

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



**HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA
RECOMBINANTE (HGH_r) BIOSINTESIS,
PURIFICACION Y PRODUCCION DE
ANTICUERPOS MONOCLONALES**

Por

RAMIRO MENDOZA MALDONADO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad
en **Biología Molecular e Ingeniería Genética**

SEPTIEMBRE 1996

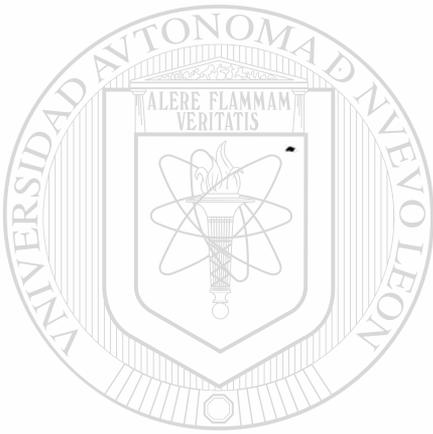
TM

QP572

.S6

M4

c.1



UANL

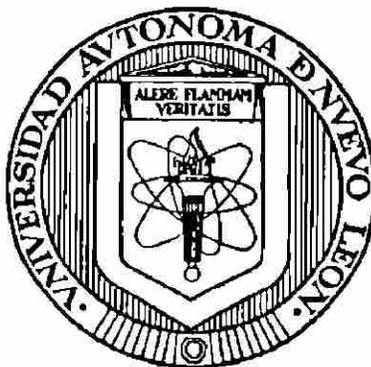
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



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

Por

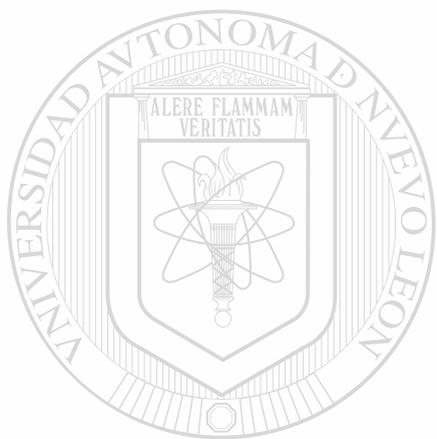
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
RAMIRO MENDOZA MALDONADO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad
en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Septiembre 1996

TM
QP57Z
.5
M4



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

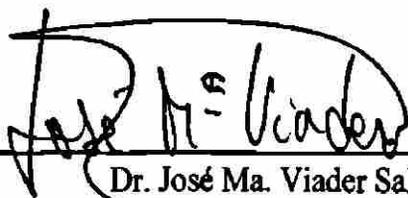


HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA RECOMBINANTE (HGHr):

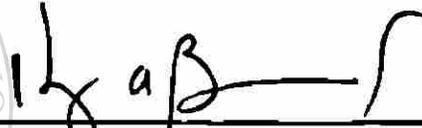
BIOSÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y PRODUCCIÓN

DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Aprobación de Tesis:



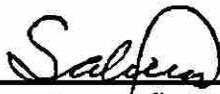
Dr. José Ma. Viader Salvadó
Asesor



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
Coasesor



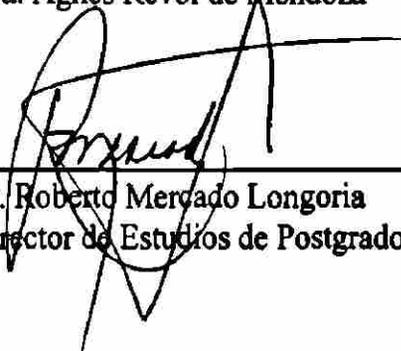
Dra. Martha Guerrero Olazarán
Coasesor



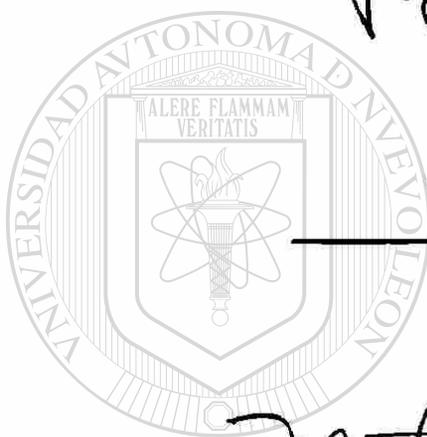
Dr. Mario César Salinas Carmona
Coasesor



