subtipos de una misma especie. Estos pueden distinguir entre moléculas estrechamente relacionadas: entre morfina y heroína; entre testosterona y esteroides relacionados; y aún entre enantiómeros de una misma molécula. Por otro lado, los estudios farmacocinéticos pueden utilizar anticuerpos monoclonales para monitorear niveles de drogas y sus metabolitos o estudiar la diferencias espaciales entre dos enantiómeros.

Los anticuerpos o antígenos inmovilizados han sido ampliamente utilizados como reactivos de afinidad. Este método presenta baja capacidad de unión y limitada especificidad debido a la calidad de los anticuerpos. Frecuentemente se requieren de eluciones agresivas que causan cambios irreversibles al antígeno o al anticuerpo. Sin embargo, con la introducción de los anticuerpos monoclonales se han podido diseñar columnas con alta capacidad de unión y especificidad, requiriéndose de condiciones de elución moderadas. Hoy en día, las columnas de afinidad están siendo utilizadas en la purificación de compuestos biológicos aislados de cultivo de células recombinantes o de tejidos. Como regla general se necesitan de 50 a 100 g de anticuerpo monoclonal para purificar 1 g de un péptido de bajo peso molecular o 2 a 5 g de proteína.

Los grupos de investigación de Nisonoff y Roitt en 1981 fueron los primeros en proponer el uso de los anticuerpos como vacunas. Los anticuerpos obviamente se unen a los epítopes de los antígenos. Por otro lado, también pueden servir como antígenos por sí mismos, es decir, ser reconocidos por otros anticuerpos, los cuales se unen a sus regiones variables (idiotipos). Estos anticuerpos anti-idiotipos acarrean una imagen interna del antígeno original y por lo tanto pueden elicitar una respuesta de anticuerpos. Algunos de estos anticuerpos anti-idiotipos pueden servir como vacunas provocando una inmunidad

protectora. Las vacunas anti-idiotipo podrían reemplazar a los microbios o toxinas microbianas, las cuales son mas peligrosas para los pacientes. Actualmente se ha reportado el uso de los anticuerpos anti-idiotipo como vacunas contra varios antígenos microbianos como parásitos, bacterias y virus.

Recientemente se han examinado nuevas posibilidades de usos de los anticuerpos, como por ejemplo, la capacidad de unión de éstos a compuestos que representan sustratos enzimáticos. Las interacciones antígeno-anticuerpo obviamente semejan a las interacciones enzima-sustrato en su capacidad y especificidad de unión. Sin embargo, existen diferencias entre estos dos grupos de moléculas. Los anticuerpos interactúan con sus ligandos en configuraciones estables de baja energía, a diferencia de las enzimas que se unen en estados inestables de alta energía. Hoy en día se ha logrado obtener anticuerpos con actividad catalítica sobre algunos compuestos complejos como proteínas y ácidos nucleicos, mediante la obtención de estados de transición adecuados para la actividad catalítica (68).

1.5.2 Producción de Anticuerpos Monoclonales anti-HGH

La tecnología del hibridoma hizo posible la producción de anticuerpos monoclonales contra HGH por primera vez en 1975 por Ivanyi y colaboradores, produciendo líneas celulares de hibridoma secretoras de anticuerpos IgG₁, los cuales presentaron distintas especificidades de unión a la molécula; tal y como se esperaba, algunos de estos presentaban reactividad cruzada contra HPL (69). La obtención de anticuerpos monoclonales anti-HGH ha permitido su utilización en múltiples campos de investigación. Su utilidad como reactivos en inmunoensayos para el análisis de HGH, ha permitido conseguir una mayor especificidad y sensibilidad. Algunos estudios se han enfocado a la búsqueda de anticuerpos monoclonales anti-HGH capaces de distinguir entre la HGH natural y la recombinante. Inicialmente se encontró que las líneas celulares

de hibridomas productoras de anti-HGH obtenidas en el trabajo de Jónsdóttir en 1983 no podían distinguir entre la HGH pituitaria y la metionil-HGH obtenida en bacterias (70). Sin embargo, en el trabajo de Aston y colaboradores en 1985, lograron obtener anticuerpos monoclonales anti-HGH que podían distinguir entre estas dos tipos de hormonas, concluyendo que la metionina del extremo amino terminal de la HGH derivada de bacterias provoca una alteración de la antigenicidad de la hormona sin ningún efecto medible en su bioactividad (71). Los anticuerpos monoclonales han sido usados como herramientas para determinar la topografía antigénica de HGH. En 1989, Mazza y colaboradores encontraron distribuidos en toda la superficie de la molécula diferentes epítopes, los cuales mostraron un dominio único de especificidad a HGH que constituyó un 20 % de la superficie total. Por otro lado, se encontró con una zona de identidad inmunológica entre HGH y HPL, la cual ocupaba el 30 % de la superficie molecular. El resto de la superficie presentó sólo reactividad cruzada parcial con HPL (72). Por otro lado, a partir de datos sobre los diferentes epítopes sobre la HGH y el uso de algoritmos computacionales se han generado modelos estructurales tridimensionales de HGH. Estos estudios sugieren que los datos del mapeo de epítopes puede efectivamente proyectar modelos estructurales y cuando son usados algoritmos predictivos pueden ayudar a generar modelos a baja resolución de una proteína (73). Se han realizado estudios de unión a receptores con ayuda de anticuerpos monoclonales anti-HGH, para elucidar los sitios específicos relacionados en la unión de HGH a su receptor de membrana. Por otro lado, la unión de éstos a regiones específicas de unión a HGH y HPL, después de unirse a sus receptores específicos, producen alteraciones alostéricas en las propiedades de unión de estas hormonas, provocando tanto aumento como decremento de sus actividades biológicas (74). Otra de las aplicaciones de los anticuerpos monoclonales ha sido su uso en los procesos de purificación. Así, ya ha sido descrita la purificación de HGH a partir de tanto extractos pituitarios como extractos de bacterias recombinantes mediante el uso de la cromatografía inmunoabsorbente que emplea anticuerpos

monoclonales adsorbidos en una fase sólida. Con esta técnica se ha logrado la purificación en un sólo paso y con buenos rendimientos (75).

Muchos han sido los campos de empleo de los anticuerpos monoclonales anti-HGH, siendo los más importantes aquellos enfocados a la estructura y actividad biológica de HGH. Por tal motivo, es de gran importancia la implementación de la producción de los mismos con el objetivo apoyar estos estudios.

1.6 Objetivos

El presente trabajo de tesis se ocupó de la estandarización de un conjunto de técnicas en apoyo a los estudios que sobre la HGHR se realizan en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) en el Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L..

1.6.1 Objetivos Generales

- Producir la hormona del crecimiento humana recombinante madura (HGHR) y fusionada a la proteína de unión a maltosa (HGHR-MBPr) en *Escherichia coli*.
- Aislar la HGHR-MBPr y aislar y purificar la HGHR.
- Producir anticuerpos monoclonales contra la HGHR.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Obtener y caracterizar la clona recombinante de *Escherichia coli* TB1 poseedora de pBHX y productora de HGHR, así como la clona recombinante de *Escherichia coli*

TB1 portadora de pMALchGH22K y productora de la proteína de fusión HGH-MBPr.

- Fermentar y analizar ambos sistemas de expresión.
- Evaluar la influencia de variables que pueden afectar el proceso de fermentación de ambos sistemas de expresión.
- Aislar la HGH-MBPr a partir del sistema de expresión de *Escherichia coli* TB1 con pMALchGH22K.
- Aislar la HGHr a partir del sistema de expresión de *Escherichia coli* TB1 con pBHX.
- Purificar la HGHr a partir de un extracto enriquecido, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en su modalidad de fase reversa (CLAR-FR).
- Evaluar del proceso de purificación mediante la determinación de la pureza de HGHr y el porcentaje de recuperación.
- Inmunizar ratones BALB/c con extractos proteicos de HGHr y HGH-MBPr y evaluar la respuesta de anticuerpos en los sueros de los mismos.
- Producir y seleccionar hibridomas productores de anti-HGHr mediante inmunoensayos.
- Clonar los hibridomas productores de HGHr mediante la técnica de dilución limitante.

2

MATERIAL Y MÉTODOS**2.1 Área de Trabajo y Equipo**

El trabajo experimental se desarrolló en los laboratorios de Química Biomolecular y Biotecnología de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica y en el laboratorio de Inmunología Celular del Departamento de Inmunología, en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se utilizó un horno de microondas MA-857M (*GoldStar*), microcentrífugas modelos 5402 y 5415 (*Eppendorf*), una fuente de poder 200/2.0 (*Biorad*), un agitador de tubos Maxi Mix (*Barntead/Termolyne*), una placa agitadora con control de temperatura marca PC320 (*Corning*), un ultracongelador So-Low (*Enviromental Equipment*) y una campana de flujo laminar (*Labconco Corporation*), una balanza digital 1206MP (*Sartorius*), un evaporador y concentrador 78100-00 (*Labconco Corporation*).

El procesamiento de datos fue realizado en una computadora modelo Power Macintosh 6100/66 (*Apple Computer, Inc.*). Se utilizó como procesador de textos Microsoft Word versión 5.1a (© 1987-1992 *Microsoft Corporation*), procesadores de gráficos Microsoft Power Point Versión 3.0 (© 1987-1992 *Microsoft Corporation*), *Adobe Photoshop Limited Edition 2.5.1* (© 1989-1993 *Adobe Systems Incorporated*) y *UMAX Scan* (© 1990-1991 *UMAX Scanner Driver, Impact Research Inc.*).

