

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

ausencia de contaminación, y al quinto día se añadieron 100 μL de medio fresco. Posteriormente a los dos días se reemplazaron 100 μL de cada pozo por 100 μL de medio fresco. El paso anterior se realizó cada tercer día hasta que las células híbridas cubrieron un 10 a 50 % de la superficie del pozo.

2.2.4.4 Selección de Hibridomas Productores de anti-HGHR

A partir del séptimo día, los microcultivos fueron revisados diariamente al invertoscopio en busca de datos sugerentes de proliferación celular como son la morfología y el número de células. Los pozos que presentaron datos sugerentes de hibridomas en desarrollo y que cubrían más de un 50 % de su superficie se marcaron y de ellos se extrajeron 100 μL de sobrenadante (se restituyó con 100 μL de medio fresco) para determinar la presencia de anticuerpos mediante una técnica de ELISA e inmunodot. Los cultivos productores se expandieron en forma sucesiva, a placas de cultivo de 96 pozos a una dilución 1:2 en medio fresco, posteriormente de este a placas de 24 pozos a una dilución 1:5 y posteriormente a botellas de 25 cm^3 a una dilución 1:5. De los cultivos propagados se tomaron alícuotas para congelar y clonar posteriormente.

2.2.4.4.1 Ensayos de Inmunodot

El análisis de sobrenadantes de microcultivos de hibridomas se realizó inicialmente mediante una técnica de inmunodot (ensayo inmunoenzimático en papel de nitrocelulosa). Este se realizó empleando el procedimiento siguiente. Un pedazo de papel de nitrocelulosa de poro de 0.45 μm se transfirió a un recipiente con amortiguador TBS pH 7.5 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM) y se dejó impregnar durante 10 min. El papel se colocó en un aparato de microfiltración (*BIORAD*) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. A cada pozo se le agregaron 100 μl de amortiguador TBS pH 7.5 y se drenó mediante un sistema de vacío. Posteriormente se agregó a cada pozo 50 μl de una

solución con 1 µg de proteína total de la fracción soluble de un homogenado celular de *E. coli* pBHX diluido en TBS pH 7.5 o 50 µL con 1 µg de proteína total del líquido de fermentación de una cepa de *Pichia pastoris* productora de HGHR, diluido en TBS pH 7.5, el cual se dejó drenar por gravedad durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió a cada pozo 200 µL de una solución de leche descremada al 1 % en TBS pH 7.5 y se dejó drenar por gravedad durante 1.5 h a temperatura ambiente. En seguida se eliminaron las soluciones anteriores mediante filtración a vacío. Se realizaron cuatro lavados de cada pozo con 200 µL de Tween 20 al 0.1 % en TBS (TTBS) pH 7.5, eliminando estos por filtración a vacío. Se añadieron 50 µl de cada muestra, sobrenadantes sin diluir, suero del ratón (día 45) diluido 1:100 en leche descremada 1 % en TTBS pH 7.5 (control positivo) y suero del ratón (día 0) diluido 1:100 en leche descremada 1 % en TTBS pH 7.5 (control negativo). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h y se dejaron filtrar por gravedad. Se realizaron cuatro lavados de cada pozo con 200 µL de Tween 20 al 0.1 % en TBS (TTBS) pH 7.5, eliminando estos por filtración a vacío. Posteriormente se añadieron 50 µL a cada pozo de un suero policlonal anti-Ig's de ratón conjugado a peroxidasa a una dilución de 1:1000 en Tween 20 al 0.1 % en TBS (TTBS) pH 7.5 y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h y se dejaron filtrar por gravedad. Se realizaron cuatro lavados de cada pozo con 200 µL de Tween 20 al 0.1 % en TBS (TTBS) pH 7.5, eliminando estos por filtración a vacío. Se desmontó el sistema y el papel se colocó en una solución sustrato de 3,3-diaminobencidina (tetrahydrocloruro) 0.5 mg/mL en TBS pH 7.5 y peróxido de hidrógeno al 0.06 % (2 µL de solución de peróxido de hidrógeno al 30 % por mL de solución de 3,3-diaminobencidina), hasta la aparición de color en los pozos. La reacción se detuvo con una solución de HCl 5 N en agua Milli-Q. El papel se secó entre dos hojas de papel filtro.

2.2.4.4.2 Ensayos de ELISA

El análisis de sobrenadantes de microcultivos de hibridomas se realizó también por medio de un ensayo de ELISA modificado a partir de un estuche comercial de ELISA contra HGH. El procedimiento utilizado se describe a continuación. Se utilizaron placas de microtitulación cubiertas con anticuerpos IgG de conejo anti-HGH. Se añadieron 100 μ L por pozo del amortiguador de dilución 2X (PBS/ASB/Tween 20). Se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y sin remover esta solución se añadieron en seguida 100 μ l por pozo del estándar de HGH a 25 ng/mL diluido en medio de cultivo DMEM. La placa se incubó a 37°C durante 30 min. Posteriormente se realizaron cinco lavados con el amortiguador de lavado 1X utilizando 200 μ L por pozo e invirtiendo la placa para eliminar la solución. En seguida se añadieron 200 μ l de cada muestra, sobrenadantes sin diluir, suero del ratón (día 45) diluido 1:100 y suero del ratón (día 0) diluido 1:100, estos últimos diluidos en amortiguador de dilución 1X. La placa se incubó a 37°C durante 30 min y posteriormente se realizaron cinco lavados con el amortiguador de lavado 1X utilizando 200 μ L por pozo e invirtiendo la placa para eliminar la solución. Se añadieron a continuación 200 μ L de un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa diluido 1:500 en amortiguador de dilución 1X. La placa se incubó a 37°C durante 30 min y posteriormente se realizaron cinco lavados con el amortiguador de lavado 1X utilizando 200 μ L por pozo e invirtiendo la placa para eliminar la solución. La detección se realizó añadiendo 200 μ L de amortiguador de sustrato y OPD recientemente preparado. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad. la reacción fue detenida añadiendo a cada pozo 100 μ L de una solución de ácido sulfúrico 2 N. La formación de color fue medido mediante la determinación de la absorbancia de la muestra a 490 nm en un equipo lector de ELISA.

2.2.4.4.3 Ensayos de Western-Blot

El análisis de sobrenadantes de microcultivos de hibridomas se realizó además por medio de un ensayo de inmunoelectrotransferencia sobre membrana de nitrocelulosa. En este ensayo se utilizó como antígeno un homogenado de células inducidas de *E. coli* con pBHX. Se inició con la separación de dicho homogenado celular siguiendo el procedimiento descrito en el punto 2.2.2.3.2 con algunas modificaciones, empleando 100 μ g de proteína total en 200 μ L de amortiguador de muestra para electroforesis. La separación se llevó a cabo en un gel discontinuo de poliacrilamida de dimensiones de 8 cm x 12 cm x 0.75 mm utilizando un gel separador de acrilamida al 12 % y un gel concentrador de acrilamida al 4 %. El peine utilizado fue de un solo diente. La muestra se calentó 5 min a 100°C en una placa de calentamiento y posteriormente se centrifugó 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. La electroelución del gel se realizó a 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. Posteriormente, parte del gel de separación (aquél que contiene el marcador de peso molecular y la muestra) se tiñó con la técnica de Azul de Coomassie y el resto del gel que contenía la muestra 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. Esta se realizó sobre una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m en un sistema de electrotransferencia semi-dryer (*BIORAD*) durante 2 h a corriente constante de 144 mA. 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 cortó en tiras de 0.5 cm y se incubaron con 1 mL de sobrenadantes sin diluir, suero del ratón (día 45) diluido 1:100 en leche descremada 1% en TTBS pH 7.5 (control positivo) y suero del ratón (día 0) diluido 1:100 en leche descremada 1 % en TTBS pH 7.5 (control negativo) en una recipiente de multicanales (*BIORAD*). La incubación 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 cuatro veces. Posteriormente, la membrana se sumergió en una solución con el anticuerpo secundario conjugado, el cual fue un suero policlonal anti-Ig's de ratón desarrollado en conejo conjugado a peroxidasa (*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 cuatro 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 sustrato de 3,3-diaminobencidina (tetrahidrocloruro) 0.5 mg/mL en TBS pH 7.5 y peróxido de hidrógeno al 0.06 % (2 μ L de solución de peróxido de hidrógeno al 30 % por mL de solución de 3,3-diaminobencidina), hasta la aparición de color en las tirillas. La reacción se detuvo con una solución de HCl 5 N en agua Milli-Q. Las tirillas se secaron entre dos hojas de papel filtro.

2.2.4.5 Clonación de Hibridomas Productores de anti-HGHR

2.2.4.5.1 Ensayo de Clonación a Dilución Limitante

El ensayo de clonación a dilución limitante se realizó con los híbridos que resultaron positivos para la producción de anticuerpos anti-HGHR en los ensayos de Western-Blot. Estos se sembraron en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo en "U" a una concentración de 1 célula por pozo en 100 μ L de medio DMEM y SBF 10 % y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5 %. Los cultivos se revisaron diariamente al invertoscopio en busca de proliferación celular. Los cultivos en los que se observó dicho crecimiento se les añadió 100 μ L de DMEM y SBF 10 %. Los sobrenadantes de los pozos con proliferación de más de un 50 % de su superficie, se recuperaron para su análisis posterior mediante Western-Blot.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Biosíntesis de HGHR en *E. coli*

3.1.1 Transformación y Caracterización de la Clona de *E. coli* con pBHX

Los ensayos de transformación de células calcio competentes de *E. coli* TB1 con el plásmido pBHX, mostraron niveles en la eficiencia de transformación de 1×10^4 a 1×10^5 clonas por ng de ADN plasmídico. Por otro lado, el ADN plasmídico extraído a partir de las clonas obtenidas mostró valores de calidad de 1.9 a 2.0 (Abs260nm/abs280nm) con el método de extracción utilizado. Así mismo, mostró ser de gran utilidad para realizar las reacciones enzimáticas con las enzimas de restricción utilizadas en su caracterización.

Los resultados obtenidos de la caracterización con enzimas de restricción de una clona recombinante de *E. coli* TB1 con pBHX se muestran en la figura 11. La caracterización enzimática comprobó la identidad del plásmido recombinante al analizar las diferentes digestiones realizadas sobre el ADN plasmídico extraído de la clona, las cuales se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.6 % teñido con una solución de bromuro de etidio y detectado bajo una fuente de luz UV a 254 nm. En el carril 6 de dicha figura se muestra la forma superenrollada de este plásmido (sin cortar). Por otro lado, el corte de este con la enzima *Hind* III (carril 2) mostró un sitio único en el plásmido, ya

que se obtuvo sólo un fragmento de 6.5 kpb. El corte enzimático con las enzimas *Xho* I + *Hind* III (carril 2) permitió la obtención de dos fragmentos de restricción (5.6 y 0.9 kpb). El fragmento de 0.9 kpb correspondió al tamaño del ADNc de HGH insertado en dicho plásmido. Así también, se muestran en esta figura los fragmentos de restricción obtenidos del corte del plásmido con las enzimas *Hinc* II (carril 3), *Xba* I + *Hind* III (carril 4) y *Ssp* I (carril 5). El carril M corresponde al marcador de tamaño, que en este caso se utilizó al bacteriófago λ cortado con la enzima *BstE* II.

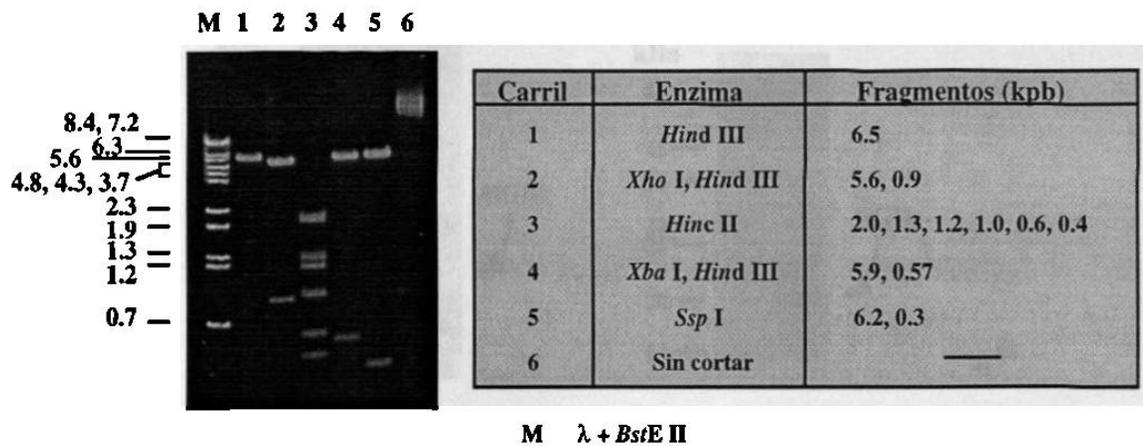


Figura 11. Caracterización Enzimática del Plásmido pBHX. Este plásmido fue extraído de una clona recombinante y fue digerido con las enzimas de restricción de la tabla de la derecha. Los fragmentos de restricción esperados se analizaron en un gel de agarosa al 1.6 % teñido con bromuro de etidio (fotografía de la izquierda).

El análisis de los fragmentos de restricción obtenidos permitió comprobar la presencia de estos sitios de restricción en el plásmido para las enzimas utilizadas, las cuales fueron seleccionadas a partir de una región secuenciada de dicho plásmido (Anexo 2). Con lo anterior se logró, corroborar la identidad del plásmido recombinante pBHX.

3.1.2 Detección y Análisis de la Producción de HGhr

El análisis del sistema de expresión de *E. coli*-pBHX reveló la producción de la HGhr. El análisis cualitativo de HGhr en dicho sistema se realizó mediante la técnica de SDS-PAGE y detección por Western-Blot, los resultados se muestran en la figura 12.

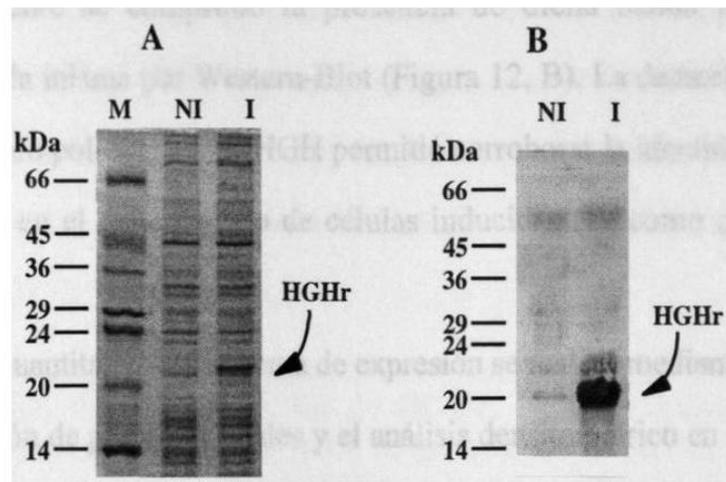


Figura 12. Análisis Cualitativo de HGhr en el Sistema de Expresión *E. coli* con pBHX. A) Análisis del sistema de expresión por SDS-PAGE. En el gel se muestran en los carriles M: marcador de peso molecular de proteínas, NI: homogenado de células no inducidas y N: homogenado de células inducidas. B) Análisis por Western-Blot. En el papel de nitrocelulosa se muestran los carriles NI: homogenado de células no inducidas y N: homogenado de células inducidas.