Dra. Agnès Revol de Mendoza



Dr. Roberto Mercado Longoria
Subdirector de Estudios de Postgrado



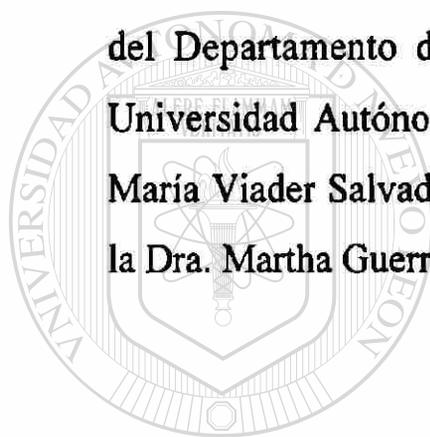
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo se desarrolló en los laboratorios de Química Biomolecular, Biotecnología y Biología Celular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica y en el laboratorio de Inmunología Celular del Departamento de Inmunología, en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de el Dr. José María Viader Salvadó y la coasesoría de el Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, la Dra. Martha Guerrero Olazarán y el Dr. Mario César Salinas Carmona.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Parte de este trabajo fue presentado en congresos:

R. Mendoza Maldonado, L.F. Ruíz-Montiel, M. Guerrero Olazarán, J.M. Viader Salvadó, H.A. Barrera Saldaña. "Evaluación de los niveles de expresión de hormona del crecimiento humana recombinante en *Escherichia coli* empleando vectores de expresión." XII Encuentro de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, U.A.N.L., México, Octubre 1994.

L.L. Escamilla Treviño, R. Mendoza Maldonado, J.M. Viader Salvadó, M. Guerrero Olazarán, H.A. Barrera Saldaña. "Optimización de la producción de hormona del crecimiento humana recombinante fusionada a la proteína de unión a maltosa (HGH-MBPr) en *Escherichia coli*." XIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, U.A.N.L., México, Octubre 1995; y en I Simposio de Ciencia y Tecnología Monterrey 400. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Asociación Neolonesa de Investigación Científica y Tecnológica, Monterrey, México, Mayo 1996.

R. Mendoza Maldonado, M. Guerrero de Viader, H.A. Barrera Saldaña, J.M. Viader Salvadó. "Purificación de Hormona de Crecimiento Humana Recombinante (HGHr) por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución" XIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, U.A.N.L., México, Octubre 1995.

PRÓLOGO

El impacto que han causado la Biología Molecular y la Genética Molecular en la ciencia básica ha sido sorprendente, ya que actualmente se conoce con gran detalle la estructura molecular de genes de organismos inferiores y superiores y se ha conseguido un avance importante en el entendimiento de los mecanismos de regulación que participan en su expresión. Así mismo, han sido o están siendo resueltos importantes enigmas de la Biología Molecular tales como las bases moleculares del cáncer, la diferenciación celular y la diversidad de anticuerpos. Por otro lado, el impacto que han tenido sobre la industria ha sido tal, que se ha visto un incremento en el surgimiento a nivel mundial de nuevas compañías dedicadas a la explotación de la Ingeniería Genética como herramienta poderosa de la Biotecnología Molecular, con la cual se ha logrado la producción de proteínas de importancia biomédica en microorganismos, células eucariotes en cultivo, plantas e incluso en fluidos biológicos como sangre o leche de animales de granja. Por tal motivo, en dicho campo ha tomado gran importancia el desarrollo de nuevas tecnologías para incrementar los estudios de expresión, biosíntesis y análisis de proteínas recombinantes.