Los programas computacionales de Biología Molecular utilizados fueron DNA Strider™ 1.1 (© Ch. Marck and C.E.A 1989 Service de Biochimie-Département de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE) y MacPlasmap versión 1.82 (© 1988-1990 Jingdong Liu, Biology Department, University of Utah, Salt Lake City, UT 84112. EUA).

2.2 Métodos

2.2.1 Estrategia General

Para conseguir los objetivos planteados en este proyecto se propuso la estrategia general experimental que se muestra en la figura 4.

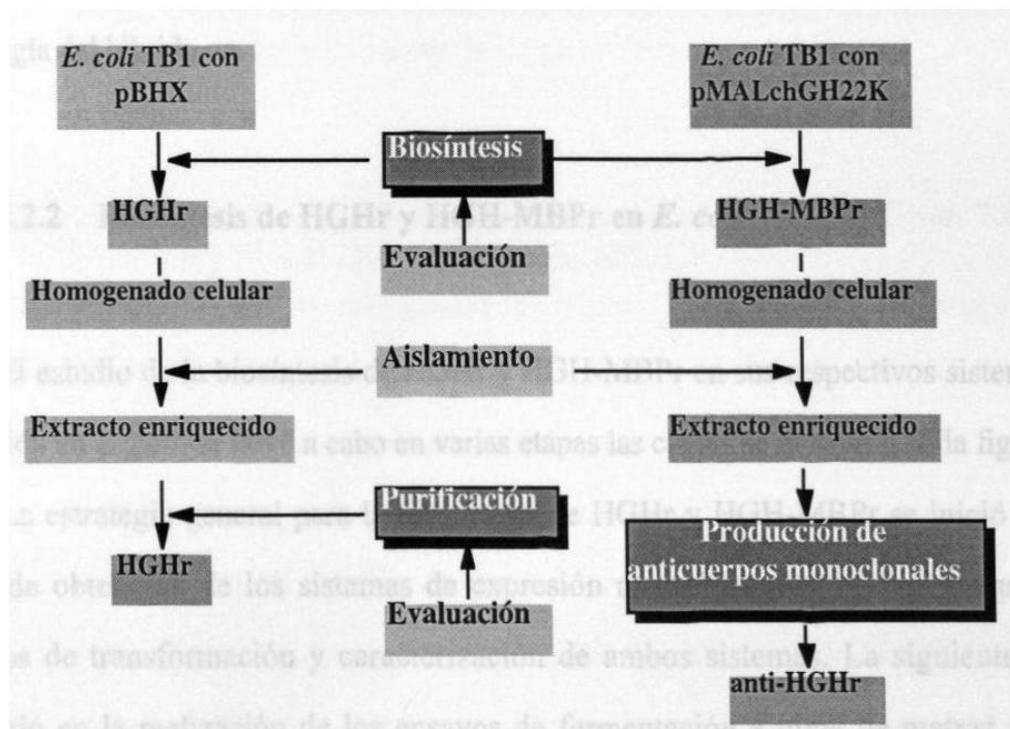


Figura 4. Estrategia General. Se muestran las partes que constituyen el proyecto experimental: biosíntesis, purificación y producción de anticuerpos monoclonales y sus relaciones entre cada una de ellas.

Los sistemas de expresión de *E. coli* pBHX (productor de HGHR) y *E. coli* pMALchGH22K (productor de HGH-MBPr) obtenidos se utilizaron para llevar a cabo los ensayos de fermentación para la biosíntesis de las proteínas recombinantes. Estos ensayos se analizaron mediante técnicas de análisis de proteínas y se evaluó en ellos, la influencia de variables en los procesos de fermentación. De ambos sistemas de expresión se prepararon homogenados celulares, a partir de los cuales se llevó a cabo un proceso de aislamiento de las proteínas recombinantes para la obtención de extractos enriquecidos. El extracto enriquecido en HGHR obtenido se utilizó para la purificación de la misma mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en su modalidad de fase reversa y se realizó además, una evaluación de todo el proceso de purificación. En la producción de anticuerpos anti-HGHR se empleó el extracto enriquecido de HGH-MBPr y otros extractos proteicos con HGHR como antígenos durante el esquema de inmunización de los ratones, y los ensayos de fusión celular se realizaron mediante la tecnología del hibridoma.

2.2.2 Biosíntesis de HGHR y HGH-MBPr en *E. coli*

El estudio de la biosíntesis de HGHR y HGH-MBPr en sus respectivos sistemas de expresión en *E. coli*, se llevó a cabo en varias etapas las cuales se muestran en la figura 5.

La estrategia general para la biosíntesis de HGHR y HGH-MBPr se inició con la etapa de obtención de los sistemas de expresión recombinantes, la cual incluyó los ensayos de transformación y caracterización de ambos sistemas. La siguiente etapa consistió en la realización de los ensayos de fermentación a nivel de matraz para la producción de las proteínas recombinantes y en el análisis cualitativo y cuantitativo de las mismas mediante técnicas de análisis de proteínas. Por último, se llevó a cabo una evaluación estadística de la influencia de ciertas variables involucradas en los procesos de fermentación para ambos sistemas.

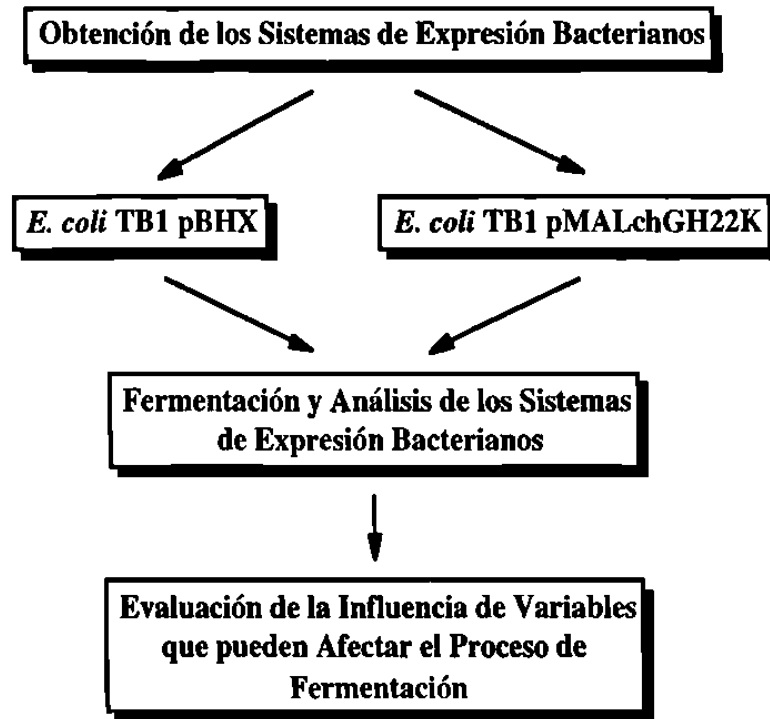


Figura 5. Estrategia para la Biosíntesis. La figura muestra las etapas para el estudio de la biosíntesis de GHr y GH-MBPr. Estas etapas son la obtención, fermentación y análisis de los sistemas de expresión y la evaluación de la influencia de variables en los procesos de fermentación.

2.2.2.1 Ensayos de Transformación y Caracterización de *E. coli* TB1 con pBHX y *E. coli* TB1 con pMALchGH22K

Los ensayos de transformación y caracterización de ambos sistemas de expresión se realizaron siguiendo la estrategia experimental que se muestra en la figura 6.

Los plásmidos de expresión previamente caracterizados con enzimas de restricción se utilizaron para la transformación de bacterias calcio-competentes *E. coli* cepa TB1 mediante una técnica que se describe posteriormente. Las clonas recombinantes obtenidas se propagaron y clonaron para posterior caracterización mediante la extracción del ADN plasmídico y posterior digestión de éste con enzimas de restricción. Los fragmentos de restricción correspondientes se analizaron por electroforesis en gel de agarosa y mediante la comparación de los patrones de restricción se determinó la identidad de plásmido

recombinante. Las clonas recombinantes caracterizadas se utilizaron posteriormente para llevar a cabo los ensayos de fermentación.