La separación de las proteínas en los homogenados celulares se realizó por SDS-PAGE (Figura 12, A). La identificación inicial de la banda de HGhr en el homogenado bacteriano obtenido en el sistema de expresión, se realizó empleando una gráfica semilogarítmica de peso molecular contra distancia recorrida por los marcadores de peso molecular de proteínas en el gel. En el homogenado de células inducidas del sistema de expresión con pBHX (carril I), se observó una banda de coloración intensa de aproximadamente 22 kDa, la cual es mucho más intensa que la correspondiente en el homogenado de células no inducidas (carril NI). El peso molecular calculado para dicha

banda corresponde al peso molecular de HGH madura (22 kDa), por lo tanto, se caracterizó como la banda correspondiente a HGHR, ya que el sistema de expresión con pBHX expresa la HGHR en forma de metionil-HGH y esta no difiere de la HGH madura en relación a su peso molecular. La recta de correlación de logaritmo base 10 del peso molecular y distancia recorrida por los marcadores mostró un coeficiente de correlación lineal (R^2) de 0.989.

Posteriormente se comprobó la presencia de dicha banda con la detección inmunológica de la misma por Western-Blot (Figura 12, B). La detección inmunológica empleando un suero policlonal anti-HGH permitió corroborar la identidad de la banda de 22 kDa obtenida en el homogenado de células inducidas (I), como correspondiente a HGHR.

El análisis cuantitativo del sistema de expresión se realizó mediante la combinación de la determinación de proteínas totales y el análisis densitométrico en los homogenados celulares. Los densitogramas obtenidos de dicho análisis se muestran en la figura 13.

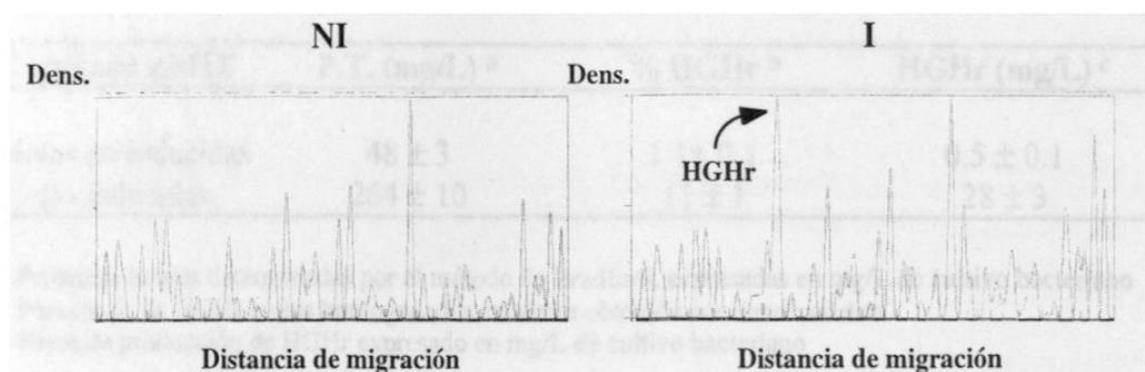


Figura 13. Análisis Densitométrico de HGHR en el Sistema de Expresión *E. coli* con pBHX. NI) Densitograma del homogenado de células no inducidas y N) Densitograma del homogenado de células inducidas. En este último se observa la presencia de un pico de alta densidad que correspondió a HGHR.

El densitograma correspondiente al homogenado de células inducidas (I) en este sistema de expresión mostró un aumento en la altura del pico correspondiente a la banda de HGHR en relación al densitograma obtenido del análisis del homogenado de células no

inducidas (NI). El análisis por densitometría de la intensidad de color de las bandas en los homogenados celulares obtenidas en los geles de poliacrilamida mostró un porcentaje relativo de la banda de HGhr mayor del 10 %.

Los resultados del análisis cuantitativo de proteínas totales en los homogenados bacterianos del sistema de expresión de *E. coli* pBHX se muestran en la tabla IV. La recta de calibración utilizada en la determinación de proteínas totales presentó una buena correlación con un R^2 de 0.998. En la tabla anterior también se presentan los porcentajes de HGhr y la cantidad de HGhr expresada en mg/L de cultivo (nivel de producción). El porcentaje de HGhr fue mayor del 10 % y el nivel de producción de HGhr fue mayor de 25 mg/L en este sistema de expresión. Todos los valores calculados representan el promedio de tres ensayos realizados.

Tabla IV. Análisis de la Producción de HGhr. La tabla muestra los niveles de producción de HGhr obtenidos en los ensayos de fermentación del sistema de expresión de *E. coli* con pBHX realizados con la metodología del apartado 2.2.2.2. Los valores representan la media de los experimentos \pm su desviación estándar.

<i>E. coli</i> con pBHX	P.T. (mg/L) ^a	% HGhr ^b	HGhr (mg/L) ^c
Células no inducidas	48 \pm 3	1.1 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1
Células inducidas	264 \pm 10	11 \pm 1	28 \pm 3

a Proteínas totales determinadas por el método de Bradford, expresadas en mg/L de cultivo bacteriano

b Porcentaje de HGhr en los homogenados celulares obtenido por densitometría

c Nivel de producción de HGhr expresado en mg/L de cultivo bacteriano

Los niveles de producción de HGhr en el sistema de expresión de *E. coli* con pBHX (28 mg/L) obtenidos con la metodología del apartado 2.2.2.2 fueron mayores a los reportados por Goeddel y colaboradores (2.4 mg/L) quienes sintetizaron por primera vez la HGhr en el citoplasma de *E. coli* (19). En este último caso, la biosíntesis se realizó bajo el control transcripcional del promotor Lac, un promotor de menor fuerza que el promotor Tac utilizado en nuestro sistema de expresión. Así también, estos niveles son

mayores a los reportados por otros investigadores, en cuyos trabajos la biosíntesis de HGhr fue dirigida hacia el espacio periplásmico y/o el medio de cultivo (23, 24). A pesar de ésto, estos últimos trabajos ofrecen claras ventajas con respecto a la estabilidad de la proteína y la simplificación de los procesos de purificación de la HGhr.

3.1.3 Evaluación de la Influencia de Variables en el Proceso de Fermentación

Los resultados del estudio de la influencia de variables que pueden afectar el proceso de fermentación del sistema de *E. coli* con pBHx se muestran a continuación. 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 figura 14, se muestra una gráfica con los niveles de producción obtenidos respecto al tiempo en cada uno de los ensayos de fermentación evaluados.

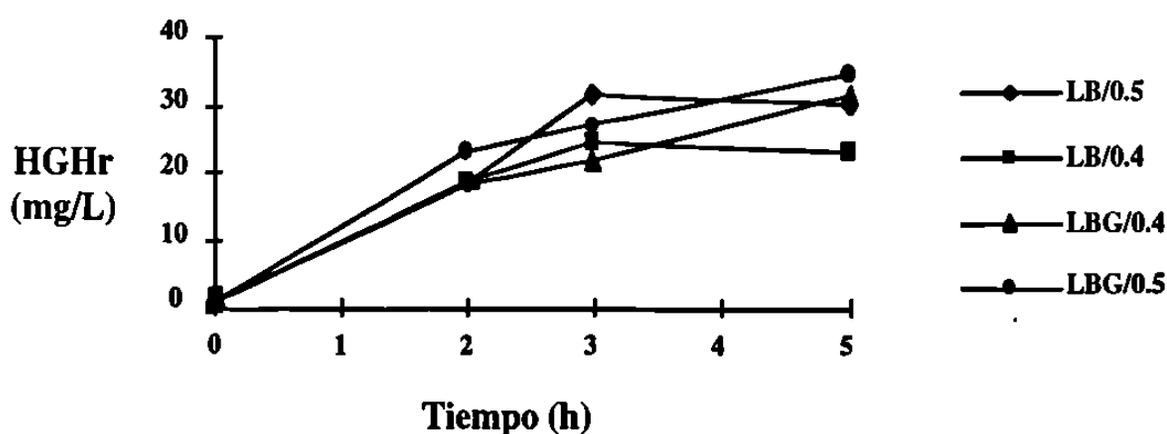


Figura 14. Influencia de las Variables de Fermentación sobre la Producción de HGhr. Producción de HGhr (mg/L) respecto al tiempo en cada uno de los ensayos de fermentación evaluados. Los puntos representan la media de tres ensayos. Los coeficientes de variación fueron menores del 20%.

Esta gráfica muestra la influencia de estas variables sobre los niveles de producción de HGhr. El empleo de una densidad óptica del cultivo bacteriano de 0.5 al inicio de la inducción, permitió obtener un mayor nivel de producción de HGhr, a diferencia de utilizar un valor de 0.4. En este caso dicha influencia se observó a tiempos de inducción de 3 y 5 h. La ausencia de la glucosa en el medio de cultivo al tiempo de inducción de 3 h incrementó el nivel de producción de HGhr, sin embargo a un tiempo de inducción de 5 h su presencia permitió un mayor nivel de producción. Esta influencia fue similar para los ensayos en donde se emplearon valores de 0.4 y 0.5 de densidad óptica al inicio de la inducción. En el caso de la influencia del tiempo de inducción sobre la producción de HGhr, fue variable para los tiempos evaluados. Sin embargo, se pudo observar un incremento en el nivel de producción HGhr proporcional al tiempo en los ensayos evaluados en presencia de glucosa.

En la figura 15 se muestra una gráfica con los valores del porcentaje relativo de HGhr obtenidos respecto al tiempo en cada uno de los ensayos de fermentación evaluados.

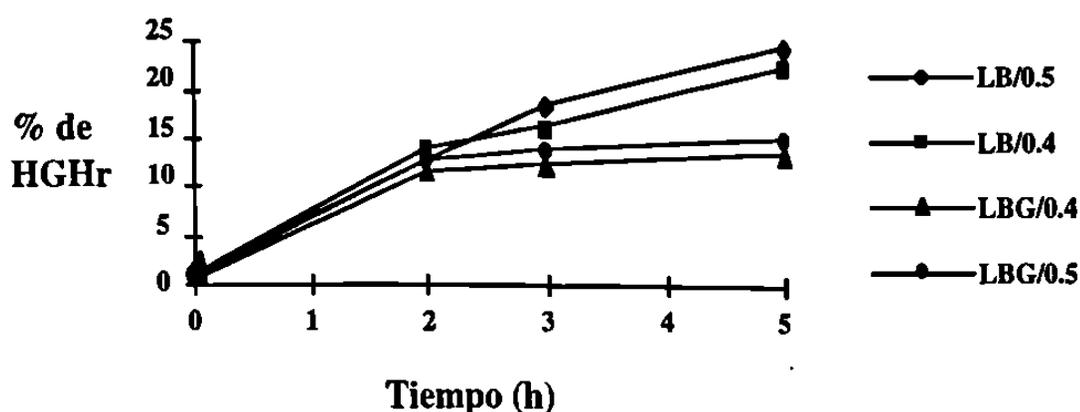


Figura 15. Influencia de las Variables de Fermentación sobre el Porcentaje Relativo de HGhr. Porcentaje relativo de HGhr obtenido en los homogenados celulares respecto al tiempo en cada uno de los ensayos de fermentación evaluados. Los puntos representan la media de tres ensayos. Los coeficientes de variación fueron menores del 20%.

Esta gráfica muestra la influencia de estas variables sobre el porcentaje relativo de HGHR. El empleo de una densidad óptica del cultivo bacteriano de 0.5 al inicio de la inducción, permitió obtener un mayor porcentaje relativo de HGHR a diferencia de utilizar un valor de 0.4. En este caso dicha influencia se observó a tiempos de inducción de 3 y 5 h en presencia y ausencia de glucosa en el medio de cultivo. La presencia de la glucosa en el medio de cultivo disminuyó el porcentaje de HGHR a tiempos de inducción de 3 y 5 h. Esta influencia fue similar para los ensayos en donde se emplearon valores de 0.4 y 0.5 de densidad óptica al inicio de la inducción. El aumento en el tiempo de inducción provocó un incremento en el porcentaje de HGHR en los ensayos en ausencia de glucosa.

Todos estos datos nos indican que la influencia de estas variables sobre la producción y el porcentaje de HGHR, depende de las diferentes combinaciones de las mismas. Por otro lado, se observó un incremento en el contenido de proteínas totales de los homogenados celulares respecto al tiempo de inducción (datos no mostrados), lo cual indicó un aumento de la masa celular bacteriana respecto al tiempo, este incremento fue ligeramente mayor en presencia de glucosa. Estos datos sugirieron que la presencia de glucosa en el medio de cultivo a lo largo de la fermentación (de 2 a 5 h) provocó un incremento en el contenido de proteínas totales. Por el contrario, su presencia provocó que el porcentaje relativo de HGHR permaneciera casi constante después de las 2 h, pero en ausencia de la misma se observó un incremento del mismo a lo largo del tiempo. Por tal motivo, los niveles de producción de HGHR ligeramente mayores a las 5 h en presencia de glucosa son debidos principalmente a un incremento en el contenido de proteínas totales a pesar de que el porcentaje relativo de HGHR sea menor.

Los resultados estadísticos de la evaluación de la influencia de las variables en la fermentación obtenidos mediante el análisis de los valores de producción (mg/L de cultivo) y de porcentajes relativos de HGHR, empleando una prueba *t* de Student para

analizar diferencias significativas entre parejas de puntos con diferencias en una variable, se resumen en la tabla V.

Los resultados del análisis de regresión lineal múltiple para conocer la influencia de cada una de las variables en el proceso de fermentación mostraron que existe una influencia importante de T.I. ($p = 7 \times 10^{-7}$), % Glc. ($p = 2 \times 10^{-6}$) y D.O. ($p = 6 \times 10^{-5}$) en orden decreciente sobre los niveles de producción de HGhr. Estos datos se obtuvieron comparando los valores de p obtenidos para cada una de las variables, y sugieren que los niveles de producción dependen principalmente de la presencia del inductor (IPTG) en el sistema de expresión. Por otro lado, también son influenciados en menor grado por el aumento de la masa celular bacteriana a lo largo del tiempo que puede ser favorecida por la presencia de glucosa en el cultivo bacteriano. Así también, la densidad óptica al inicio de la inducción mostró cierta influencia, con lo cual se llegó a la conclusión de que los niveles de producción pueden ser incrementados mediante la combinación de valores para las diferentes variables y lograr así, la obtención de un valor óptimo en el nivel de producción de la proteína recombinante.

Tabla V. Análisis de t de Student de la influencia de variables en la Biosíntesis de HGhr. La tabla muestra los resultados estadísticos de la evaluación de la influencia de las variables en la fermentación del sistema de expresión de *E. coli* con pBHx. Se muestra en donde SI existe influencia de cada variable en base a las diferencias significativas encontradas entre parejas de puntos con diferencias en una variable. El estudio estadístico empleó un valor de $\alpha = 0.05$.