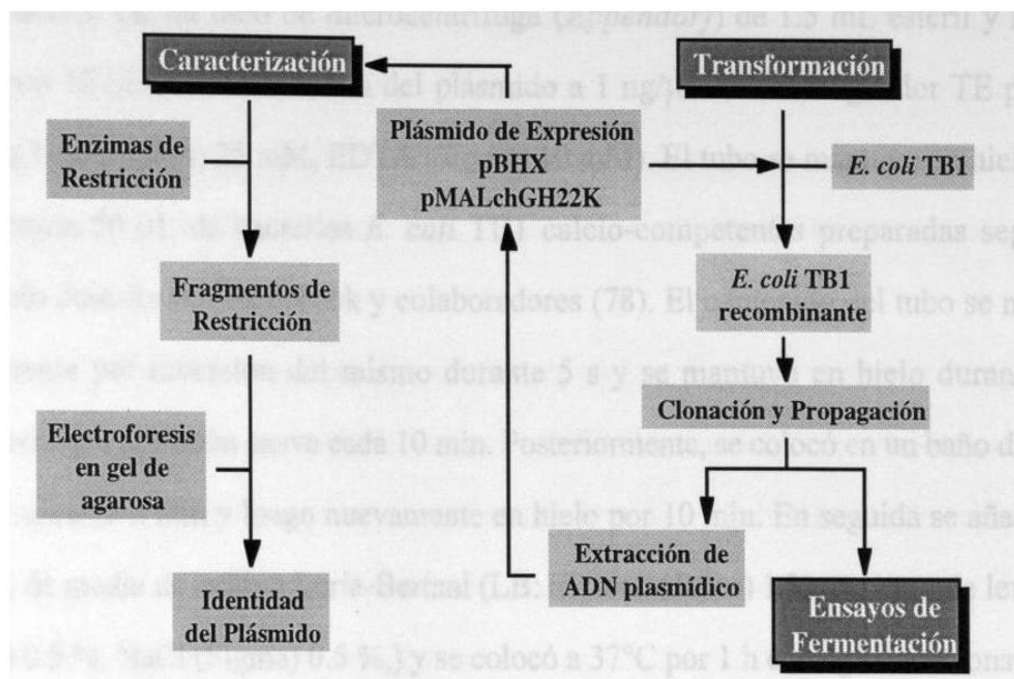


Figura 6. Estrategia de Transformación y Caracterización de los Sistemas de Expresión. Se muestran las etapas de transformación de *E. coli* con los plásmidos, la clonación, propagación y caracterización de las clonas recombinantes.

En los ensayos de transformación se utilizaron los plásmidos recombinantes pBHX (*Centre de Biochemie et de Biologie Moléculaire du CNRS, Marsella, Francia*) y pMALchGH22K (*Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, ULIEG*) y la cepa TB1 de *Escherichia coli* (*INVITROGEN*) como microorganismo hospedero, los cuales fueron proporcionados por el Laboratorio de Biotecnología (*ULIEG*). Dichos plásmidos fueron obtenidos a partir de sus respectivas clonas recombinantes almacenadas a -70°C en glicerol (*Sigma*) al 50 %, mediante el método de extracción de ADN plasmídico reportado por Sambrook y colaboradores (77). Además, se determinó la calidad del ADN plasmídico extraído mediante la relación de absorbancias ($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$) medidas en un espectrofotómetro UV/Vis (*Beckman, DU70*).

El ensayo de transformación de *E. coli* TB1 con cada uno de los plásmidos recombinantes anteriores se llevó a cabo empleando el procedimiento que se describe a continuación. En un tubo de microcentrífuga (*Eppendorf*) de 1.5 mL estéril y frío se añadieron 10 μ L de una solución del plásmido a 1 ng/ μ L en amortiguador TE pH 8.0 (Trisma base (*Sigma*) 25 mM, EDTA (*Sigma*) 10 mM). El tubo se mantuvo en hielo y se adicionaron 50 μ L de bacterias *E. coli* TB1 calcio-competentes preparadas según el protocolo descrito por Sambrook y colaboradores (78). El contenido del tubo se mezcló suavemente por inversión del mismo durante 5 s y se mantuvo en hielo durante 1 h realizando una agitación suave cada 10 min. Posteriormente, se colocó en un baño de agua a 37°C durante 2 min y luego nuevamente en hielo por 10 min. En seguida se añadieron 300 μ L de medio de cultivo Luria-Bertani (LB: triptona (*Difco*) 1 %, extracto de levadura (*Difco*) 0.5 %, NaCl (*Sigma*) 0.5 %, y se colocó a 37°C por 1 h con agitación constante a 250 rpm. La mezcla anterior se distribuyó en una caja de Petri con medio de cultivo agar LB con ampicilina (*Sigma*) a 100 μ g/mL con la ayuda de una asa de vidrio estéril. La caja inoculada se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min y posteriormente se incubó de forma invertida a 37°C durante 16 h. En forma paralela se llevó a cabo un control de la transformación empleando un control negativo con amortiguador TE pH 8.0 en lugar del ADN plasmídico y un control positivo usando el plásmido pTrcHis superenrollado a 1 ng/ μ L en amortiguador TE pH 8.0.

De las colonias bacterianas obtenidas de la transformación para cada uno de los sistemas de expresión, se tomaron algunas para propagación y caracterización. La propagación se llevó a cabo inoculando cada colonia en tubo estériles con 2 mL de medio de cultivo líquido LB con ampicilina a 100 μ g/mL y se incubaron durante 18 h a 37°C con agitación constante a 250 rpm. Posteriormente, se realizó la extracción del ADN plasmídico mediante la técnica de lisis alcalina reportada por Sambrook y colaboradores (77), utilizando 1 mL del cultivo propagado. El ADN plasmídico extraído se analizó por espectrofotometría, para determinar su concentración y calidad.

La caracterización de la clonas recombinantes de *E. coli* pBHX y de *E. coli* pMALchGH22K se realizó mediante digestión de los plásmidos con enzimas de restricción empleando 1 µg del ADN plasmídico (calidad de 1.9) extraído. Las condiciones de reacción de las digestiones enzimáticas se realizaron empleando los amortiguadores y las recomendaciones señaladas por los proveedores (*GIBCO*, *BRL*). Estas se realizaron en un volumen final de 10 µL empleando 10 U de enzima en cada digestión. La incubación se realizó a 37°C durante 2 h.

La caracterización de la clona recombinante de *E. coli* pBHX se realizó inicialmente con una digestión doble empleando las enzimas *Xho* I y *Hind* III, para la comprobación de la presencia del fragmento correspondiente al ADNc de hGH. Posteriormente, se realizaron otras digestiones enzimáticas empleando las enzimas *Ssp* I, *Hinc* II, *Hind* III, *Xba* I-*Hind* III para hacer una caracterización completa del plásmido. La razón de utilizar estas enzimas para la caracterización fue en base a la secuencia del ADNc de hGH insertado en este plásmido, ya que no se conoce la secuencia completa del plásmido recombinante (Anexo 2). Por lo tanto, esta caracterización consistió sólo en determinar los tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos en las digestiones.

En el caso del sistema de expresión de *E. coli* pMALchGH22K inicialmente se realizó una digestión doble con las enzimas *Xba* I y *Hind* III para una caracterización parcial. Posteriormente, se realizaron otras digestiones enzimáticas empleando las enzimas *Apa*L I, *Pvu* II, *Hind* III, *Bam*H I-*Hind* III para hacer una caracterización completa del plásmido.

Las digestiones enzimáticas se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (*Sigma*) al 0.8 % en amortiguador TBE pH 8.0 (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM) empleando 4 µL de la reacción. El amortiguador de elución electroforética fue TBE pH 8.0. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (*Sigma*) 2 mg/L en amortiguador TBE pH 8.0 durante 5 min. En seguida el gel se destiñó en agua destilada durante 5 min para la observación del mismo en un transiluminador de UV (*Fotodyne*).

La caracterización del plásmido pMALchGH22K se basó en la comparación del mapa teórico de restricción practicado a su secuencia nucleotídica con la ayuda del programa computacional *DNA Strider* (Anexo 3) y los resultados del análisis de los fragmentos de restricción obtenidos en cada una de las digestiones practicadas. En la tabla I se muestran las enzimas empleadas para la caracterización, así como los fragmentos teóricos obtenidos del análisis computacional del plásmido.

Tabla I. Análisis de Restricción del pMALchGH22K. Se muestran las enzimas utilizadas en las digestiones y fragmentos teóricos obtenidos del análisis computacional.

Enzimas de Restricción	Fragmentos de Restricción (pb)
<i>Hind</i> III	6681
<i>Xba</i> I y <i>Hind</i> III	6113 y 572
<i>Bam</i> H I y <i>Hind</i> III	6077 y 608
<i>Pvu</i> II	2682, 1678, 1612, 497, 123 y 93
<i>Apa</i> L I	2826, 1285, 1246, 830 y 498

pb: pares de bases

2.2.2.2 Ensayos de Fermentación de Clonas Recombinantes de *E. coli*

Los ensayos de fermentación de ambos sistemas de expresión se realizaron siguiendo la estrategia experimental que se muestra en la figura 7.

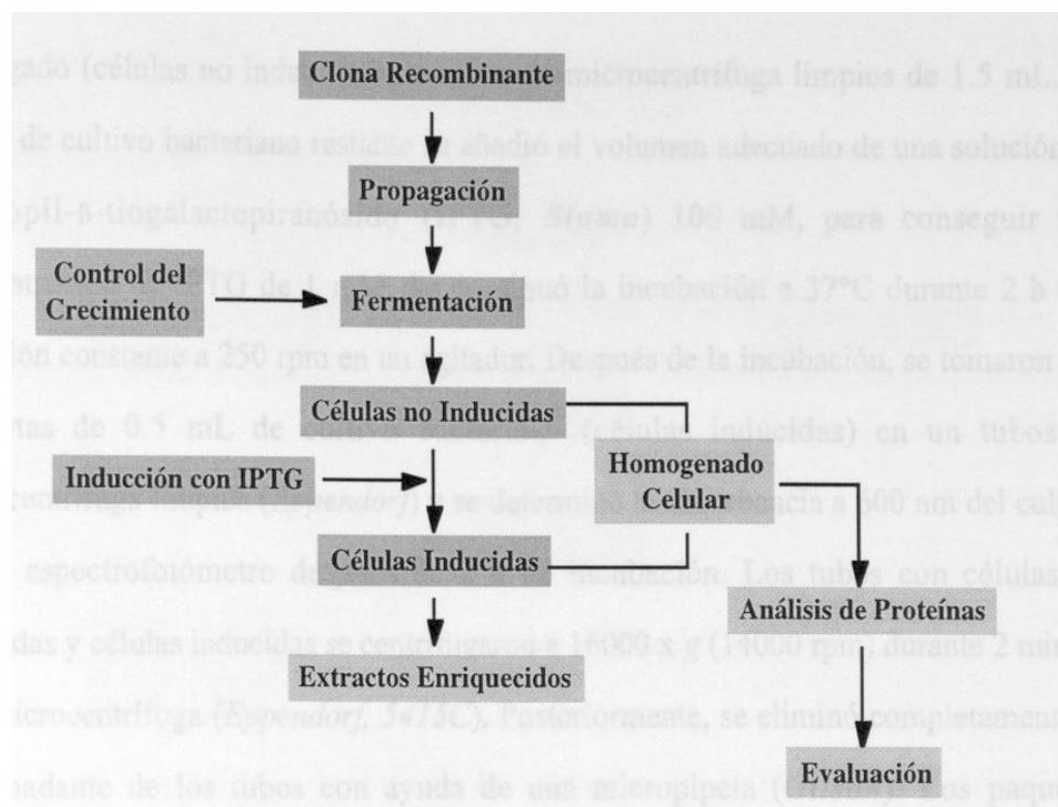


Figura 7. Estrategia para los Ensayos de Fermentación. Se muestran las etapas de la fermentación iniciando con la propagación de la clona recombinante de *E. coli*, inducción de la biosíntesis de la proteína recombinante durante la fermentación y análisis del sistema de expresión.

Los ensayos de fermentación de ambos sistemas de expresión se realizaron siguiendo el procedimiento que a continuación se describe. La propagación de la clona recombinante se realizó en un tubo estéril con 2 mL de medio de cultivo líquido LB y ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el cual se inoculó con una colonia bacteriana. Se incubó el tubo de cultivo a 37°C durante 18 h con agitación constante a 250 rpm en un agitador con temperatura y agitación controlada (*LAB-LINE*). Posteriormente se inoculó un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 25 mL del medio de cultivo líquido LB y ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con 0.25 mL del cultivo propagado. Se incubó a 37°C con agitación constante a 250 rpm en un agitador y se realizó un seguimiento del crecimiento bacteriano en un espectrofotómetro a 600 nm hasta obtener un valor de absorbancia de aproximadamente 0.4 utilizando como blanco el medio de cultivo LB y ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sin inocular. En ese instante, se tomaron dos alícuotas de 1 mL del cultivo

propagado (células no inducidas) en tubos de microcentrífuga limpios de 1.5 mL. Al medio de cultivo bacteriano restante se añadió el volumen adecuado de una solución de isopropil- β -tiogalactopiranosido (IPTG, *Sigma*) 100 mM, para conseguir una concentración de IPTG de 1 mM. Se continuó la incubación a 37°C durante 2 h con agitación constante a 250 rpm en un agitador. Después de la incubación, se tomaron dos alícuotas de 0.5 mL de cultivo bacteriano (células inducidas) en un tubos de microcentrífuga limpios (*Eppendorf*) y se determinó la absorbancia a 600 nm del cultivo en un espectrofotómetro después de 2 h de incubación. Los tubos con células no inducidas y células inducidas se centrifugaron a 16000 x g (14000 rpm) durante 2 min en una microcentrífuga (*Eppendorf, 5415C*). Posteriormente, se eliminó completamente el sobrenadante de los tubos con ayuda de una micropipeta (*Gilson*). Los paquetes celulares de cada alícuota se resuspendieron en las soluciones adecuadas para posterior análisis de proteínas totales por el método de Bradford (79) y separación de los homogenados celulares por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

2.2.2.3 Análisis de los Sistemas de Expresión Bacterianos Recombinantes

El análisis de los sistemas de expresión bacterianos se realizó siguiendo la estrategia experimental que se muestra en la figura 8.

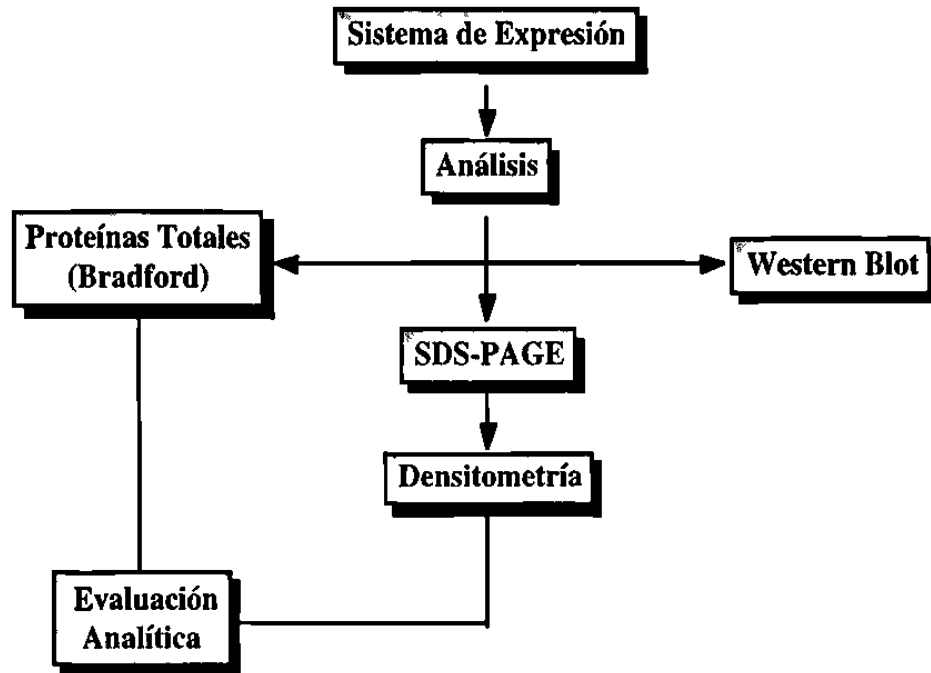


Figura 8. Estrategia de Análisis de los Sistemas de Expresión. Se muestran las técnicas utilizadas para el análisis de los sistemas de expresión: determinación de proteínas totales y análisis densitométrico de homogenados celulares separados por SDS-PAGE, los cuales se utilizaron su vez para la evaluación analítica de los sistemas. La detección de las proteínas recombinantes se lleva a cabo por Western-Blot.

El análisis de la biosíntesis de las proteínas recombinantes en los sistemas de expresión evaluados se realizó por espectrofotometría determinando proteínas totales por el método de Bradford. Además, se determinó el porcentaje de las proteínas recombinantes (HGHR y HGH-MBPr) mediante análisis densitométrico de los homogenados celulares separados en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes teñidos con Azul de Coomassie. Por otro lado, se calculó la producción de HGHR y HGH-MBPr en mg/L de cultivo bacteriano. La detección de HGHR y HGH-MBPr se realizó empleando la técnica de Western-Blot.

2.2.2.3.1 Determinación de Proteínas Totales

La cuantificación de proteínas totales en los homogenados celulares se realizó por el método de Bradford. Los paquetes celulares de células no inducidas y células inducidas

se resuspendieron en 50 y 100 μL de amortiguador de lisis (amortiguador de fosfatos (*Sigma*) 10 mM, pH 7.0, NaCl 30 mM, Tween 20 (*SERVA*) 0.25 %, β -mercaptoetanol 10 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0), respectivamente. La resuspensión se realizó con la ayuda de un vortex () durante 5 min. Las muestras se sometieron a cuatro ciclos de congelamiento en nitrógeno líquido (*Unión Carbide, 35VHC*) y descongelamiento a 37°C en un baño de temperatura controlada (*Precision, 182*), antes del análisis de proteínas totales. Se tomaron alícuotas de 2 a 10 μL de la suspensión para dicho análisis. Se realizó una recta de calibración con una solución estándar de albúmina sérica bovina (*Sigma*) 0.5 mg/mL en NaCl (*Sigma*) 150 mM. Se empleó un intervalo de concentraciones en la recta de calibración de 1 a 15 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras así como los estándares se prepararon por duplicado. La detección se realizó en un espectrofotómetro a 595 nm. La recta de calibración empleada en la determinación de proteínas totales, se calculó por el método de mínimos cuadrados utilizando una computadora (*Macintosh LC III*) y el programa Microsoft Excel.

2.2.2.3.2 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE) y Análisis Densitométrico

La separación de proteínas de los homogenados celulares se llevó a cabo en un gel discontinuo de poliacrilamida de dimensiones de 14 cm x 17 cm x 1.5 mm utilizando un gel separador de acrilamida (*Sigma*) al 12 % y un gel concentrador de acrilamida al 4 %. Los paquetes de células no inducidas e inducidas se resuspendieron en 50 y 100 μL de amortiguador de muestra para electroforesis (Trizma base (*Sigma*) 125 mM, SDS (*Sigma*) 4.1 %, glicerol (*Sigma*) 20 %, β -mercaptoetanol (*Sigma*) 2 %, azul de bromofenol (*Sigma*) 0.001 %, pH 6.8) respectivamente. Las muestras se calentaron 5 min a 100°C en una placa de calentamiento (*Thermolyne, 17600*) y posteriormente se centrifugaron a 16000 x g (14000 rpm) a temperatura ambiente durante 1 min en una microcentrífuga, antes de cargarse en el gel. Se utilizó un marcador de peso molecular para

proteínas (Dalton Mark VII-L, *Sigma*) en el intervalo de 14 a 70 kDa, para la caracterización de la banda de HGhr y HGH-MBPr en los homogenados celulares. La electroelución del gel se realizó con una fuente de voltaje (*BRL, 250*) empleando un voltaje inicial de 100 volts hasta que las muestras penetraron al gel concentrador 1 cm aproximadamente y posteriormente un voltaje de 150 volts hasta la salida del colorante. El amortiguador de electroelución fue Tris base 25 mM, glicina 250 mM y SDS 1 % pH 8.3.