Variable	HGhr (mg/L)	% HGhr
% Glc	Si	Si (excepto a 2 h)
D.O.	Si	Si (excepto a 2 h)
T.I.	Si	Si

% 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

El mayor nivel de producción de HGHR (38 mg/L de cultivo bacteriano) se alcanzó realizando la fermentación a una D.O. al inicio de la inducción de 0.5, en medio LBG durante 5 h, y en presencia de IPTG 1 mM. Por otro lado, las condiciones de fermentación que permitieron un mayor porcentaje de HGHR (25 %) fueron una D.O. al inicio de la inducción de 0.5, en medio LB durante 5 h de inducción y con IPTG 1 mM. Las condiciones de fermentación de este último ensayo se utilizaron para la obtención del extracto bacteriano enriquecido con HGHR, con la excepción del tiempo de inducción, el cual fue de 6 h con el fin de poder obtener un mayor porcentaje relativo de la proteína recombinante.

3.2 Biosíntesis de HGHR-MBPr en *E. coli*

3.2.1 Transformación y Caracterización de la Clona de *E. coli* con pMALchGH22K

Al igual que en el sistema de expresión de *E. coli* con pBHX, los resultados en los ensayos de transformación de células calcio competentes de *E. coli* TB1 con el plásmido pMALchGH22K, mostraron niveles en la eficiencia de transformación de 1×10^4 a 1×10^5 clonas por ng de ADN plasmídico. Así también, el ADN plasmídico extraído a partir de las clonas obtenidas mostró valores de calidad de 1.9 a 2.0 (Abs260/Abs280), además de ser de gran utilidad para realizar las reacciones enzimáticas con las enzimas de restricción utilizadas en su caracterización.

Los resultados obtenidos de la caracterización con enzimas de restricción de una clona recombinante de *E. coli* TB1 con pMALchGH22K se muestran en la figura 16. La caracterización enzimática comprobó la identidad del plásmido recombinante al analizar las diferentes digestiones realizadas sobre el ADN plasmídico extraído de la clona, las cuales se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con una solución de

bromuro de etidio y detectado bajo una fuente de luz UV a 254 nm. En el carril 1 de dicha figura se muestra la forma superenrollada de este plásmido (sin cortar). Por otro lado, el corte de este con la enzima *Hind* III (carril 2) mostró un sitio único en el plásmido ya que se obtuvo sólo un fragmento de 6.5 kpb. El corte enzimático con las enzimas *Xba* I y *Hind* III (carril 3) permitió la obtención de dos fragmentos de restricción (5.6 y 0.9 kpb). El fragmento de 0.57 kpb corresponde al ADNc de HGH insertado en dicho plásmido. Así también, se muestran en esta figura los fragmentos de restricción obtenidos del corte del plásmido con las enzimas *Bam*H I-*Hind* III (carril 4), *Pvu* II (carril 5) y *Apa*L I (carril 6). El carril M1 corresponde al marcador de tamaño, que en este caso corresponde al bacteriófago λ cortado con las enzimas *Eco*R I-*Hind* III y el carril M2 al plásmido pBR322 cortado con la enzima *Msp* I.

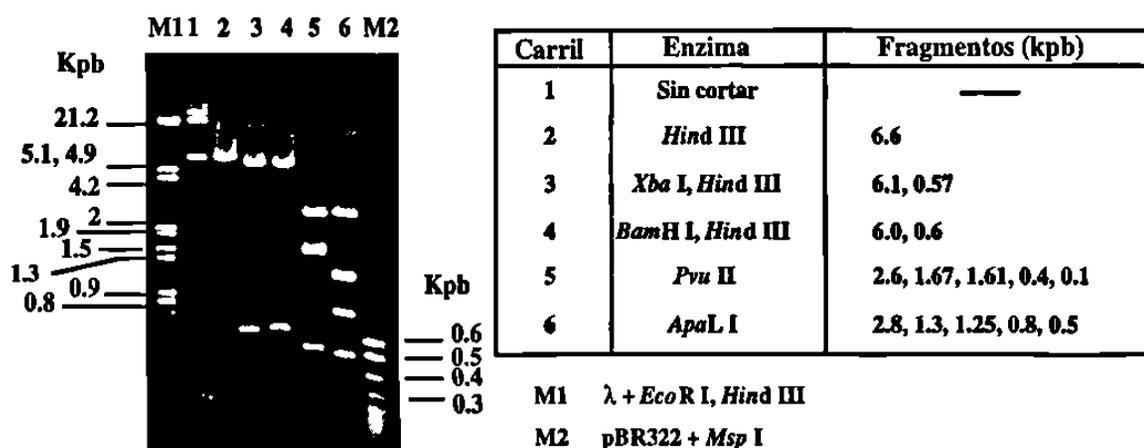


Figura 16. Caracterización Enzimática del Plásmido pMALchGH22K. Este plásmido fue extraído de una clona recombinante y fue digerido con las enzimas de restricción indicadas en la tabla de la derecha. Los productos de restricción se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio (fotografía de la izquierda).

El análisis de los fragmentos de restricción obtenidos permitió comprobar la presencia de estos sitios de restricción en el plásmido para las enzimas utilizadas, las cuales fueron seleccionadas a partir del mapa de restricción de dicho plásmido (Anexo). Con lo anterior se logró, corroborar la identidad del plásmido recombinante pMALchGH22K.

3.2.2 Detección y Análisis de la Producción de HGH-MBPr

Los resultados del análisis del sistema de expresión de *E. coli* pMALchGH22K revelaron la producción de la HGH-MBPr. El análisis cualitativo de HGH-MBPr en dicho sistema se realizó mediante la técnica de SDS-PAGE y detección por Western-Blot, los resultados se muestran en la figura 17.

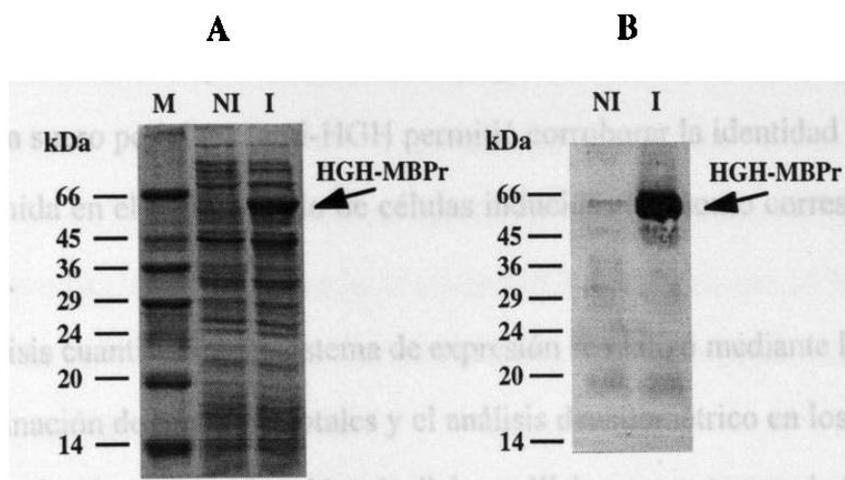


Figura 17. Análisis Cualitativo de HGH-MBPr en el Sistema de Expresión *E. coli* con pMALchGH22K. A) Análisis del sistema de expresión por SDS-PAGE. En el gel se muestran en los carriles M: marcador de peso molecular de proteínas, NI: homogenado de células no inducidas y N: homogenado de células inducidas. B) Análisis por Western-Blot. En el papel de nitrocelulosa se muestran los carriles NI: homogenado de células no inducidas y N: homogenado de células inducidas.

La separación de las proteínas en los homogenados celulares se realizó por SDS-PAGE (Figura 17, A). La identificación inicial de la banda de HGH-MBPr en el homogenado bacteriano obtenido en el sistema de expresión, se realizó empleando una gráfica semilogarítmica de peso molecular contra distancia recorrida por los marcadores de peso molecular de proteínas en el gel. En el homogenado de bacterias con pMALchGH22K inducidas (carril I), se identificó una banda de aproximadamente 65 kDa, la cual presentó intensidad mucho mayor que la banda correspondiente en el

homogenado de células no inducidas (carril NI). Dicha banda se identificó como la proteína de fusión HGH-MBPr producida por este sistema, ya que corresponde a la suma de los pesos moleculares de la HGH (22 kDa) y de la proteína de unión a maltosa (MBP) de 43 kDa; el peso molecular calculado para dicha banda corresponde en efecto al peso molecular de HGH-MBPr (65 kDa). La recta de correlación de logaritmo decimal del peso molecular y distancia recorrida por los marcadores mostró un coeficiente de correlación lineal (R^2) de 0.991.

Posteriormente se comprobó la presencia de dicha banda con la detección inmunológica de la misma por Western-Blot (Figura 17, B). La detección inmunológica empleando un suero policlonal anti-HGH permitió corroborar la identidad de la banda de 65 kDa obtenida en el homogenado de células inducidas (I), como correspondiente a la HGH-MBPr.

El análisis cuantitativo del sistema de expresión se realizó mediante la combinación de la determinación de proteínas totales y el análisis densitométrico en los homogenados celulares. Los densitogramas obtenidos de dicho análisis se muestran en la figura 18.

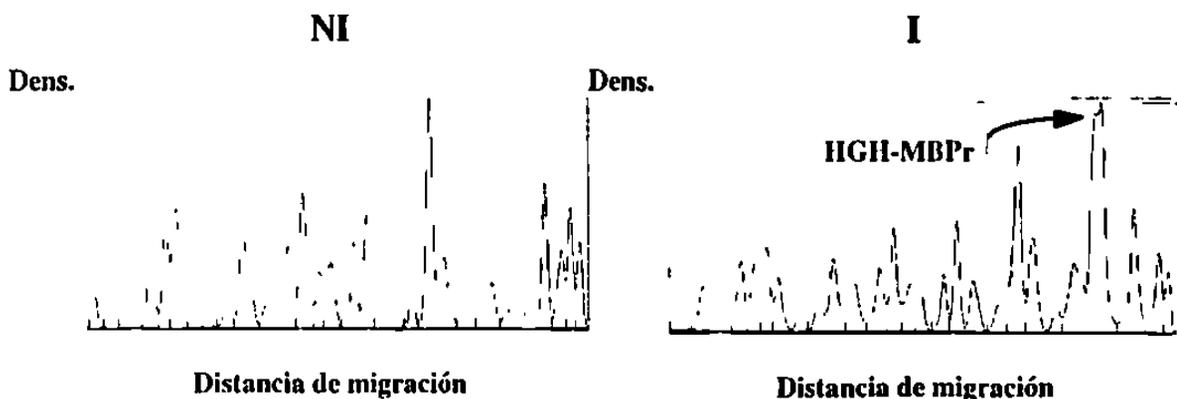


Figura 18. Análisis Densitométrico de HGH-MBPr en el Sistema de Expresión *E. coli* con pMALchGH22K. NI) Densitograma del homogenado de células no inducidas y N) Densitograma del homogenado de células inducidas. En este último se observa la presencia de un pico de alta densidad que correspondió a HGH-MBPr.

El densitograma correspondiente al homogenado de células inducidas (I) mostró un aumento en la altura del pico correspondiente a la banda de HGH-MBPr, en relación al densitograma obtenido del análisis del homogenado de células no inducidas (NI). El análisis por densitometría de la intensidad de color (densidad) de las bandas en los homogenados celulares obtenidas en los geles de poliacrilamida mostró un porcentaje relativo de la banda de HGH-MBPr mayor del 14 %.

Los resultados del análisis cuantitativo de proteínas totales en los homogenados bacterianos del sistema de expresión de *E. coli* pMALchGH22K se muestran en la tabla VI. La recta de calibración utilizada en la determinación de proteínas totales presentó una buena correlación con un R^2 de 0.998. En la tabla anterior también se presentan los porcentajes de HGH-MBPr y la cantidad de HGH-MBPr producida en mg/L de cultivo (niveles de producción). El porcentaje de HGH-MBPr fue mayor del 14 % y su nivel de producción fue mayor de 40 mg/L. Todos los valores calculados representan el promedio de tres ensayos realizados.

Tabla VI. Análisis de la Producción de HGH-MBPr. La tabla muestra los niveles de producción de HGHr obtenidos en los ensayos de fermentación del sistema de expresión de *E. coli* con pMALchGH22K realizados con la metodología del apartado 2.2.2.2. Los valores representan la media de los experimentos \pm su desviación estándar.

<i>E. coli</i> con pMALchGH22K	P.T. (mg/L) ^a	% HGH-MBPr ^b	HGH-MBPr (mg/L) ^c
Células no inducidas	45 \pm 8	1.1 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1
Células inducidas	306 \pm 18	15 \pm 1	46 \pm 6

a Proteínas totales determinadas por el método de Bradford, expresadas en mg/L de cultivo bacteriano

b Porcentaje de HGH-MBPr en los homogenados celulares obtenido por densitometría

c Nivel de producción de HGH-MBPr expresado en mg/L de cultivo bacteriano

La niveles de producción de HGH-MBPr en el sistema de expresión de *E. coli* con pMALchGH22K (46 mg/L) obtenidos con la metodología del apartado 2.2.2.2 fueron ligeramente mayores a los obtenidos para el sistema con pBHx. Sin embargo, la HGHr

de la proteína de fusión expresada por pMALchGH22K, sólo representa una tercera parte de la misma. Por lo tanto, el rendimiento real de HGHR es menor. A pesar de esto, el sistema de expresión con pMALchGH22K permite la purificación rápida de la HGH-MBPr en forma de cuerpos de inclusión y posteriormente la liberación de la HGHR de la proteína de fusión mediante digestión enzimática.

3.2.3 Evaluación de la Influencia de Variables en el Proceso de Fermentación

Los resultados del estudio de la influencia de variables que pueden afectar el proceso de fermentación del sistema de *E. coli* con pMALchGH22K se muestran a continuación. 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 figura 19, se muestra una gráfica con los niveles de producción obtenidos respecto al tiempo en cada uno de los ensayos de fermentación evaluados.

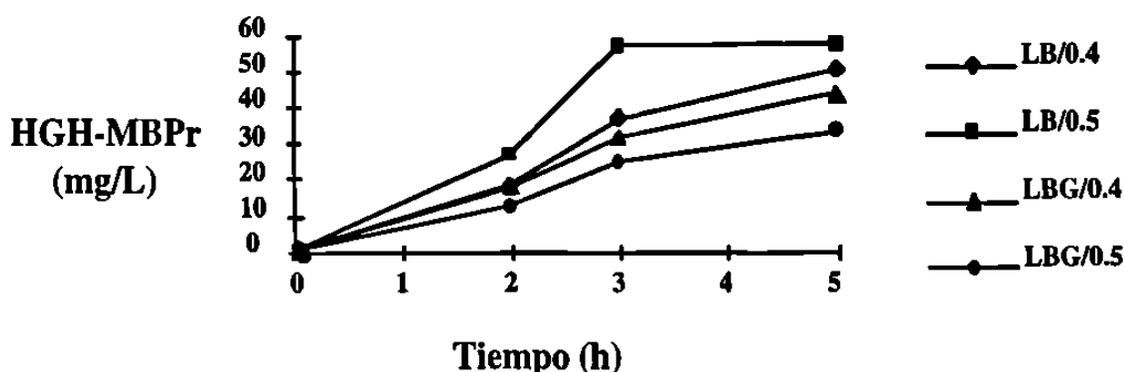


Figura 19. Influencia de las Variables de Fermentación sobre la Producción de HGH-MBPr. Producción de HGH-MBPr (mg/L) respecto al tiempo en cada uno de los ensayos de fermentación evaluados. Los puntos representan la media de tres ensayos. Los coeficientes de variación fueron menores del 20%.