El gel de proteínas se reveló utilizando una técnica de la coloración rápida con azul de Coomassie (*Sigma*). El gel se colocó en un contenedor de vidrio y se cubrió con un volumen suficiente de solución fijadora (metanol 50 % v/v, ácido acético 10 % v/v en agua Milli-Q), se mantuvo en agitación constante a 100 rpm durante 15 min. Después se retiró la solución fijadora y se añadió la solución colorante de Coomassie (Azul brillante de Coomassie R-250 0.5 % p/v, metanol 50 % v/v, ácido acético 10 % v/v, en agua Milli-Q) y se agitó a 100 rpm durante 20 minutos. En seguida se retiró la solución colorante y se añadió la solución fijadora anteriormente utilizada para retirar los restos de la misma, se agitó 1 min y se retiró. La decoloración del gel se realizó con la adición de una solución decolorante (metanol 5 % v/v, ácido acético 7 % v/v, en agua Milli-Q) agitando a 100 rpm durante 15 min. La decoloración se realizó con cambios periódicos de la solución decolorante, hasta que se observó el gel con bandas azules de proteínas sobre un fondo claro. Se secó sobre papel celofán durante 1 h a 60°C en condiciones de alto vacío en un secador de geles (*LABCONCO, 436-0100*).

El análisis densitométrico de los geles se llevó a cabo mediante la medición de la intensidad del color de las bandas obtenidas en los homogenados celulares y la determinación del porcentaje relativo para cada una de ellas. El equipo empleado fue un densitómetro Zeineh Soft Laser (Scanning Densitometer, Model SLR-2D/ID, *Biomed Instruments, Inc.*) con Zeineh Programs Universal Software (*Advanced American Biotechnology Biomed VGA Programs*). El programa empleado para iniciar el análisis fue

el "*Laser 1D Scanning Main Program*". Se indicó inicialmente la longitud del carril del gel a analizar, para posteriormente iniciar la calibración, la cual se realizó ajustando la densidad óptica a 0 de absorbancia colocando el rayo láser en medio de dos carriles (ausencia de proteínas) y empleando el botón "ZERO" en el equipo "Zeineh Soft Laser Densitometer". Posteriormente se ajustó a 100 de absorbancia con el botón "GAIN", colocando el rayo láser sobre la banda más intensa del carril (este punto se ajustó de 80 a 90 para evitar problemas en caso de que existiera una banda más intensa de la que se ha considerado). Para realizar el análisis se ubicó el láser al inicio del carril y se seleccionó la opción "Scan and Save Report". Al realizar esta operación el láser automáticamente pasó a lo largo del carril, registró la intensidades de las bandas y desplegó un reporte (densitograma con los valores de áreas y porcentajes relativos de cada uno de los picos). Los datos se grabaron en el programa "*Expanded and View Process 1 Data*", con el cual se procesaron los datos e imprimieron los resultados y densitogramas.

2.2.2.3.3 Evaluación Analítica del Sistema de Expresión

En la evaluación de los sistemas de expresión, se realizaron los siguientes cálculos:

- La concentración de proteínas en la alícuota de muestra (PA), se calculó por medio de la interpolación de la absorbancia en la recta de calibración.
- Las proteínas totales en el cultivo bacteriano expresado en µg/mL (PT), se calcularon empleando la siguiente ecuación:

$$PT = \frac{(PA - V_2)}{V_1} \bullet V_3$$

- V_1 Volumen de la alícuota analizada (mL)
 V_2 Volumen de resuspensión del paquete celular (mL)
 V_3 Volumen de muestra de medio de cultivo (mL)

- La cantidad de HGHR expresada en mg/L de medio de cultivo, se calculó empleando la ecuación:

$$HGHR = \frac{\%HGHR \cdot PT}{100}$$

% HGHR Porcentaje de HGHR expresada (Porcentaje de la banda de HGHR con respecto a las proteínas totales determinadas por densitometría)

Todos los cálculos anteriores se realizaron utilizando una computadora (*Macintosh LC III*) y el programa Microsoft Excel.

2.2.2.3.5 Inmunodetección

La detección de la HGHR y HGH-MBPr se realizó por medio de un ensayo de inmunoelectrotransferencia sobre membrana de nitrocelulosa. En este ensayo se analizaron homogenados de células no inducidas y de células inducidas de ambos sistemas de expresión. Se inició con la separación de dichos homogenados celulares siguiendo el procedimiento descrito en el punto 2.2.2.3.2 empleando de 10 a 15 µg de proteína total. Posteriormente, parte del gel de separación (aquél que contiene el marcador de peso molecular y algunas muestras) se tiñó con la técnica de Azul de Coomassie y el resto del gel que contenía las muestras a analizar se utilizó en la electrotransferencia. Antes de iniciar ésta, tanto el gel como la membrana de nitrocelulosa así como el papel filtro, se impregnaron durante 15 min en amortiguador de electrotransferencia. La electrotransferencia se realizó sobre una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (*Biorad*) durante 2 h a 120 V en amortiguador de electrotransferencia utilizando el equipo de electrotransferencia (*Biorad*). Posteriormente, la membrana se colocó en un recipiente con amortiguador PBS pH 7.4 (con leche descremada (*Sveltys*) 5 % p/v durante 1 h a 37°C y agitación constante a 50 rpm. En

seguida, se eliminó la solución anterior y la membrana se lavó con amortiguador PBS pH 7.4 con Tween 20 0.1 % v/v a temperatura ambiente y agitación constante a 50 rpm durante 10 min. El procedimiento de lavado se realizó tres veces. La membrana se sumergió en una solución con el anticuerpo primario, el cual fue un antisuero policlonal anti-HGH desarrollado en conejo (*Sigma*) a una dilución de 1:2000 en amortiguador PBS pH 7.4 con Tween 20 0.1 % v/v y leche descremada 1 % p/v. La incubación con este anticuerpo se realizó durante 2 h a temperatura ambiente y agitación constante a 50 rpm. En seguida, se eliminó la solución anterior y la membrana se lavó con amortiguador PBS pH 7.4 con Tween 20 0.1 % v/v a temperatura ambiente y agitación constante a 50 rpm durante 10 min. El procedimiento de lavado se realizó tres veces. Posteriormente, la membrana se sumergió en una solución con el anticuerpo secundario conjugado, el cual fue un antisuero anti-IgG de conejo desarrollado en cabra conjugado a fosfatasa alcalina (*Sigma*) a una dilución de 1:1000 en amortiguador PBS pH 7.4 con Tween 20 0.1 % v/v y leche descremada 1 % p/v. La incubación con este anticuerpo se realizó durante 2 h a temperatura ambiente y agitación constante a 50 rpm. En seguida, se eliminó la solución anterior y la membrana se lavó tres veces con amortiguador PBS pH 7.4 con Tween 20 0.1 % v/v a temperatura ambiente y agitación constante a 50 rpm durante 10 min. La membrana posteriormente, se reveló con 10 mL de una solución con los sustratos cromogénicos, la cual contenía 66 μ L de nitroazul de tetrazolio (NBT) al 5 % p/v y 33 μ L de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) al 5 % p/v en amortiguador de fosfatos alcalino (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 100 mM pH 9.5). Esta solución se añadió a la membrana y se agitó moderadamente hasta la aparición de las bandas de interés. La detención de la reacción se llevo a cabo eliminado la solución de revelado y la adición de agua Milli-Q a la membrana.

2.2.2.4 Evaluación de la Influencia de Variables en la Fermentación de los Sistemas de Expresión Recombinantes

2.2.2.4 Evaluación de la Influencia de Variables en la Fermentación de los Sistemas de Expresión Recombinantes

Para el estudio de la influencia de variables que pueden afectar el proceso de fermentación de las cepas recombinantes de *E. coli*, se realizaron ensayos empleando diferentes condiciones de fermentación. Las variables estudiadas fueron la concentración de glucosa en el medio de cultivo (% Glc.), la densidad óptica del cultivo bacteriano al inicio de la inducción (D.O.) y el tiempo de inducción (T.I.). La concentración de IPTG se mantuvo constante en 1 mM en todos estos ensayos. En la tabla II, se muestran los diferentes valores de las variables empleadas en cada uno de los ensayos de fermentación evaluados. Cada uno de los ensayos de fermentación se realizaron por triplicado.

Tabla II. Variables de Fermentación para los Sistemas de Expresión. Se muestran los diferentes ensayos con los valores empleados para cada una de las variables evaluadas.

Ensayo	% Glc.	D.O. a 600 nm	T.I. (h)
1 (LB/0.4)	0.0	0.4	2, 3, 5
2 (LB/0.5)	0.0	0.5	2, 3, 5
3 (LBG/0.4)	0.2	0.4	2, 3, 5
4 (LBG/0.5)	0.2	0.5	2, 3, 5

% Glc. Concentración de glucosa en el medio de cultivo
 D.O. Densidad óptica medida a 600 nm en el cultivo bacteriano al inicio de la inducción
 T.I. Tiempo de inducción en horas
 LB Medio de cultivo Luria Bertani
 LBG Medio de cultivo Luria Bertani con glucosa

En cada ensayo se determinó la cantidad de proteínas totales y el porcentaje relativo de la proteína recombinante (HGHR o HGH-MBPr) en los homogenados celulares. Además, se calculó la producción del sistema de expresión en mg/L de medio de cultivo. Se calculó la media y desviación estándar de los valores, además del coeficiente de variación en cada ensayo evaluado.