Esta gráfica muestra la influencia de estas variables sobre los niveles de producción de HGH-MBPr. El empleo de una densidad óptica del cultivo bacteriano de 0.5 al inicio de la inducción, permitió obtener una mayor nivel de producción de HGH-MBPr a diferencia de utilizar un valor de 0.4. En este caso dicha influencia se observó a tiempos de inducción de 3 y 5 h sólo en ausencia de glucosa. La presencia de glucosa en el medio de cultivo a tiempos de inducción de 3 y 5 h sólo en ausencia de glucosa. La presencia de glucosa en el medio de cultivo a tiempos de inducción de 3 y 5 horas disminuyó el nivel de producción de HGH-MBPr. Esta influencia fue similar para los ensayos en donde se emplearon valores de 0.4 y 0.5 de densidad óptica al inicio de la inducción. El aumento del tiempo de inducción incrementó el nivel de producción de HGH-MBPr en presencia y ausencia de glucosa en el medio de cultivo.

En la figura 20 se muestra una gráfica con los valores del porcentaje relativo de HGH-MBPr obtenidos respecto al tiempo en cada uno de los ensayos de fermentación evaluados.

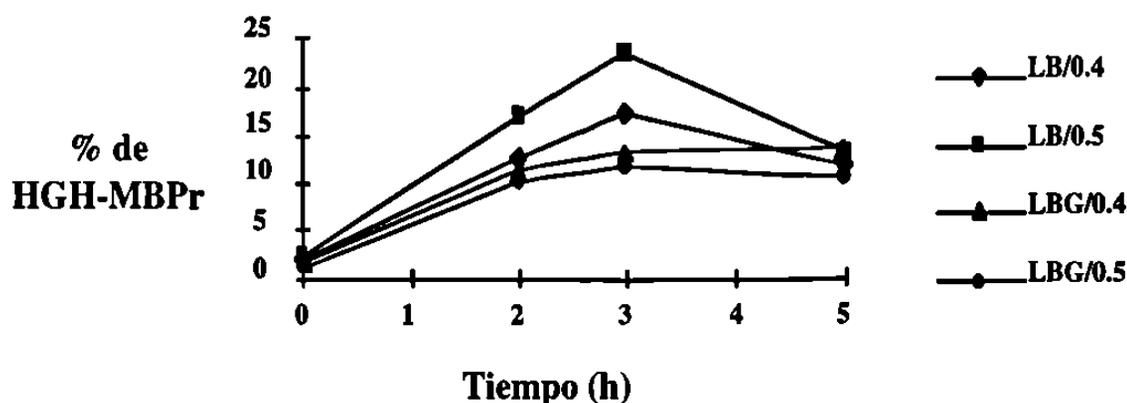


Figura 20. Influencia de las Variables de Fermentación sobre el Porcentaje Relativo de HGH-MBPr. Porcentaje relativo de HGH-MBPr obtenido en los homogenados celulares respecto al tiempo en cada uno de los ensayos de fermentación evaluados. Los puntos representan la media de tres ensayos. Los coeficientes de variación fueron menores del 20%.

Esta gráfica muestra la influencia de estas variables sobre el porcentaje relativo de HGH-MBPr. El empleo de una densidad óptica del cultivo bacteriano de 0.5 al inicio de

la inducción, permitió obtener un mayor porcentaje relativo de HGH-MBPr, a diferencia de utilizar un valor de 0.4. Esta influencia se observó solo a los tiempos de inducción de 2 y 3 h en ausencia de glucosa en el medio de cultivo. La presencia de la glucosa en el medio de cultivo disminuyó el porcentaje de HGH-MBPr al tiempo de inducción de 3 h. Un aumento en el tiempo de inducción provocó incremento sobre el porcentaje de HGH-MBPr, en los ensayos en ausencia de glucosa a 2 y 3 h de inducción.

Todos estos datos nos indican que al igual que en el sistema de *E. coli* con pBHX, la influencia de estas variables sobre la producción y el porcentaje de HGH-MBPr, depende de las diferentes combinaciones de las mismas. Por otro lado, se observó un incremento en el contenido de proteínas totales de los homogenados celulares respecto al tiempo de inducción (datos no mostrados), lo cual indicó un aumento de la masa celular bacteriana respecto al tiempo. Dicho incremento fue ligeramente mayor en ausencia de glucosa. Estos datos sugieren que la glucosa en el medio de cultivo a lo largo de la fermentación (de 2 a 5 h) presentó un menor efecto sobre el aumento en el contenido de proteínas totales, es decir, sobre la masa celular bacteriana. Por otro lado, en presencia de glucosa tuvo una menor influencia sobre el incremento del porcentaje relativo de HGH-MBPr.

Los resultados estadísticos de la evaluación de la influencia de las variables en la fermentación obtenidos mediante el análisis de los valores de producción (mg/L de cultivo) y de porcentajes relativos de HGH-MBPr, empleando una prueba *t* de Student para analizar diferencias significativas entre parejas de puntos con diferencias en una variable, se resumen en la tabla VII.

Los resultados del análisis de regresión lineal múltiple para conocer la influencia de cada una de las variables en el proceso de fermentación mostraron que existe una influencia importante de T.I. ($p = 9 \times 10^{-7}$), % G. ($p = 3 \times 10^{-6}$) y D.O. ($p = 4 \times 10^{-5}$) en orden decreciente sobre los niveles de producción de HGHr. Estos datos se obtuvieron comparando los valores de p obtenidos para cada una de las variables. Estos datos

sugieren que los niveles de producción dependen principalmente de la concentración del inductor (IPTG) en el sistema de expresión. Por otro lado, también son influenciados en menor grado por el aumento de la masa celular bacteriana a lo largo del tiempo. Así también, la densidad óptica al inicio de la inducción mostró cierta influencia, con lo cual se llegó a la conclusión de que los niveles de producción pueden ser incrementados mediante la combinación de valores para las diferentes variables y lograr así, la obtención de un nivel de producción óptimo de la proteína recombinante.

Tabla VII. Análisis de *t* de Student en la Biosíntesis de HGH-MBPr. La tabla muestra los resultados estadísticos de la evaluación de la influencia de las variables en la fermentación del sistema de expresión de *E. coli* con pMALchGH22K. Se muestra en donde SI existe influencia de cada variable en base a las diferencias significativas encontradas entre parejas de puntos con diferencias en una variable. El estudio estadístico empleó un valor de $\alpha = 0.05$.

Variable	HGH-MBPr (mg/L)	% HGH-MBPr
% Glc	Si	Si
D.O.	Si	Si
T.I.	Si	Si

% 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

El mayor nivel de producción de HGH-MBPr (60 mg/L de cultivo bacteriano) en estos ensayos se alcanzó realizando la fermentación del sistema de expresión a una D.O. al inicio de la inducción de 0.5 en medio LB durante 5 h y en presencia de IPTG 1 mM. Por otro lado, las condiciones de fermentación que permitieron un mayor porcentaje de HGHr (25 %) fueron una D.O al inicio de la inducción de 0.5, en medio LB durante 3 h de inducción y con IPTG 1 mM. Las condiciones de este último ensayo se utilizaron para la obtención del extracto enriquecido con HGH-MBPr.

3.3 Aislamiento de HGH-MBPr y Aislamiento y Purificación de HGHr

3.3.1 Análisis del Extracto Enriquecido con HGH-MBPr y del Extracto Enriquecido con HGHr

En la figura 21 se muestra el gel obtenido del análisis de los extractos enriquecidos de HGH-MBPr y HGHr.

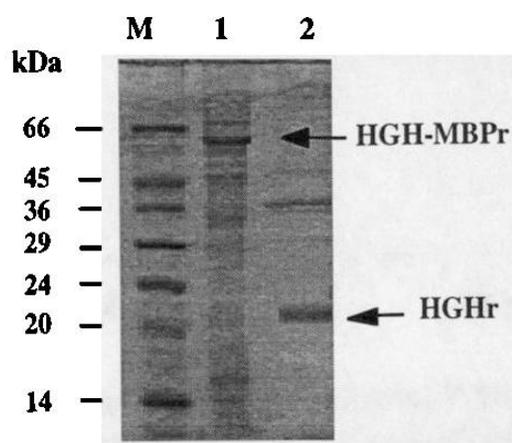


Figura 21 Análisis por SDS-PAGE de los Extractos Enriquecidos de HGH-MBPr y HGHr. Se muestra en el carril M el marcador de peso molecular de proteínas, en el carril 1 el extracto enriquecido con HGH-MBPr y en el carril 2 el extracto enriquecido de HGHr.

En el extracto enriquecido con HGH-MBPr obtenido se observó una banda de aproximadamente 65 kDa que correspondió a HGH-MBPr. El análisis densitométrico del gel de electroforesis mostró que dicha banda representa un 41 % respecto a las proteínas totales, además que durante el proceso de enriquecimiento se eliminaron algunas otras proteínas (ver figura 22, 1).

Se observó con la precipitación de la fracción soluble del homogenado de células inducidas del sistema de expresión de *E. coli* con pBHX, con sulfato de amonio al 20 % de saturación, una banda de aproximadamente 22 kDa que correspondió a HGHr. El análisis densitométrico del gel de electroforesis mostró que dicha banda representa un 43

% respecto a las proteínas totales, lo cual demostró que dicha precipitación eliminó algunas otras proteínas (ver figura 22, 2). Esto representó la obtención de una muestra más adecuada para la purificación.

En la figura 22 se muestran los densitogramas obtenidos del análisis de ambos extractos enriquecidos.

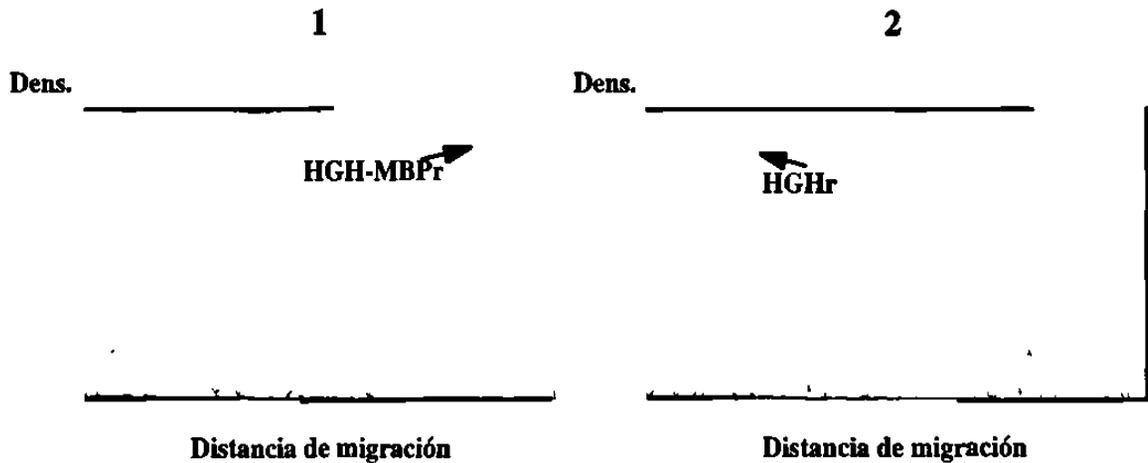


Figura 22 Análisis Densitométrico de los Extractos Enriquecidos de HGH-MBPr y HGHr. Se muestra en el carril 1 el extracto enriquecido con un 41 % de HGH-MBPr y en el carril 2 el extracto enriquecido con un 43 % de HGHr.

3.3.2 Identificación de HGHr por CLAR-FR

Los cromatogramas obtenidos del análisis por CLAR-FR de los homogenados de células no inducidas e inducidas se muestran en la figura 23.

Los cromatogramas mostrados en dicha figura corresponden al canal de detección a 215 nm. La comparación de ambos cromatogramas permitió identificar el pico correspondiente a HGHr ($t_R = 13.2$ min), el cual aparece en las células inducidas y no se observa en las células no inducidas. Esta identificación indirecta de HGHr fue posteriormente comprobada mediante un análisis de ELISA para HGHr de la fracción recolectada correspondiente al pico cromatográfico. Por otro lado, se puede observar que el pico de HGHr presenta una buena resolución respecto a los otros picos observados,

además de ser simétrico y agudo. La aparición del pico a 13.2 min con el empleo del gradiente en la fase móvil, indica una alta hidrofobicidad de la HGHR respecto a los otros componentes de la muestra. Por otro lado, se calculó el número de platos teóricos de este pico cromatográfico y su valor fue de 156593, el cual representa un número grande e indica una muy alta eficiencia en la columna y por lo tanto una buena separación.

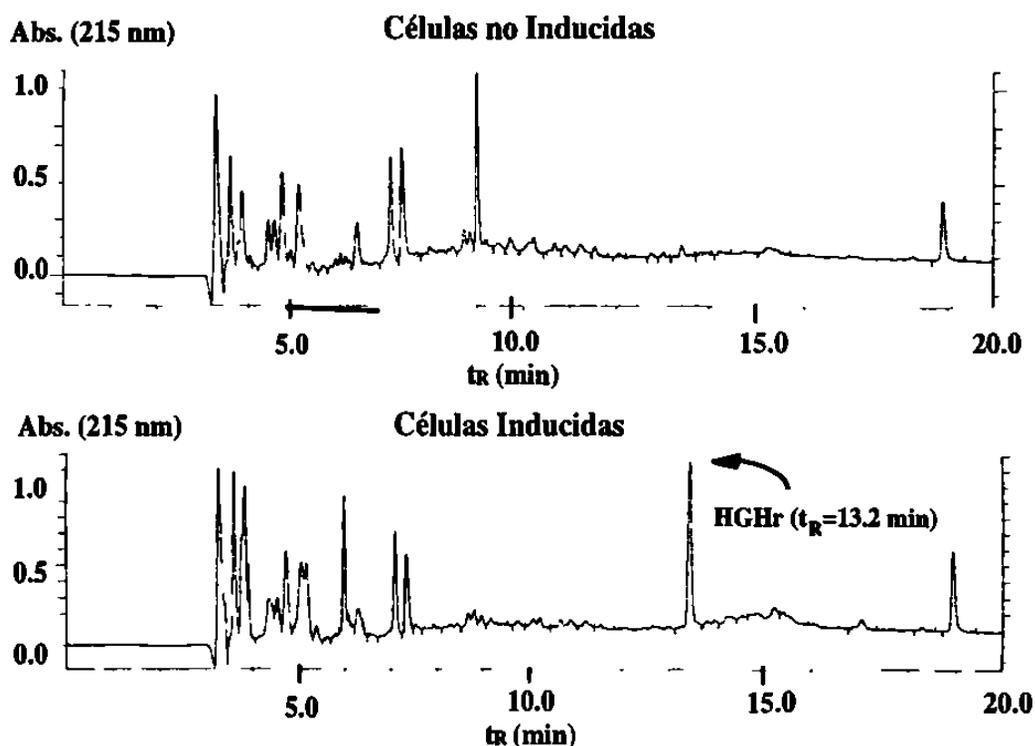


Figura 23. Análisis Cromatográfico del Sistema de Expresión de *E. coli* con pBHx. Cromatogramas correspondientes al análisis de la fracción soluble de los homogenados de células no inducidas e inducidas por CLAR-FR con detección a 215 nm. La comparación del perfil cromatográfico obtenido en ambos cromatogramas permitió la identificación del pico correspondiente a HGHR ($t_R = 13.2$ min) en el homogenado de células inducidas.