Para el estudio de la influencia de variables que pueden afectar el proceso de fermentación de las cepas recombinantes de *E. coli*, se realizaron ensayos empleando diferentes condiciones de fermentación. Las variables estudiadas fueron la concentración de glucosa en el medio de cultivo (% Glc.), la densidad óptica del cultivo bacteriano al inicio de la inducción (D.O.) y el tiempo de inducción (T.I.). La concentración de IPTG se mantuvo constante en 1 mM en todos estos ensayos. En la tabla II, se muestran los diferentes valores de las variables empleadas en cada uno de los ensayos de fermentación evaluados. Cada uno de los ensayos de fermentación se realizaron por triplicado.

Tabla II. Variables de Fermentación para los Sistemas de Expresión. Se muestran los diferentes ensayos con los valores empleados para cada una de las variables evaluadas.

Ensayo	% Glc.	D.O. a 600 nm	T.I. (h)
1 (LB/0.4)	0.0	0.4	2, 3, 5
2 (LB/0.5)	0.0	0.5	2, 3, 5
3 (LBG/0.4)	0.2	0.4	2, 3, 5
4 (LBG/0.5)	0.2	0.5	2, 3, 5

% Glc. Concentración de glucosa en el medio de cultivo

D.O. Densidad óptica medida a 600 nm en el cultivo bacteriano al inicio de la inducción

T.I. Tiempo de inducción en horas

LB Medio de cultivo Luria Bertani

LBG Medio de cultivo Luria Bertani con glucosa

En cada ensayo se determinó la cantidad de proteínas totales y el porcentaje relativo de la proteína recombinante (HGHR o HGH-MBPr) en los homogenados celulares. Además, se calculó la producción del sistema de expresión en mg/L de medio de cultivo. Se calculó la media y desviación estándar de los valores, además del coeficiente de variación en cada ensayo evaluado.

La evaluación de la influencia de las variables en la fermentación se realizó mediante el análisis de los valores de porcentajes relativos de HGHR o HGH-MBPr y de producción (mg/L de cultivo) encontrados en cada uno de los ensayos. En dicho análisis

La evaluación de la influencia de las variables en la fermentación se realizó mediante el análisis de los valores de porcentajes relativos de HGHR o HGH-MBPr y de producción (mg/L de cultivo) encontrados en cada uno de los ensayos. En dicho análisis se empleó una prueba *t* de Student para analizar diferencias significativas entre parejas de puntos con diferencias en una variable. Por otro lado, se empleó un análisis de regresión lineal múltiple para conocer la influencia de cada una de las variables en el proceso de fermentación. En este último análisis se emplearon únicamente los niveles de producción de la proteína recombinante encontrados en cada ensayo.

Todos los cálculos matemáticos y estadísticos se realizaron con ayuda de una computadora (*Macintosh, LC III*) y el programa Microsoft Excel.

2.2.3 Aislamiento de HGH-MBPr y Aislamiento y Purificación de HGHR

La estrategia general de aislamiento de cada una de las proteínas recombinantes a partir de sus respectivos homogenados celulares se muestra en la figura 9.

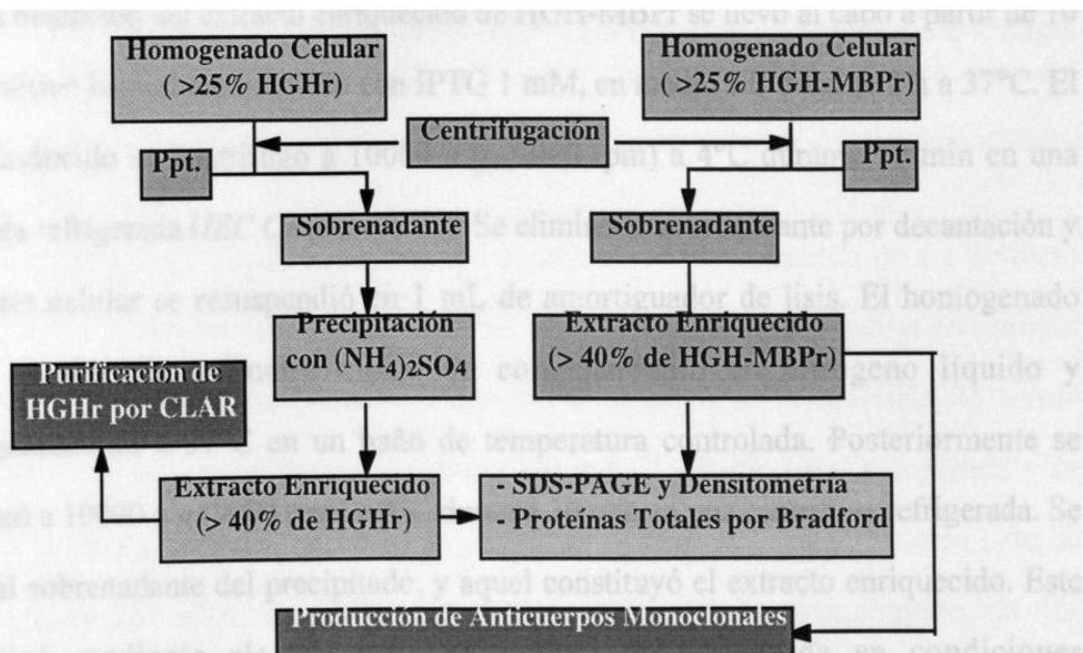


Figura 9. Estrategia de Aislamiento de HGHR y HGH-MBPr. Se muestran las diferentes etapas utilizadas en cada uno de los aislamientos de las proteínas recombinantes. Además de la utilidad de los extractos enriquecidos en las siguientes etapas del proyecto experimental.

El aislamiento de HGHR o de HGH-MBPr se realizó a partir de un homogenado de células inducidas que contenía al menos un 25 % de la proteína recombinante respecto al contenido total de proteínas. En el caso de HGHR, el aislamiento se llevó a cabo a partir del sobrenadante obtenido por centrifugación del homogenado celular. Este se precipitó a un 20 % de saturación con una solución de sulfato de amonio y el precipitado obtenido constituyó el extracto enriquecido con HGHR, el cual se utilizó para la purificación de la misma. Por otro lado, el extracto enriquecido con HGH-MBPr constituyó el sobrenadante obtenido por centrifugación a partir del homogenado celular correspondiente. Ambos extractos enriquecidos se analizaron por la técnica de SDS-PAGE y densitometría, además, se determinó en ellos el contenido de proteínas total por el método de Bradford.

2.2.3.1 Aislamiento de HGH-MBPr

La obtención del extracto enriquecido de HGH-MBPr se llevó al cabo a partir de 10 mL de cultivo bacteriano inducido con IPTG 1 mM, en medio LB durante 3 h a 37°C. El cultivo inducido se centrifugó a 10000 x g (9000 rpm) a 4°C durante 10 min en una centrífuga refrigerada (*IEC Centra 4RPM*). Se eliminó el sobrenadante por decantación y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de amortiguador de lisis. El homogenado celular se sometió a cuatro ciclos de congelamiento en nitrógeno líquido y descongelamiento a 37°C en un baño de temperatura controlada. Posteriormente se centrifugó a 10000 x g (9000 rpm) a 4°C durante 30 min en una centrífuga refrigerada. Se separó el sobrenadante del precipitado, y aquel constituyó el extracto enriquecido. Este se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y densitometría, y análisis de proteínas totales por el método de Bradford (anteriormente descritos).

2.2.3.2 Purificación de HGHR por CLAR-FR

La estrategia general de purificación de HGHR por CLAR-FR se muestra en la figura 10.

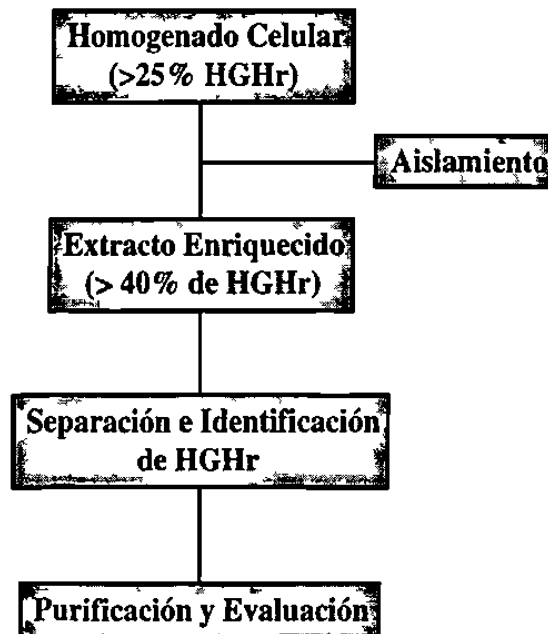


Figura 10. Estrategia de Purificación de HGHR. Se muestran las diferentes etapas utilizadas en la purificación de HGHR. Estas fueron aislamiento, separación, identificación y purificación de HGHR. Además se realizó una evaluación del proceso de purificación.