Un detalle importante de señalar, es la identificación de un pico cromatográfico a un t_R de 6.1 min en el homogenado de células inducidas, el cual se recolectó y analizó por ELISA contra HGHR. Dicho pico mostró reacción positiva con esta técnica, por lo cual podría ser una variante de HGHR producto de la manipulación de dicha muestra durante el proceso de análisis. El análisis por CLAR del homogenado celular obtenido en ausencia

de β -mercaptoetanol no mostró la presencia de este pico, por lo tanto, podría tratarse de una forma de tipo "clip" de HGhr, producto de un rompimiento proteolítico sobre HGhr.

3.3.3 Análisis Cromatográfico del Extracto Enriquecido con HGhr por CLAR-FR

El cromatograma obtenido del análisis del extracto enriquecido por CLAR-FR se muestra en la figura 24.

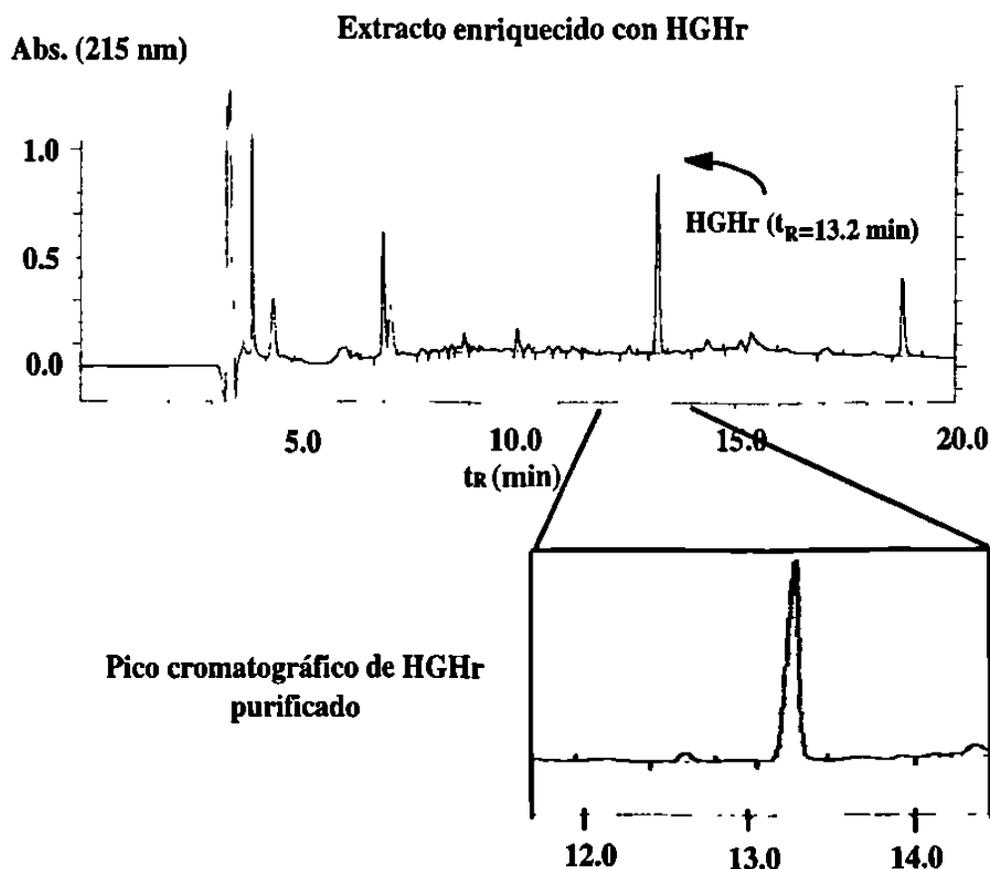


Figura 24. Análisis Cromatográfico del Extracto Enriquecido con HGhr. Cromatograma correspondiente a el extracto enriquecido con HGhr obtenido por análisis de CLAR-FR con detección a 215 nm. Se observó una disminución franca de otros componentes en la matriz. Además, el pico de HGhr es simétrico, agudo y se observó resuelto de los otros componentes.

En dicho cromatograma se observó el pico cromatográfico de 13.2 min correspondiente a HGhr, con características similares al obtenido a partir del homogenado de células inducidas. Además, se observó una disminución en los otros componentes de la muestra. Este pico fue recolectado de forma manual para su posterior análisis.

3.3.4 Evaluación de la Purificación

Los resultados de la evaluación del proceso de purificación de HGhr a partir de un sistema de expresión bacteriano, se muestran en la tabla VIII.

Tabla VIII. Evaluación de la Purificación de HGhr. Se muestran las diferentes etapas de la purificación de HGhr y los parámetros evaluados en cada una de ellas.

Etapas	P.T. (µg)	HGhr (µg)	% HGhr	Purificación*	Recuperación (%)
HC	10130	2373	23.4	1.0	100
FS	8380	1123	13.4	0.6	47
EE	716	313	43.7	1.9	13
FP	17	15	92.4	3.9	0.7

HC: Homogenado Celular, FS: Fracción Soluble, EE: Extracto Enriquecido, FP: Fracción Purificada.

P.T.: Cantidad de proteína total. % HGhr: indica la pureza determinada por análisis densitométrico.

*: El valor indica cuantas veces mejoró la pureza de HGhr obtenida en cada etapa respecto a la primera.

En dicha tabla se muestran los valores de proteínas totales determinados por Bradford, el porcentaje de HGhr obtenido por densitometría y el cálculo de la cantidad de HGhr determinada por la fórmula del apartado 2.2.2.3.3. El proceso de purificación mostró una recuperación final de 0.7 % de HGhr. Por otro lado, el porcentaje de HGhr en las muestras (pureza) aumentó desde un 23 % hasta un 92 %, lo cual representó un

aumento de 4 veces más el valor inicial en la purificación de HGHR . Por otro lado, el rendimiento final del proceso de purificación fue de 150 $\mu\text{g/L}$ de cultivo bacteriano.

Los resultados de la evaluación de la etapa cromatográfica de purificación de HGHR empleando la CLAR-FR se muestran en la tabla IX. En dicha tabla se muestran los valores de proteínas totales determinados por Bradford, el porcentaje de HGHR obtenido por densitometría y el cálculo de la cantidad de HGHR determinada por la fórmula del apartado 2.2.2.3.3. Además se muestra la determinación de la cantidad de HGHR obtenida por el ensayo de ELISA correspondientes a las muestras antes y después de la purificación por CLAR-FR.

Tabla IX. Evaluación de la Etapa Cromatográfica en la Purificación de HGHR. Se muestran los parámetros evaluados en la etapa cromatográfica de la purificación de HGHR mediante CLAR-FR. Comparación entre la combinación del análisis de proteínas totales y densitometría y el análisis de HGHR mediante ELISA.

Etapa	P.T. (μg)	% HGHR	HGHR (μg)	HGHR (ng)*	Recuperación (%)
EE	716	43.7	313		
FP	17	92.4	15		4.9
EE				126	
FP				6	4.8

EE: Extracto Enriquecido, FP: Fracción Purificada

P.T.: Cantidad de proteína total. % HGHR: indica la pureza determinada por análisis densitométrico

*: Cantidad de HGHR determinada por ELISA

Los resultados de la tabla muestran un valor de 4.9 % de recuperación de HGHR en la etapa cromatográfica, determinada por ambas estrategias. Dicho valor bajo influyó en el rendimiento total de la purificación. Sin embargo, la evaluación de la pureza de HGHR determinada por densitometría en las fracciones antes y después de la etapa cromatográfica aumentó de un 42 % a un 90 %.

Los resultados obtenidos en la determinación de HGHR por ELISA difieren de manera importante respecto al valor calculado de HGHR mediante proteínas totales y %

de HGhr. Lo anterior, puede deberse a una degradación parcial de la proteína (post-recolección), específicamente durante el paso de eliminación de la fase móvil. El hecho de una probable descomposición de la HGhr, se apoyó en ciertos hallazgos experimentales realizados con la fracción purificada, la cual al ser sometida a análisis por métodos inmunológicos como el ELISA e inmunodot mostró baja reactividad. Además, con el análisis de la muestra por SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie no se logró observar una banda definida de 22 kDa. Sin embargo, con el empleo de un método de tinción con plata se logró observar una banda muy difusa de alrededor de 22 kDa. Por último, la muestra purificada se analizó nuevamente por CLAR-FR y se encontró la aparición de algunos picos cromatográficos con tiempos de retención muy cercanos al pico de HGhr, asimétricos, anchos con colas y muy poco resueltos entre sí. El pico de HGhr apareció al tiempo de retención esperado, sin embargo su altura fue muy pequeña respecto a los nuevos picos cromatográficos encontrados. Los resultados anteriores no se muestran en este trabajo.

Es importante señalar que la recuperación y el rendimiento en la purificación de una proteína, depende de manera importante de las propiedades estructurales y fisicoquímicas de las mismas. En el caso del análisis de la recuperación de HGhr por medio de CLAR-FR se han descrito rendimientos altos, sin embargo, han sido descritos rendimiento bajos parecidos a los encontrados en este trabajo.

3.4 Producción de Anticuerpos Monoclonales anti-HGhr

3.4.1 Evaluación de la Respuesta de Anticuerpos contra HGhr

La respuesta de anticuerpos anti-HGhr en ratones BALB/c se muestra en la figura 25. Se analizó el suero de los ratones diluido 1:100 a los 0, 15, 30 y 45 días por ELISA.

Los resultados muestran un aumento en el contenido de anticuerpos en el suero a lo largo del tiempo con el esquema de inmunización utilizado. Por tal motivo, dichos ratones fueron adecuados para la extracción del bazo utilizado en los ensayos de fusión celular.

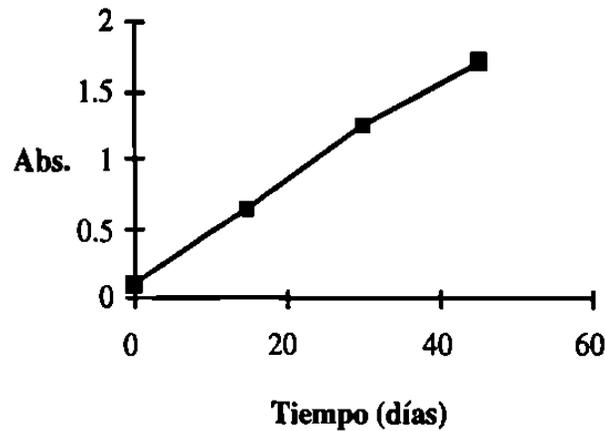


Figura 25 Evaluación de la Respuesta de Anticuerpos anti-HGhr en Ratones BALB/c. Los puntos representan el promedio del análisis de 5 ratones inmunizados. Se muestran los valores de absorbancia obtenidos por ELISA correspondientes a los sueros diluidos 1:100, analizados a los 0, 15, 30 y 45 días.

Por otro lado, se realizó el análisis de HGhr en los sueros mediante varias técnicas como ELISA, Inmunodot y Western-Blot. En la tabla X se muestran dichos resultados. Se señala el título más alto obtenido para los sueros del día 45 en cada una de las técnicas.

Tabla X Título de anticuerpos anti-HGhr séricos en ratones BALB/c. Se muestra el título obtenido por diferentes técnicas de análisis. El suero analizado fue el de los 45 días.

Técnica de Análisis	Título de Anticuerpos
ELISA	1:1000 ^a
Inmunodot	1:700 ^b
Western-Blot	1.2000 ^c

a: HGh como antígeno

b: Fracción soluble con HGhr obtenida a partir de un homogenado bacteriano

c: Homogenado de células inducidas de *E. coli* pBHx con HGhr

Estos resultados muestran el título de anticuerpos al cual aún se observa señal positiva a la presencia de anti-HGHr en cada una de las técnicas evaluadas. En el caso del análisis por ELISA se consideró como señal positiva valores de absorbancia por arriba de 0.2, por otro lado, tanto en el análisis por Inmunodot y Western-Blot se consideró señal positiva la presencia de una mancha de mayor intensidad que el control negativo (suero 0 días).

3.4.2 Sensibilidad a Aminopterina de las Líneas Celulares

La determinación de la sensibilidad se realizó utilizando una prueba estadística de *t* de Student para comparar los ensayos en presencia y ausencia de aminopterina buscando diferencias significativas entre ambos con un valor de $\alpha = 0.05$. Estos estudios estadísticos mostraron diferencias significativas a los 24, 48, 72 y 96 días con valores de *p* menores de 0.05.

Los resultados de la evaluación de la sensibilidad de la línea celular de mieloma murino P3X63Ag8U.1 a aminopterina se muestran en la figura 26.

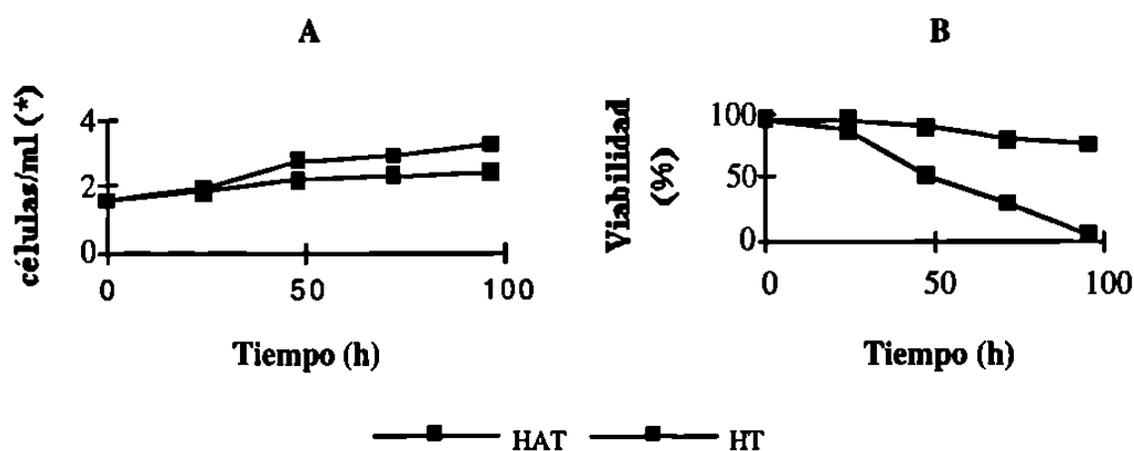


Figura 26 Sensibilidad a Aminopterina de la Línea Celular P3X63Ag8U.1. Las gráficas muestran la sensibilidad a aminopterina determinando la proliferación celular (A) y determinando la viabilidad celular (B). Los

valores representan la media de tres ensayos. (*: el valor de eje y se multiplica por 1×10^6).