La estrategia de purificación de HGHR, inició con la obtención de un extracto enriquecido en HGHR mediante una técnica de aislamiento por precipitación con sulfato de amonio, a partir de un homogenado celular con al menos un 25 % de HGHR. Al mismo tiempo, se desarrolló un método cromatográfico por CLAR-FR para la separación de HGHR en la fracción soluble de un homogenado de células inducidas. Por otro lado, la identificación del pico de HGHR se realizó mediante la comparación de los cromatogramas obtenidos del análisis de las fracciones solubles de los homogenados de células inducidas y no inducidas. Esta identificación se corroboró mediante el análisis del pico correspondiente recolectado de forma manual, por medio de un ensayo de ELISA

contra HGH (GIBCO, BRL). La etapa de purificación se llevó a cabo empleando el extracto enriquecido de HGHR en la separación. Se recolectó el pico de HGHR y éste como el extracto enriquecido se analizaron para posteriormente evaluar dicha purificación.

2.2.3.2.1 Aislamiento de HGHR

La obtención del extracto enriquecido de HGHR se llevó al cabo a partir de 100 mL de cultivo bacteriano inducido con IPTG 1 mM, en medio LB durante 5 h a 37°C. El cultivo inducido se centrifugó a 10000 x g (9000 rpm) a 4°C durante 10 min en una centrifuga refrigerada (*IEC Centra 4RPM*). Se eliminó el sobrenadante por decantación y el paquete celular se resuspendió en 10 mL de amortiguador de lisis. El homogenado celular se sometió a cuatro ciclos de congelamiento en nitrógeno líquido y descongelamiento a 37°C en un baño de temperatura controlada. Posteriormente se centrifugó a 10000 x g (9000 rpm) a 4°C durante 30 min en una centrifuga refrigerada. Se separó el sobrenadante del precipitado y dicho precipitado se transfirió a un vaso de precipitado de 250 mL para posterior precipitación con sulfato de amonio (*Sigma*). La precipitación se llevó a cabo a 4°C añadiendo la cantidad necesaria de sulfato de amonio sólido hasta un 20 % de saturación, la adición se llevó a cabo de manera lenta y con agitación constante durante la misma. Posterior a la adición, se mantuvo en agitación constante durante 1 h a 4°C. El precipitado se obtuvo mediante centrifugación a 10000 x g (9000 rpm) a 4°C durante 30 min en una centrifuga refrigerada. Se eliminó el sobrenadante por decantación y el precipitado se resuspendió en 3 mL de amortiguador de lisis. La solución del precipitado anterior se dializó con una membrana de diálisis con un "cut-off" de 10-12 kDa (*Sigma*). La diálisis se llevó a cabo a 4°C durante 3 h contra agua Milli-Q realizando cambios de la misma cada 30 min. La solución dializada se congeló a -20°C para posterior análisis. El extracto enriquecido obtenido se utilizó para la purificación de HGHR por CLAR-FR. La solución dializada se analizó mediante

electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y densitometría, y análisis de proteínas totales por el método de Bradford (anteriormente descritos). Por otro lado, se analizó la cantidad de HGHR en la solución dializada mediante un método de ELISA de doble anticuerpo (GIBCO, BRL). En la anterior determinación se empleó una recta de calibración con un intervalo de concentraciones de una solución estándar de HGH de 0.5 a 12 ng/mL. La recta de calibración empleada en la determinación de HGHR mediante el ensayo de ELISA, se calculó por el método de mínimos cuadrados utilizando una computadora (*Macintosh LC III*) y el programa Microsoft Excel.

2.2.3.2.2 Método de Separación e Identificación de HGHR por CLAR-FR

El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de líquidos System Gold (*Beckman*). Se utilizó una columna analítica de fase reversa Nucleosil C₈, 300 Å (5 µm, 250 x 45 mm). La separación se llevó a cabo empleando un método de elución en gradiente de 0-100% de B (Acetonitrilo (*Merck*) con 0.1% de TFA (*Sigma*)) y A (Agua Milli-Q con 0.% de TFA) durante 20 min, a temperatura ambiente a un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó empleando un detector de UV de arreglo de diodos y a doble longitud de onda (215 nm y 280 nm). Los eluyentes de grado HPLC fueron filtrados con filtros Durapore tipo HVLP (0.45 µm) y desgasificados antes de uso en un sistema de filtración y desgasificación (*Millipore*). Por otro lado, las muestras a analizar se centrifugaron a 16000 x g a 4°C durante 5 min antes de su análisis cromatográfico. El volumen de inyección utilizado fue de 20 µL.

La identificación del pico cromatográfico correspondiente a HGHR se realizó mediante la comparación de los cromatogramas obtenidos del análisis de los homogenado de células no inducidas e inducidas del sistema de expresión *E. coli* pBHX. Dicha identificación fue corroborada mediante la recolección del pico correspondiente y posterior análisis del mismo por medio de un ensayo de ELISA contra HGHR (*GIBCO*,

BRL). El pico fue recolectado en un tubo de microcentrífuga (*Eppendorf*) de 1.5 mL, estéril y frío. Una alícuota de este se utilizó para su análisis por ELISA.

2.2.3.2.3 Estrategia de Purificación: Separación, Recolección y Análisis de HGHR por CLAR-FR

La solución dializada que contenía la HGHR (extracto enriquecido) la cual se obtuvo en el punto 2.2.3.2.1, se utilizó en la purificación de HGHR por CLAR-FR. La muestra a purificar se centrifugó a 16000 x g a 4°C durante 5 min antes de su análisis cromatográfico. El método de separación utilizado fue el que describió en el punto 2.2.3.2.2. Se utilizó un volumen de inyección de 250 µL. El pico correspondiente a HGHR se recolectó en forma manual, conservando la muestra en hielo (4°C). Posteriormente a la recolección, se eliminó la fase móvil en un concentrador centrífugo a alto vacío (*LABCONCO*). La muestra seca se resuspendió en un volumen adecuado de agua Milli-Q estéril y se analizó determinando la cantidad de HGHR recuperada mediante un sistema de ELISA, la cantidad de proteínas totales por el método de Bradford, el porcentaje relativo de HGHR por densitometría y además, se reanalizó por CLAR-FR.

2.2.3.3 Evaluación del Proceso de Purificación de HGHR

La evaluación completa del proceso de purificación se realizó mediante el análisis de proteínas totales por el método de Bradford, el % de HGHR obtenido por densitometría y el cálculo de la cantidad de HGHR determinada por la fórmula del punto 2.2.2.3.3., en las muestras del homogenado celular, fracción soluble, extracto enriquecido y fracción purificada con HGHR obtenidas del sistema de expresión de *E. coli* con pBHX.

Por otro lado se llevó a cabo la evaluación de la etapa cromatográfica de purificación, mediante la determinación de proteínas totales por el método de Bradford, el % de HGHR obtenido por densitometría y el cálculo de la cantidad de HGHR determinada por la fórmula del punto 2.2.2.3.3 y se comparó con el análisis de HGHR

determinado por un método de ELISA (GIBCO BRL) en las muestras antes y después de la purificación.

Con los datos anteriores se calculó la recuperación de HGHR después de la etapa cromatográfica y el rendimiento final de la purificación de HGHR expresado en mg/L de medio de cultivo.

La evaluación de los resultados se realizó mediante el uso de una computadora Macintosh y el programa Microsoft Excel.

2.2.4 Producción de Anticuerpos Monoclonales anti-HGHR

2.2.4.1 Esquema de Inmunización

Para llevar a cabo el esquema de inmunización se utilizaron ratones BALB/c hembras y machos de 12 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron en jaulas de acrílico, a una temperatura de 16-20°C, se alimentaron con purina (*Purina México S.A. de C.V.*) y agua destilada estéril *ad libitum*.

Se utilizaron como antígenos el extracto enriquecido de HGH-MBPr obtenido en el apartado 2.2.3.1, la fracción soluble de un homogenado de células inducidas del sistema de expresión *E. coli* pBHX que contenía HGHR (sobrenadante utilizado en la obtención del extracto enriquecido con HGHR en el apartado 2.2.3.2.1) y el líquido de fermentación de una cepa recombinante de *Pichia pastoris* productora de HGHR (35). El esquema de inmunización utilizado se muestra en la Tabla III.

Los antígenos para las inmunizaciones de los días 0, 15 y 30 se prepararon en forma de emulsión, mezclando el antígeno diluido en solución salina estéril 0.85% y el adyuvante completo de Freund (*Sigma*) a una relación 1:1. El volumen empleado en las dosis corresponde a la mezcla anterior, la cual se aplicó en dos ocasiones empleando una

vía diferente (subcutánea e intraperitoneal). Por último, el líquido de fermentación con HGHR se aplicó de forma directa por la vía intraperitoneal, sin ninguna preparación.

Los ratones se sangraron del plexo venoso retroorbitario, antes de cada inmunización y los sueros obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Tabla III. Esquema de Inmunización. Se muestran en esta tabla los días en que se realizaron las diferentes inmunizaciones, la composición de los diferentes antígenos utilizados, la dosis y la vía de inmunización.