Los resultados de la evaluación de la sensibilidad a aminopterina de las línea celular de mieloma murino P3X63Ag8.653 se muestran en la figura 27.

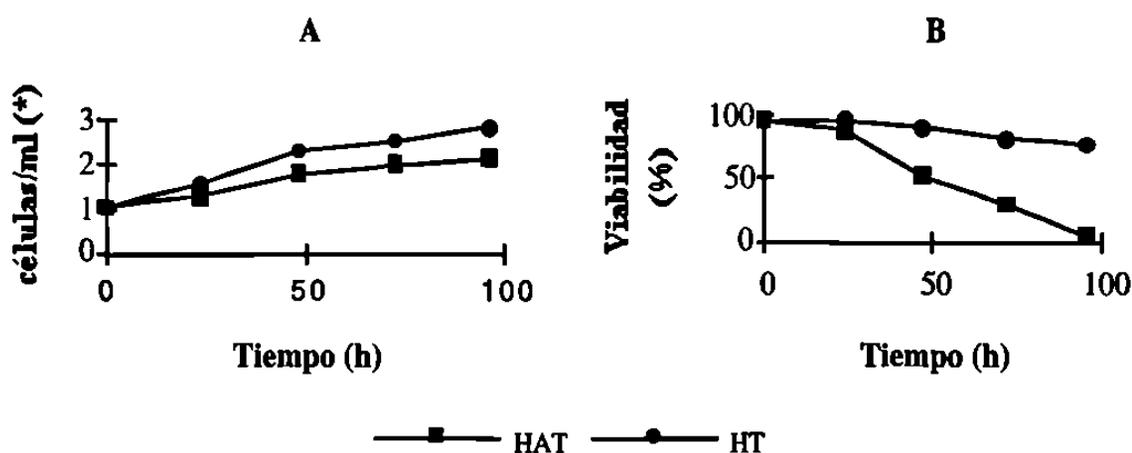


Figura 27 Sensibilidad a Aminopterina de la Línea Celular Ag8.653. Las gráficas muestran la sensibilidad a aminopterina determinando la proliferación celular (A) y determinando la viabilidad celular (B). Los valores representan la media de tres ensayos. (*: el valor de eje y se multiplica por 1×10^6)

Los resultados mostraron que ambas líneas celulares de mieloma murino evaluadas fueron sensibles a la aminopterina, lo cual era esperado ya que éstas anteriormente ya se habían utilizado en los procedimientos de fusión celular para la producción de anticuerpos monoclonales.

3.4.3 Ensayos de Fusión

Los resultados obtenidos en los ensayos de fusión celular y las condiciones empleadas en cada una de ellas se muestran en la tabla XI. Estos resultados muestran que el uso de PEG al 25 % permite una mayor eficiencia en la fusión celular, ya que se

obtiene un porcentaje mayor de proliferación celular de tipo hibridoma. Por otro lado, la adición de un preparado de macrófagos en los ensayos de fusión no reflejó una mayor proliferación celular en los ensayos de la línea celular de P3X63Ag8U.1. Las mejores condiciones empleadas en los ensayos de fusión celular fueron las correspondientes al ensayo de fusión 4. Incluso sólo en este se logró obtener señal positiva contra anti-HGhr.

Tabla XI. Ensayos de Fusión Celular. Se muestran cada uno de los ensayos de fusión celular, las condiciones utilizadas en ellas así como, los resultados de proliferación celular de hibridomas y presencia de anti-HGhr en los mismos.

Fusión	Línea Celular	C.F.C.	P. C. (%)	H.P. (%)
1	P3/NSI/1.Ag4.1	PEG 25 %	0	0
2	P3X63Ag8U.1	PEG 25 %	8	0
		PEG 50 %	2	0
3	P3X63Ag8U.1	Macrófagos	12	0
		Sin Macrófagos	13	< 0.2
		Medio Enriquecido		
4	P3X63Ag8U.1	Sin Macrófagos	8	0
	P3X63Ag8.653	Medio Enriquecido	11	3
		PEG 25 %		

C.F.C.: Condiciones de los Ensayos de Fusión Celular, P.C.: Porcentaje de proliferación celular, H.P.: Porcentaje de hibridomas positivos a anti-HGhr. PEG: polietilenglicol.

Estos resultados muestran que el uso de PEG al 25 % permite una mayor eficiencia en la fusión celular, ya que se obtiene un porcentaje mayor de proliferación celular de tipo hibridoma. Por otro lado, la adición de un preparado de macrófagos en los ensayos de fusión no reflejó una mayor proliferación celular en los ensayos de la línea celular de P3X63Ag8U.1. Las mejores condiciones empleadas en los ensayos de fusión celular fueron las correspondientes al ensayo de fusión 4 empleando la línea celular P3X63Ag8.653. Incluso sólo en éste se logró obtener señal positiva contra anti-HGhr. Por otro lado, el porcentaje de cultivos positivos por proliferación celular de tipo

hibridoma fue del 10 % y en el caso de los cultivos de hibridomas productores de anti-HGhr fue de solo un 3 %.

Los cultivos producto de la fusión celular se observaron al invertoscopio y se lograron observar focos de crecimiento de tipo hibridoma en ellos. En algunos casos este crecimiento fue aparente al tercer día después de la fusión celular, el cual a simple vista se observó como colonias celulares adheridas al fondo del pozo de cultivo. Por otro lado, con ayuda del invertoscopio se logró visualizar otros focos de crecimiento no aparentes a simple vista. En la figura 28 se muestran dos fotografías de hibridomas en cultivo obtenidas mediante microscopía de contraste de fases.

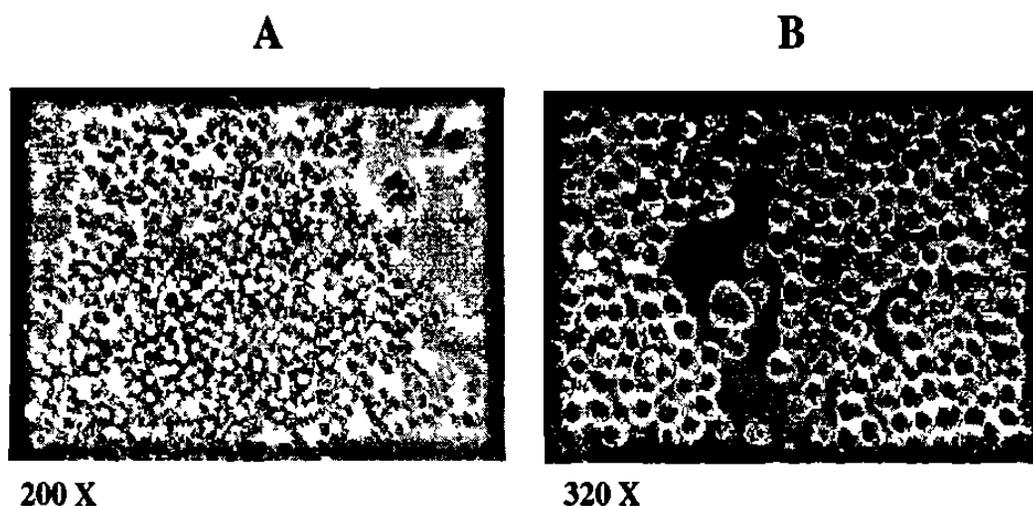


Figura 28 Fotografías de Hibridomas en Cultivo obtenidas por Microscopía de Contraste de Fases. A: Hibridoma en crecimiento al tercer día después de la fusión celular. B: Cultivo de hibridoma productor de anti-HGhr.

3.4.4 Selección de Hibridomas Productores de anti-HGhr

3.4.4.1 Ensayos de Inmunodot

El análisis de los sobrenadantes de algunos hibridomas obtenidos se realizó inicialmente mediante un ensayo de inmunodot sobre papel de nitrocelulosa. Los resultados de estos análisis se muestran en la figura 29.

En estos ensayos no se logró detectar la presencia de anticuerpos anti-HGHr en los sobrenadantes de los cultivos de hibridomas que se analizaron (Figura 29, fila 3A a 3I y fila 5A a 5I). Por otro lado, mediante esta técnica se logró detectar la presencia de anticuerpos anti-HGHr en el suero del día 45 del ratón inmunizado (Figura 29, 1I), utilizando como antígeno el líquido de fermentación de un sistema de expresión de HGHR en *Pichia pastoris* (35); el control negativo (suero día 0) no presentó señal importante (Figura 29, 1H). Además, estos mismos controles se analizaron utilizando como antígeno la fracción soluble de un homogenado bacteriano inducido que contenía HGHR. Los controles positivos (Figura 29, 1A...1F) presentaron señal, a diferencia del control negativo (Figura 29, 1G).

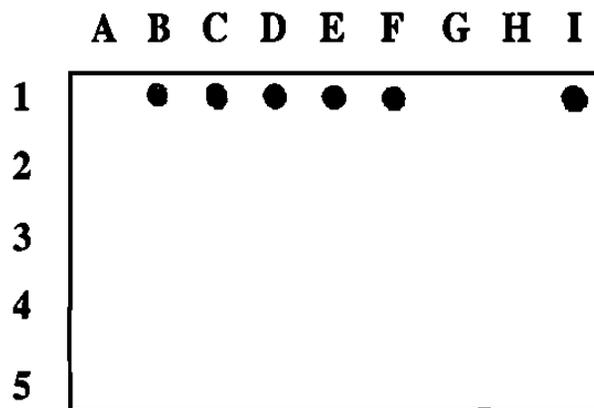


Figura 29 Detección de anti-HGHr en Sobrenadantes de Cultivos de Hibridomas por Inmunodot. Se observó una señal negativa en los análisis de sobrenadantes (2A a 5I) sin diluir. Los pozos del 1A al 1F son diferentes diluciones del suero a los 45 días del ratón inmunizado. El control negativo (1G) fue el suero del día 0 diluido 1:100.

3.4.4.2 Ensayos de ELISA

El análisis de los sobrenadantes de algunos hibridomas obtenidos se realizó mediante un ensayo de ELISA. Los resultados de estos análisis se muestran en la figura 30. Al igual que en los resultados anteriores no se logró detectar la presencia de anticuerpos anti-HGHr en los sobrenadantes de cultivos de hibridomas analizados

(Figura 30, pozos del C1 al H2). Los controles positivos (Figura 30, B1 y B2) como se esperaba mostraron señal positiva específica a la presencia de anticuerpos anti-HGHr. Los controles negativos así mismo no presentaron señal.

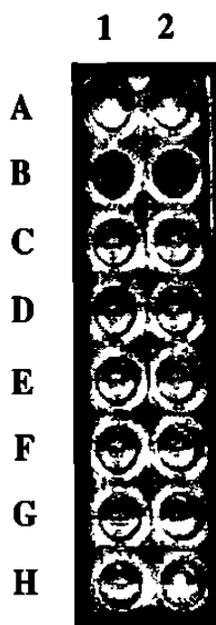


Figura 30 Detección de anti-HGHr en Sobrenadantes de Cultivos de Hibridomas por ELISA. No se observó señal en los sobrenadantes (C1 a H2). Los pozos del B1 al B2 son diferentes diluciones del suero a los 45 días del ratón inmunizado. El control negativo (A1) fue el suero del día 0 diluido 1:100.

3.4.4.3 Ensayos de Western-Blot

El análisis de los sobrenadantes de algunos hibridomas obtenidos se realizó mediante un ensayo tipo Western-Blot. Los resultados de estos análisis se muestran en la figura 31. Se detectaron algunas clonas positivas para la presencia de anticuerpos anti-HGHr y algunas otras proteínas (Figura 31, B4). Por lo tanto, estos cultivos fueron sometidos a la etapa de clonación a dilución limitante.

Se observó no sólo la presencia de la banda específica contra HGHr, sino además algunas bandas para otras proteínas. Pero siempre, se encontró una banda de menor peso molecular (19 kDa) que la HGH (22 kDa) y con una intensidad muy semejante. Esto

coincide con los resultados del análisis por SDS-PAGE de homogenados celulares inducidos por tiempos prolongados para la producción de HGHR. En donde se observó la presencia de una banda con iguales características (estos datos no se muestran). Podría por otro lado, tratarse del pico cromatográfico adicional encontrado en el análisis por CLAR de los homogenados bacterianos inducidos. Por tal motivo, seguiría existiendo la posibilidad de que se tratara de una variante de HGHR producto de proteólisis.

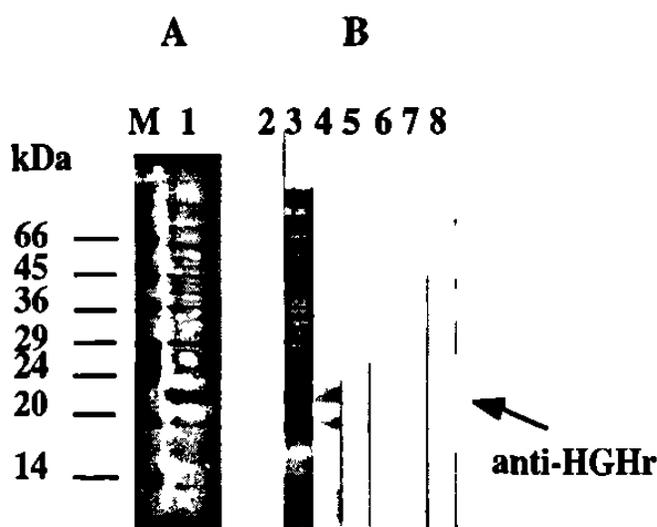


Figura 31 Detección de anti-HGHR en Sobrenadantes de Cultivos de Híbridomas por Western-Blot. A: Análisis por SDS-PAGE del antígeno utilizado (1) y del marcador de peso molecular (M). B: Análisis de algunos sobrenadantes de cultivos bacterianos por Western-Blot (4 al 8), suero control positivo (3) y suero control negativo (2). La tirilla 4 muestra la presencia de anticuerpos anti-HGHR en dicho sobrenadante.

3.4.5 Clonación de Hibridomas Productores de anti-HGHr

3.4.5.1 Ensayo de Clonación a Dilución Limitante

Los sobrenadantes de los hibridomas positivos para anti-HGHr que fueron sometidos a clonación a dilución limitante fueron analizados por la técnica de Western-Blot, con la cual no se logró detectar clonas positivas para anti-HGHr. Así mismo, se realizaron otros análisis con los sobrenadantes mediante ELISA e Inmunodot y los resultados fueron negativos. Por otro lado, no se encontró producción de anticuerpos en ninguno de los cultivos de hibridomas clonados. Para comprobar si estos cultivos eran hibridomas y no la propia línea celular se sometieron a ensayos de sensibilidad a aminopterina, y se encontró efectivamente que eran hibridomas ya que estos proliferaron y mantuvieron su viabilidad en el medio HAT.

Estos resultados indican la probabilidad de detectar de forma inespecífica la presencia de anticuerpos anti-HGHr mediante el método de selección por Western-Blot, los cuales no fueron detectados en la etapa de clonación. Esta duda se sostiene aun, ya que la presencia de las bandas detectadas por Western-Blot no aparecieron en el control negativo (suero no inmune), sin embargo, la exposición de este a tiempos de incubación largos durante la detección permitió la detección de algunas de estas bandas.

Por otro lado, se sugirió que los anticuerpos anti-HGHr detectados en una etapa inicial sean realmente dirigidos contra la proteína nativa y no contra una proteína desnaturalizada utilizada como antígeno en los ensayos de Western-Blot e Inmunodot, sin embargo, los ensayos de Western-Blot realizados en condiciones no desnaturalizantes no indicaron la presencia de anticuerpos anti-HGHr.

Ante esta duda, los hibridomas sometidos a clonación se almacenaron para posteriores análisis y se determinó que el paso siguiente era realizar un nuevo ensayo de fusión celular, ya que en el último ensayo sólo hubo proliferación de hibridomas en 10 cultivos celulares.

4

CONCLUSIONES

Las condiciones utilizadas en los ensayos de expresión fueron suficientes para permitir la inducción eficiente de la biosíntesis de HGH por los sistemas de expresión utilizados. Sin embargo, es necesario optimar dichas condiciones para lograr una mayor producción de la proteína recombinante.

El análisis cualitativo y cuantitativo de los homogenados bacterianos utilizando la combinación de determinación de proteínas totales por el método de Bradford y el análisis densitométrico sobre geles de electroforesis, permitió la evaluación de los niveles de producción de HGH en los sistemas de expresión utilizados. Dicha evaluación mostró resultados similares a otras evaluaciones reportadas en la literatura con sistemas de expresión semejantes.

Los resultados de los niveles de producción obtenidos en ambos sistemas evaluados fueron muy similares, sin embargo, el rendimiento en la producción de HGH por cada uno de estos sistemas fue diferente.

La evaluación de la influencia de las variables de fermentación sobre los niveles de producción de HGH en ambos sistemas, mostró que existe una influencia importante de T.I., % Glc. y D.O., en orden decreciente. Además, dichas variables influyen en menor grado sobre el porcentaje relativo de HGH en los homogenados celulares.

El método de elución estandarizado para el análisis de HGHr por CLAR en fase reversa permitió la resolución del pico cromatográfico correspondiente a HGHr. Además,

la eficiencia de la separación fue muy buena, ya que se obtuvo un número de platos teóricos alto para dicho pico cromatográfico.

La identificación indirecta del pico cromatográfico de HGHR en los homogenados celulares por CLAR-FR es una alternativa para el análisis cualitativo de sistemas de expresión recombinantes. Este método mostró ser adecuado, especialmente cuando no se cuenta con suficiente estándar de proteína pero se tiene un sistema de expresión eficiente. Por otro lado, mediante este método se logró la separación y recolección simultánea de un pico cromatográfico relacionado a HGHR, el cual no podría ser separado con mayor facilidad si se empleara un método de electroforesis en gel.

El empleo de varias técnicas para evaluar la pureza de la fracción con el analito de interés, mostró ser una herramienta útil para poder detectar algún problema de descomposición durante el proceso de purificación.

El empleo de una etapa cromatográfica como la CLAR-FR para la purificación de HGHR permitió obtener una pureza aceptable de la HGHR recuperada, a pesar de la baja recuperación que mostró la técnica.

El esquema de inmunización utilizado sobre ratones BALB/c provocó una buena respuesta de anticuerpos contra HGHR, encontrándose en los sueros títulos de anticuerpos anti-HGHR altos. Por otro lado, las diferentes metodologías inmunológicas utilizadas para la detección de anticuerpos anti-HGHR en los sueros de los ratones fueron adecuadas.

La metodología empleada en la fusión celular y análisis de anticuerpos permitió obtener y seleccionar hibridomas productores de anticuerpos anti-HGHR. Sin embargo, no se concluyó con la obtención de los anticuerpos monoclonales correspondientes.

BIBLIOGRAFIA

1. Brown, C.M.; Campbell, I.; Priest, F.G. (1989). Introducción a la Biotecnología. pp. 1-5. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
2. Wilhelmi, A.E. (1961). Fractionation of human pituitary glands. *Can. J. Biochem. Physiol.* **39**: 1659-1668.
3. Li, C.H.; Dixon, J.S.; Chung, D. (1971). Primary structure of the human chorionic somatomammotropin (HCS) molecule. *Science* **173**: 56-58.
4. Niall, H.D. (1971). Revised primary structure for human growth hormone. *Nature New Biol.* **230**: 90-91.
5. Li, C.H. (1982). Human growth hormone: 1971-1982. *Mol. Cell. Biochem.* **46**: 31-41.
6. Devos, M.A.; Ultsch, M.; Kossiakoff, A.A. (1992). Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of complex. *Science* **255**: 306-312.
7. Wilhelmi, A.E. (1975). Chemistry of growth hormone en : *Handbook of Physiology* Vol. 4 (R.O. Greep y E.B. Astwood, eds.). pp. 59-78. American Physiology Society, Washington, D.C.
8. Baumann, G. (1991). Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. *Endocrine Reviews* **12** (4): 424-449.
9. Isaksson, O.G.P.; Edén, S.; Jansson J.O. (1985). Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. *Ann. Rev. Physiol.* **47**: 483-499.
10. Erickson, D. (1990). Big time orphan. Human growth hormone could be a blockbuster. *Scientific American* **263** (3): 116-118.
11. Norman, C. (1985). Virus scare halts hormone research. *Science* **228**: 1176-1177.

12. Underwood, L.E.; Fisher, D.A.; Frasier, D.A.; Gertner, J.M.; Kaplan S.L.; Kirkland, R.T.; Lipne, B.N.; Raiti, S. (1985). degenerative neurologic disease in patients formerly treated with human growth hormone. *J. Pediatr.* **107**: 10-12.
13. Shatzman, A.R.; Rosenberg, M. (1987). Expression, identification, and characterization of recombinant gene products in *Escherichia coli* en: *Methods in Enzimology: Guide to Molecular Cloning Techniques* Vol. 152 (S.L. Berger y A.R. Kimmel, eds.). pp. 661-673. Academic Press, Inc., Londres.
14. Ausbel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. Eds. (1992). Expression of proteins in *Escherichia coli* en: *Short Protocols in Molecular Biology* 2da. edición, pp. 16-4 a 16-31. John Wiley & Sons, USA.
15. Goeddel, D.V. (1991). Systems for heterologous gene expression en: *Methods in Enzimology: Gene Expression Technology* Vol. 185 (Goeddel, D.V., ed.). pp. 3-7. Academic Press, Inc., San Diego, C.A. USA.
16. Seeburg, P.H. (1982). The human growth hormone gene family: nucleotide sequence show recent divergence and predict a new polypeptide hormone. *DNA* **1**: 239-249.
17. Troung, A.T.; Duez, C.; Belayew, A.; Renard, A.; Pictet, R.; Bell, G.I.; Martial, J.A. (1984). Isolation and characterization of the human prolactin gene. *The EMBO Journal* **3**: 429-437.
18. Martial, J.A.; Hallewell, R.A.; Baxter, J.D.; Goodman, H.M. (1979). Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science*. **205**: 602-607.
19. Goeddel, D.V.; Heyneker H.L.; Hozumi, T.; Arentzen, R.; Itakura, K.; Yansura, D.G.; Ross, M.J.; Miozzari, G.R.; Seeburg, P. (1979). Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* **281**: 544-548.
20. Gray, G.L.; Baldrige, J.S.; McKeown, K.S.; Heyneker, H.L.; Chang, C.N. (1985). Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in *Escherichia coli*: natural and bacterial signal sequences are interchangeable. *Gene* **39**: 247-254.
21. Matteucci, M.; Lipetsky, H. (1986). Alkaline phosphatase fusions: a tag to identify mutations that result in increased expression of secreted human growth hormone from *E. coli*. *Biotechnology* **4**: 51-55.
22. Becker, G.W.; Hsiung, H.M. (1986). Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **204**: 145-150.

23. Chang, C.N.; Rey, M.; Bochner, B.; Heyneker H.; Gray, G. (1987). High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*. *Gene* **55**: 189-196.
24. Hsiung, H.M.; Cantrell, A.; Luirink, J.; Oudega, B.; Veros, A.J.; Becker, G.W. (1989). Use of bacteriocin release protein in *E. coli* for excretion of human growth hormone into the culture medium. *Gene* **7**: 267-271.
25. Uhlén, M.; Moks, T. (1991). Gene fusions for purpose of expression: An introduction en: *Methods in Enzimology: Gene Expression Technology* Vol. 185 (Goeddel, D.V., ed.). pp. 129-143. Academic Press, Inc., San Diego, C.A. USA..
26. Anba, J.; Baty, D.; Llobès, R.; Pagès, J.M.; Joseph-Liauzun, E.; Shire, D.; Roskam, W.; Lazdunski, C. (1987). Expression vector promoting the synthesis and export of the human growth-hormone-releasing factor in *Escherichia coli*. *Gene* **53**: 219-226.
27. Smith, D.B.; Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31-40.
28. Guan, K.L.; Dixon, J.E. (1991). Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: An improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with Glutathione S-Tranferase. *Annal. Biochem.* **192**: 262-267.
29. Duplay, P.; Bedouelle, H.; Fowler, A.; Zabin, I.; Saurin, W.; Hofnung, M. (1984). Sequences of the *malE* gene and its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* **259**: 10606-10613.
30. Nagia, K.; Thøgersen, C. (1984). Generation of b-globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein in *Escherichia coli*. *Nature* **309**: 810-812.
31. Maina, C.V.; Riggs, P.D.; Grandea, A.G. III; Slatko, B.E.; Moran, L.S.; Tagliamonte, J.A.; McReynolds, L.A.; Guan, C. (1988). A vector to express and purify foreign proteins in *Escherichia coli* by fusion to, and separation from, maltose-binding protein. *Gene* **74**: 365-373.
32. Guan, C.; Li, P.; Riggs, P.D.; Inouye, H. (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**: 21-30.
33. Brosius, J.; Holy, A. (1984). Regulation of ribosomal RNA promoters with synthetic lac operator. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 6929-6933.
34. Tokunaga, T.; Iwai, S.; Gomi, H.; Kodama, K.; Ohtsuka, E.; Ikehara, M.; Chisaka, O.; Matsubara, K. (1985). Expression of synthetic human growth hormone gene in yeast. *Yeast* **39**: 117-120.

35. Escamilla-Treviño, L.L. (1996). Biosíntesis de la hormona del crecimiento humana (GHr) en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. Tesis de Maestra. Facultad de Medicina, U.A.N.L.
36. Franchi, E.; Maisano, F.; Testori, S.A.; Galli, G.; Toma, S.; Parente, L.; Ferra, F.D.; Grandi, G. (1991). A new human growth hormone production process using a recombinant *Bacillus subtilis* strain. *J. Biotechnology* **18**: 41-54.
37. Ortiz-López, R. (1992). Obtención de líneas celulares productoras de las isoformas de 20 y 22 kDa de la hormona del crecimiento humano. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, U.A.N.L.
38. Pavlakis, G.N.; Hizuka, N.; Gorden, P.; Seburg, P.H.; Hamer, D.H. (1981) Expression of two human growth hormone genes in mokey cell infected by simian virus 40 recombinants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 7398-7402.
39. Chapman, G.E.; Roger, K.M.; Brittain, T.; Bradshaw, R.A.; Bates, O.J.; Turner, C.; Cary, P.D; Crane-Robinson, C. (1980). The 20,000 molecular weight variant of human growth hormone. *J. Bio. Chem.* **256**: 2395-2401.
40. Wood, D.C.; Salsgiver, W.J.; Kasser, T.R.; Lange, G.W.; Rowold, E.; Violand, B.N.; Hohnson, A.; Leimgruber, R.M.; Parr, G.R.; Siegel, N.R.; Kimack, N.M.; Smith, C. E.; Zobel, J.F.; Ganguli, S.M.; Garbow, J.R.; Bild, G.; Krivi, G.G. (1989). Purification and characterization of pituitary bovine somatotropin. *J. Biol.Chem.* **264**: 14741-14747.
41. Rand-Weaver, M.; Kawauchi, H. (1992). A rapid procedure for the isolation of bioactive growth hormone. *General and Comparative Endocrinology* **85**: 341-345.
42. Giard-Pasquier, C.; Rickenbacher, U. (1991). Purification of canine prolactin and growth hormone by fast protein liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **553**: 117-121.
43. Pan, F.M.; Chang, W.C. (1993). Purification of growth hormones by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **613**: 326-329.
44. Schoner, E.G.; Ellis, L.F.; Schoner, B.E. (1985). Isolation and purification of protein granules from *E. coli* cells overproducing bovine growth hormone. *Bio/Technology* **3**: 151-154.
45. Schoemaker, J. M.; Brasnett, A. H.; Marston, F.A.O. (1985). Examination of calf prochymosin accumulation in *E. coli*: Disulphide linkages are a structural component of prochymosin-containing inclusion bodies. *EMBO J.* **4**: 775-780.

46. Carrell, R.W.; Lehmann, H.; Hutchison, H.E. (1966). Haemoglobin Köln (β -98 valine-methionine): an unstable protein causing inclusion-body anaemia. *Nature* **210**: 915-916.
47. Schneider, R.G.; Ueda, S.; Alperin, J.B.; Brimhall, B.; Jones, R.T. (1969). Hemoglobin Sabine β -91 (F7) Leu-Pro. An unstable variant causing severe anaemia with inclusion bodies. *The New England Journal of Medicine* **280**: 739-745.
48. Hartley, D.L.; Kane, J.F. (1988). Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* **16**: 101-102.
49. Mitraki, A.; King, J. (1989). Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Biotechnology* **7**: 690-697.
50. Pigiet, V.P.; Schuster, B.J. (1986). Thioredoxin-catalyzed refolding of disulphide-containing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 7643-7647.
51. Fahey, R.C.; Hunt, J.S.; Windham, G.C. (1977). On the cysteine and cystine content of proteins. Differences between intracellular and extracellular proteins. *J. Mol. Evol.* **10**: 155-160.
52. Taylor, G.; Hoare, M.; Gray, D.R.; Marston, F.A.O. (1986). Size and density of protein inclusion bodies. *Bio/Technology* **4**: 553-557.
53. Schein, C.H.; Noteborn, M.H.M. (1988). Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio/Technology* **6**: 291-294.
54. Schein, C.H. (1989). Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/Technology* **7**: 1141-1149.
55. Bishai, W.R.; Rappuoli, R.; Murphy, J.R. (1987). High-level expression of a proteolytically sensitive diphtheria toxin fragment in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 5140-5151.
56. Piatak, M.; Lane, J. A.; Laird, W.; Bjorn, M.J.; Wang, A.; Williams, M. (1988). Expression of soluble and fully functional ricin A chain in *Escherichia coli* is temperature-sensitive. *J. Biol. Chem.* **263**: 4837-4843.
57. Squires, C.H.; Childs, J.; Eisenberg, S.P.; Polverini, P.J.; Sommer, A. (1988). Production and characterization of human basic fibroblast growth factor from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**: 16297-16302.
58. Takagi, H.; Morinaga, Y.; Tsuchiya, M.; Ikemura, H.; Inouye, M. (1988). Control of folding of proteins secreted by a high expression secretion vector, pIN-III-

- ompA: 16-fold increase in production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 6: 948-950.
59. Langley, K.E.; Lai, P.; Wypych, J.; Everett, R.R.; Berg, T.F.; Krabill, L.F.; Davis, J. M.; Souza, L.M. (1987). Recombinant-DNA-derived bovine growth hormone from *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 163: 323-330.
 60. Binder, T.; Vogel, T.; Hadary, D.; Elberg, G.; Gertler, A. (1989). "Chimeric bovine-human growth hormone prepared by recombinant DNA technology: binding properties and biological activity. *Biotechnology General* 3: 923-930.
 61. Sugimoto, S. Yamaguchi, K. Yokoo Y. (1990), Isolation and characterization of recombinant eel growth hormone expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Chromatography* 515:
 62. Lopatin, A.V.; Il'ina, A.A.; Shulga, O.S.; Grinchenko, V.P.; Varlamov, K.G.; Skryabin, M.P.; Kirpichnikov (1994). A general method for purification of human recombinant somatotropin and its mutant forms by metal chelate affinity chromatography. *Biochemistry* 59: 159-161.
 63. Klein, B.K.; Hill, S.R.; Devine, C.S.; Rowold, E.; Smith, C.E.; Galosy, S.; Olins, P.O. (1991) Secretion of active bovine somatotropin in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 9: 869-872.
 64. Olson, K.C.; Fenno, J.; Lin, N.; Harkins, R.N.; Snider, C.; Kohr, W.H.; Ross, M.J.; Fodge, D. (1981). Purified human growth hormone from *E. coli* is biologically active. *Nature* 293: 408-411.
 65. Flodh, H. (1986). Human growth hormone produced with recombinant DNA technology: development and production. *Acta Paediatr Scand*, 325: 1-9.
 66. Gellerfors, P.; Pavlu, B.; Axelsson, K.; Nyhlen, C.; Johansson, S. (1990), Separation and identification of growth hormone variants with high performance liquid chromatography techniques. *Acta paediatr Scand*, 370: 93-100.
 67. Köhler, G.; Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibodies or predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
 68. Carlsson, R.; Glad, C. (1989). Monoclonal antibodies into the '90s: the all-purpose tool. *Bio/Technology* 7: 567-573.
 69. Ivanyi, J.; Davies, P. (1980). Monoclonal antibodies against human growth hormone. *Molecular Immunology* 17: 287-290.