Día	Antígeno	Vía de Inmunización
0	Extracto enriquecido con 41 % de HGHR-MBPr 50 μL con 500 μg	1. Subcutánea (cojinete plantar) 2. Intraperitoneal
15	Extracto enriquecido con 41 % de HGHR-MBPr 50 μL con 500 μg	1. Subcutánea (cojinete plantar) 2. Intraperitoneal
30	Fracción soluble con 43 % de HGHR 50 μL con 125 μg	1. Subcutánea (cojinete plantar) 2. Intraperitoneal
45	Líquido de fermentación con 80 % de HGHR 10 μg en 500 μL	

2.2.4.2 Evaluación de la Respuesta de Anticuerpos contra HGHR

La detección de anticuerpos contra HGHR en los ratones inmunizados se realizó a los 15 días de la primera inmunización, mediante un ensayo de ELISA modificado a partir un estuche comercial de ELISA contra HGHR (*Biorad*), cuyo procedimiento se describe en el apartado de 2.2.4.4.2. Los sueros obtenidos en los días 0 y 15 se analizaron por el método anterior empleando diluciones de los mismos de 1:100, 1:250, 1:500 y 1:700.

Por otro lado, se realizó la determinación de anticuerpos anti-HGHR en los sueros de los ratones obtenidos durante el esquema de inmunización empleando una dilución de los mismos de 1:100 mediante el ensayo de ELISA del punto 2.2.4.4.2. Así mismo, se

determinó el título de anticuerpos anti-HGH en el suero de los ratones a los 45 días mediante técnicas inmunológicas. Los procedimientos utilizados se reportan en los puntos 2.2.4.4.1 (inmunodot), 2.2.4.4.2 (ELISA) y 2.2.4.4.3 (Western-Blot).

2.2.4.3 Obtención de Hibridomas

Para los ensayos de fusión se emplearon diferentes líneas celulares de mieloma murino, P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1) (*Depto. de Inmunología*), P3X63Ag8U.1 (*Depto de Inmunología*) y P3X63Ag8.653 (*CINVESTAV*). Antes de iniciar con los ensayos de fusión, se realizó un ensayo de sensibilidad a aminopterina sobre las líneas celulares de mieloma de ratón anteriores, con excepción de la NS-1.

2.2.4.3.1 Sensibilidad a Aminopterina de Líneas Celulares de Mieloma de Ratón

La línea de mieloma se recuperó de un vial de criopreservación de 1 mL almacenado en un tanque de nitrógeno líquido y se colocó en baño de agua a 37°C hasta su descongelación total (1 a 2 min). El contenido de vial se transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio y estéril de 1.5 mL en una campana de flujo laminar. El tubo se centrifugó a 610 x g (2000 rpm) en una microcentrífuga a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante del tubo y se realizaron dos lavados del paquete celular con 1 mL de medio de cultivo DMEM con SBF al 10 %. En seguida de los lavados las células se resuspendieron en medio de cultivo DMEM con SBF al 10 % y se determinó su concentración y viabilidad celular en una cámara de Neubauer empleando una coloración vital con azul de tripano. Las células se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm³ a concentración celular de 2 X 10⁵ células/mL en un volumen entre 6 y 8 mL de medio de cultivo DMEM con SBF al 10 %. Se incubaron en una incubadora a 37°C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5 %. Cuando se observó confluencia se realizaron diluciones del cultivo para llevar a cabo el ensayo de sensibilidad a aminopterina.

Dicho ensayo se realizó en placas de cultivo de 24 pozos, en donde se realizaron cultivos por triplicado de la línea celular de mieloma murino en presencia y en ausencia de aminopterina. Los cultivos se realizaron a una concentración celular de 1×10^6 células/mL en un volumen de 2 mL de medio de cultivo DMEM con SBF 10 % y HAT (hipoxantina 100 μ M, aminopterina 0.4 μ M, timidina 16 μ M) o de 2 mL de medio de cultivo DMEM con SBF 10 % y HT (hipoxantina 100 μ M, timidina 16 μ M). Los cultivos se incubaron en una incubadora a 37°C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5 %. Se tomaron alícuotas de estos a las 0, 24, 48, 72 y 96 h para medir la concentración y viabilidad celular en una cámara de Neubauer empleando una coloración vital con azul de tripano.

Por todo lado, fue importante almacenar las líneas celulares de mieloma en nitrógeno líquido para posteriores ensayos. El almacenamiento se realizó mediante el siguiente procedimiento. A partir de un cultivo de células en fase *log* (cultivo de 24 h, después de un cultivo inicial a 2×10^5 células/mL en medio fresco) y viabilidad mayor del 95 %, se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 100 x g durante 5 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en medio de criopreservación de SBF con DMSO al 20 % v/v frío a una concentración celular de 3×10^6 células/mL. La línea celular se almacenó en alícuotas de 1 mL en viales de criopreservación estériles. Los viales se colocaron a -70°C durante 1.5 h, posteriormente estos se transfirieron a cilindros de almacenamiento en un tanque de nitrógeno líquido.

2.2.4.3.2 Ensayos de Fusión Celular

La preparación de células de mieloma murino para los ensayos de fusión se realizó mediante el siguiente procedimiento. La línea de mieloma se recuperó de un vial de criopreservación de 1 mL almacenado en un tanque de nitrógeno líquido y se colocó en baño de agua a 37°C hasta su descongelación total (1 a 2 min). El contenido de vial se

transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio y estéril de 1.5 mL en una campana de flujo laminar. El tubo se centrifugó a $610 \times g$ (2000 rpm) en una microcentrífuga a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante del tubo y se realizaron dos lavados del paquete celular con 1 mL de medio de cultivo DMEM con SBF al 10 %. En seguida de los lavados las células se resuspendieron en medio de cultivo DMEM con SBF al 10 % y se determinó su concentración y viabilidad celular en una cámara de Neubauer empleando una coloración vital con azul de tripano. Las células se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm^3 a concentración celular de 2×10^5 células/mL en un volumen entre 6 y 8 mL de medio de cultivo DMEM con SBF al 10 %. Se incubaron en una incubadora a 37°C en atmósfera húmeda con CO_2 al 5 %. Un día antes de la fusión se analizó la viabilidad y concentración celular del cultivo y se preparó un cultivo de células en fase *log* y viabilidad mayor del 95 %, el cual se utilizó para los ensayos de fusión.

Los ensayos de fusión de células de mieloma murino y células de bazo del ratón inmunizado, se realizó mediante el procedimiento que se describe a continuación.

Se inició con la obtención de la células de bazo del ratón inmunizado. El ratón se sacrificó mediante dislocación cervical y se colectó sangre del mismo mediante una punción intracardiaca. La sangre se transfirió a un tubo de microcentrífuga 1.5 mL y se centrifugó a $16000 \times g$ durante 5 min para la obtención del suero. Inmediatamente el ratón se sumergió en una solución de etanol al 70 % y se colocó sobre una mesa de disección. El bazo se extrajo en forma aséptica y se colocó en un caja Petri de 60 mm con 3 mL de medio de cultivo DMEM. Se removió de su superficie grasa y tejido adherido bajo una campana de flujo laminar. Posteriormente este se transfirió a una rejilla (colador) de acero inoxidable en una caja Petri de 100 mm con 10 mL de medio de cultivo DMEM. Se llenó una jeringa de 3 mL con 2 mL de medio de cultivo DMEM y usando una aguja de 26-G se llenó el bazo con medio mediante inyección en varios puntos. Con una tijera estéril se cortó el bazo en tres o cuatro lugares. El bazo se presionó contra la rejilla de acero

inoxidable con ayuda de un embolo de una jeringa estéril usando movimientos circulares, hasta que solo el tejido fibroso permaneció sobre la rejilla. La suspensión obtenida de la presión del bazo sobre la rejilla se colectó en una caja Petri estéril. La rejilla en seguida fue lavada con 2 mL de medio DMEM. Posteriormente se transfirió la suspensión celular a un tubo de centrifuga de 15 mL y se dispersó con ayuda de una pipeta estéril de 5 mL. Se dejó 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente se determinó en la suspensión homogénea la concentración y viabilidad celular. Posteriormente se transfirieron 1×10^8 células de bazo viables a un tubo de centrifuga de 15 mL.

Para el ensayo de fusión celular se transfirieron 1×10^7 células de mieloma en fase *log* a un tubo de centrifuga de 50 mL, las cuales se lavaron en dos ocasiones con medio DMEM centrifugando el tubo 5 min a $200 \times g$ a temperatura ambiente y resuspendiendo en 5 mL de medio. Posteriormente se añadieron las células de bazo a las células de mieloma en el tubo de 50 mL y el tubo se lleno con medio de cultivo (relación 10:1). Se centrifugo el tubo 5 min a $200 \times g$ a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 mL y nuevamente se centrifugó. Se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se calentó a 37°C durante 2 min en un baño de agua. Se golpeó gentilmente el tubo por el fondo para homogeneizar el paquete celular. El procedimiento de fusión se realizó añadiendo al paquete celular 1 mL de una solución de PEG a 37°C gota a gota durante 1 min y agitando gentilmente. Inmediatamente el tubo se centrifugó por 2 min a $100 \times g$ y a este se añadieron 4 mL de medio DMEM durante 3 min , 5 mL durante 2 min y por último se llenó el tubo. El tubo se centrifugó 5 min a $100 \times g$ y se eliminó el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 70 ml de medio DMEM con SBF al 20 % y HAT y OPI sin forzar la dispersión de los acúmulos celulares. Se incubó al menos 30 min en una incubadora a 37°C en atmósfera húmeda con CO_2 al 5 %. En seguida se resuspendió adecuadamente y se añadieron 200 μL de la suspensión celular a cada pozo de placas de microcultivo de 96 pozos de fondo plano y se incubaron durante 5 días en una incubadora a 37°C en atmósfera húmeda con CO_2 al 5 %. Al primer día se verificó la