70. Jónsdóttir, I.; Ekre, H.P.T.; Perlmann, P.; (1983). Comparative study of pituitary and bacteria-derived human growth hormone by monoclonal antibodies. *Molecular Immunology* 28: 871-876.
71. Aston, R.; Cooper, L.; Holder, A.; Ivanyi, J.; Preece, M. (1985). Monoclonal Antibodies to human growth hormone can distinguish between pituitary and genetically engineered forms. *Molecular Immunology* 22: 271-275.
72. Mazza, M.M.; Retegui, L.A. (1989). The antigenic topography of human growth hormone. *Molecular Immunology* 26: 231-240.
73. Jin, L.; Cohen, F.E.; Wells, J.A. (1994). Structure from function: Screening structural models with functional data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 113-117.
75. Roguin, L.P.; Aguilar, R.C.; Retegui, L.A. (1995). Monoclonal antibodies to human growth hormone modulate its biological properties. *Molecular Immunology* 32: 399-405.
76. Jónsdóttir, I.; Skoog, B.; Ekre, H.P.T.; Pavlu, B.; Perlmann, P. (1986). Purification of pituitary and biosynthetic human growth hormone using monoclonal antibody immunoabsorbent. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 46: 131-135.
77. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2da. Edición. pp.1.25-1.28. Cold Spring harbor Laboratory Press, USA.
78. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2da. Edición. pp. 1.82-1.84. Cold Spring harbor Laboratory Press, USA.
79. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

ANEXO 1

ADNc de hGH natural

tcagggtcctgtggacagctcacctagcggca**ATGGCTACAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCCTG**
GCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGCCCTGGCTTCAAGAGGGCAGTGCCTTCCCAACCATTC CCTTA
TCCAGGCTTTTTGACAACGCTATGCTCCGCGCCCATCGTCTGCACCAGCTGGCCTTTGACACCTACCAGGA
GTTTGAAGAAGCCTATATCCCAAAGGAACAGAAGTATTCATTCCTGCAGAACCCCCAGACCTCCCTCTGTT
TCTCAGAGTCTATTCCGACACCCCTCCAACAGGGAGGAAACACAACAGAAATCCAACCTAGAGCTGCTCCGC
ATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCGTGCGCTGGAGCCGTGCAGTTCCTCAGGAGTGTCTTCGCCAACAGCCT
GGTGTACGGCGCCTCTGACAGCAACGTCTATGACCTCCTAAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGA
TGGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCGGACTGGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACA
AACTCACACAACGATGACGCACTACTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAA
GGTCGAGACATTCTGCGCATCGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGctgcccgggt
ggcaccctgtgacccctccccagtgccctctcctggccctggaagttgccactccagtgccaccagcctt
gtcctaataaaattaag

Minúsculas normales: Secuencias 3' y5' no traducibles

Mayúsculas negritas: Secuencia señal nativa de hGH

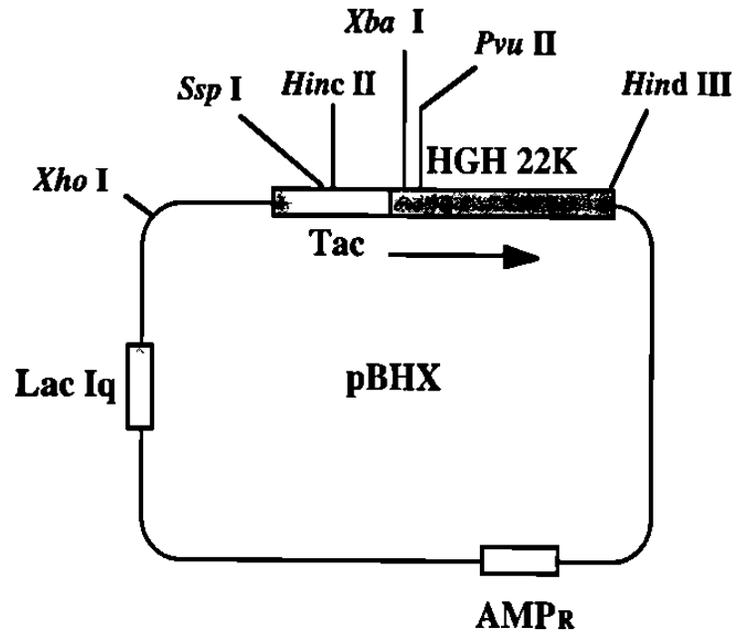
Mayúsculas normales: Secuencia que codifica para la hormona madura

Secuencia Aminoácídica de la HGH

1/1	31/11
ATG GCT ACA GGC TCC CGG ACG TCC CTG CTC	CTG GCT TTT GGC CTG CTC TGC CTG CCC TGG
Met ala thr gly ser arg thr ser leu leu	leu ala phe gly leu leu cys leu pro trp
61/21	91/31
CTT CAA GAG GGC AGT GCC TTC CCA ACC ATT	CCC TTA TCC AGG CTT TTT GAC AAC GCT ATG
leu gln glu gly ser ala phe pro thr ile	pro leu ser arg leu phe asp asn ala met
121/41	151/51
CTC CGC GCC CAT CGT CTG CAC CAG CTG GCC	TTT GAC ACC TAC CAG GAG TTT GAA GAA GCC
leu arg ala his arg leu his gln leu ala phe	asp thr tyr gln glu phe glu glu ala
181/61	211/71
TAT ATC CCA AAG GAA CAG AAG TAT TCA TTC	CTG CAG AAC CCC CAG ACC TCC CTC TGT TTC
tyr ile pro lys glu gln lys tyr ser phe	leu gln asn pro gln thr ser leu cys phe
241/81	271/91
TCA GAG TCT ATT CCG ACA CCC TCC AAC AGG	GAG GAA ACA CAA CAG AAA TCC AAC CTA GAG
ser glu ser ile pro thr pro ser asn arg	glu glu thr gln gln lys ser asn leu glu
301/101	331/111
CTG CTC CGC ATC TCC CTG CTG CTC ATC CAG	TCG TGC GCT GGA GCC GTG CAG TTC CTC AGG
leu leu arg ile ser leu leu leu ile gln	ser cys ala gly ala val gln phe leu arg
361/121	391/131
AGT GTC TTC GCC AAC AGC CTG GTG TAC GGC	GCC TCT GAC AGC AAC GTC TAT GAC CTC CTA
ser val phe ala asn ser leu val tyr gly	ala ser asp ser asn val tyr asp leu leu
421/141	451/151
AAG GAC CTA GAG GAA GGC ATC CAA ACG CTG	ATG GGG AGG CTG GAA GAT GGC AGC CCC CGG
lys asp leu glu glu gly ile gln thr leu	met gly arg leu glu asp gly ser pro arg
481/161	511/171
ACT GGG CAG ATC TTC AAG CAG ACC TAC AGC	AAG TTC GAC ACA AAC TCA CAC AAC GAT GAC
thr gly gln ile phe lys gln thr tyr ser	lys phe asp thr asn ser his asn asp asp
541/181	571/191
GCA CTA CTC AAG AAC TAC GGG CTG CTC TAC	TGC TTC AGG AAG GAC ATG GAC AAG GTC GAG
ala leu leu lys asn tyr gly leu leu tyr	cys phe arg lys asp met asp lys val glu
601/201	631/211
ACA TTC CTG CGC ATC GTG CAG TGC CGC TCT	GTG GAG GGC AGC TGT GGC TTC TAG
thr phe leu arg ile val gln cys arg ser	val glu gly ser cys gly phe AMB

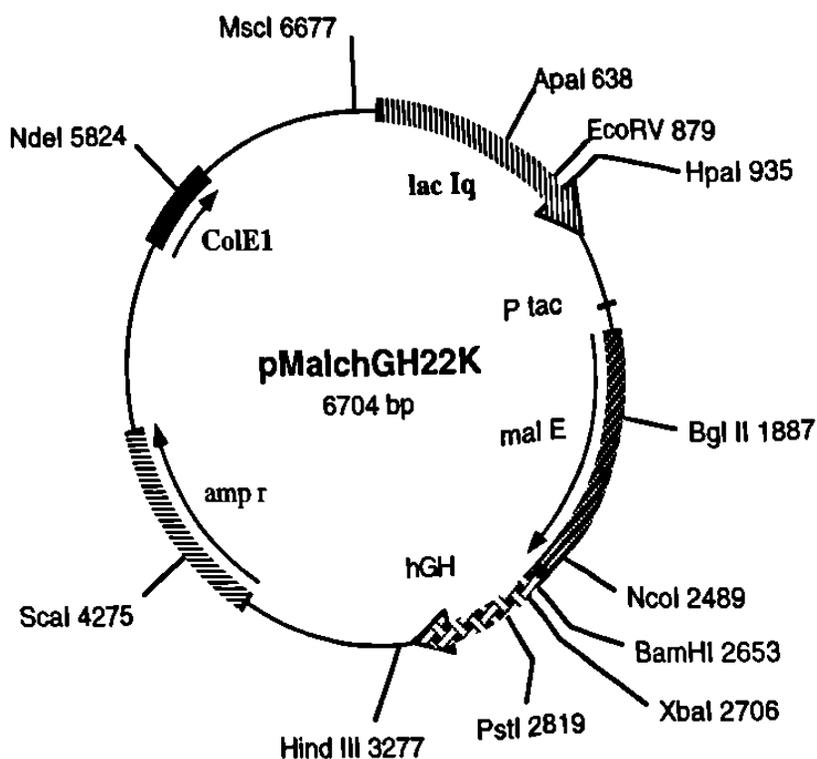
ANEXO 2

Mapa de restricción incompleto del plásmido pBHX



ANEXO 3

Análisis teórico de restricción de pMALchGH22K empleando el programa computacional *DNA Strider*



Digestion with :

*Hind III a/agctt

1 fragment

Order	Length
1	6685

From	To
3261 *Hind III	3261 *Hind III

Digestion with :

*Hind III a/agctt

*Xba I t/ctaga

2 fragments

Order	Length
2	6113
1	572

From	To
3261 *Hind III	2689 *Xba I
2689 *Xba I	3261 *Hind III

Digestion with :

*BamH I g/gatcc

*Hind III a/agctt

2 fragments

Order	Length
-------	--------

From

To

2	6077	3261 *HinD III	->	2653 *BamH I
1	608	2653 *BamH I	->	3261 *HinD III

Digestion with :

*Pvu II cag/ctg

6 fragments

Order	Length	From		To
5	2682	3354 *Pvu II	->	6036 *Pvu II
6	1678	6036 *Pvu II	->	1029 *Pvu II
2	1612	1122 *Pvu II	->	2734 *Pvu II
3	497	2734 *Pvu II	->	3231 *Pvu II
4	123	3231 *Pvu II	->	3354 *Pvu II
1	93	1029 *Pvu II	->	1122 *Pvu II

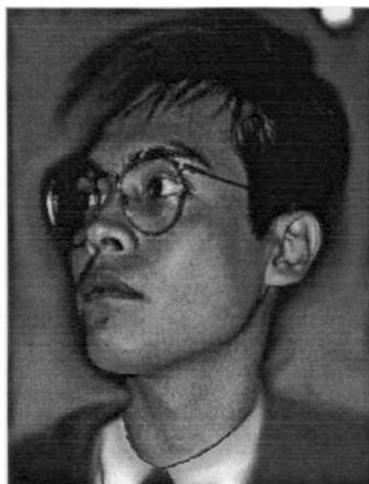
Digestion with :

ApaL I g/tgcac

5 fragments

Order	Length	From		To
2	2826	1241 ApaL I	->	4067 ApaL I
5	1285	5811 ApaL I	->	411 ApaL I
3	1246	4067 ApaL I	->	5313 ApaL I
1	830	411 ApaL I	->	1241 ApaL I
4	498	5313 ApaL I	->	5811 ApaL I

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Ramiro Mendoza Maldonado

Candidato para el Grado de:

**Maestro en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e
Ingeniería Genética**

**Tesis: HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA RECOMBINANTE (HGHr):
BIOSÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES.**

Campo de Estudio: Ciencias Básicas.

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 1 de Septiembre de 1971

Educación: Egresado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el grado de Licenciatura en Químico Clínico Biólogo en 1993 y del grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética de la misma Institución en 1996.

Trabajos Publicados: R. Mendoza-Maldonado, L. Soto-Puente, C.N. Sánchez-Domínguez, M. Guerrero-Olazarán, J.M. Viader-Salvadó "Diagnóstico de Feocromocitoma por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución" *Bioquímica* 18, 11-14 (1993).

PREMIOS RECIBIDOS: Mención honorífica al trabajo "Diagnóstico de feocromocitoma por cromatografía de líquidos de alta resolución." en el premio Carpermor, Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica y Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica A.C., Acapulco Gro. (México)
4 de Junio 1993.

Primer lugar en el área de desarrollo tecnológico al trabajo "La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución como Ayuda en el diagnóstico de Feocromocitoma." en el 8avo. Congreso Científico Internacional de la Federación Latinoamericana de Sociedades Científicas de Estudiantes de Medicina (FELSOCEM), Quito (Ecuador), 15-21 de Agosto 1993.