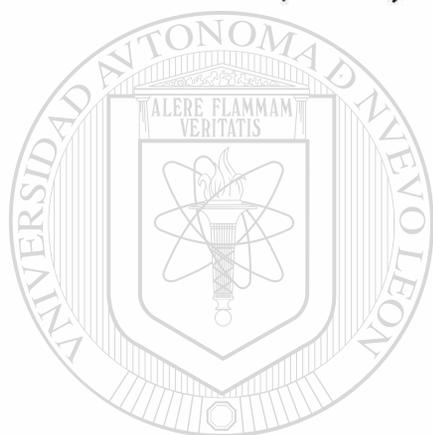
El principal objetivo de este trabajo de tesis se centra en la estandarización de técnicas que apoyen los estudios sobre la Hormona del Crecimiento Humana Recombinante (HGHR), una de las principales líneas de investigación en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) en el Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.. Dicho trabajo esta constituido en tres secciones principales, el estudio de la biosíntesis de HGHR en un sistema de expresión bacteriano, la purificación de HGHR a partir del sistema de expresión anterior mediante métodos cromatográficos y la producción de anticuerpos monoclonales anti-HGHR empleando la tecnología del hibridoma. Un aspecto importante de señalar en el campo de investigación sobre HGHR, es que el desarrollo de estas tecnologías ya ha sido descrito. Sin embargo, este trabajo representa el esfuerzo de nuestro laboratorio de incrementar las líneas de investigación sobre HGHR empleando las técnicas estandarizadas y los productos biotecnológicos obtenidos, que por otro lado, representan la base para el estudio de otras hormonas de crecimiento y proteínas relacionadas como los lactógenos placentarios.

La culminación de este trabajo se ha logrado gracias al valioso apoyo de muchos. Por este motivo, es importante agradecer el apoyo de:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada con No. de Registro 85948.
- Universidad Autónoma de Nuevo León y Universidad Autónoma de México por la Estancia de Entrenamiento en Bioquímica de Péptidos dirigida por el Dr. Lourival Domingos Possani Postay, Jefe del Depto. de Bioquímica. Instituto de

Biotecnología, U.N.A.M. Desarrollado dentro del Programa de Intercambio Académico existente entre la U.A.N.L. y U.N.A.M.

- Subdirección de Investigación y Estudios de Postgrado, de la Fac. de Medicina de la U.A.N.L. por lo apoyos económicos con fines académicos y de investigación.
- Personal Administrativo, Docente, No Docente y de Investigación del Departamento de Bioquímica de la Fac. de Medicina de U.A.N.L.
- Personal Administrativo, Docente, No Docente y de Investigación del Departamento de Inmunología de la Fac. de Medicina de U.A.N.L., del cual es jefe el Dr. Mario César Salinas Carmona.
- Miembros del Comité de Tesis por su enorme esfuerzo en la revisión del documento.
- Dr. Hugo A. Barrera Saldaña jefe del Departamento de Bioquímica de la Fac. de Medicina de U.A.N.L.
- Dr. José María Viader Salvadó por su constante, responsable y enriquecedora asesoría; además, de su gran calidad humana.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A mi Familia Nativa:

A mi Padre.

A mi Madre.

A mi Hermano.

A mi Hermana.

A mi Familia Recombinante:

El Doctor.

La Doctora.

y Los Pequeños.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Resumen

Ramiro Mendoza Maldonado
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Septiembre de 1996

**Título del Estudio: HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA RECOMBINANTE:
BIOSINTESIS, PURIFICACION Y PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES**

Número de Páginas: 107c

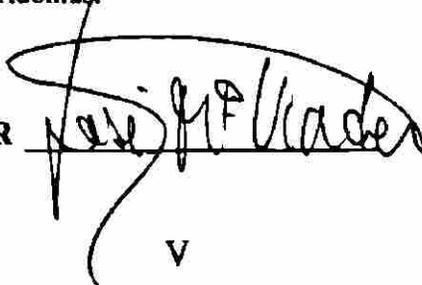
**Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con
especialidad en Biología Molecular en Ingeniería Genética**

Propósito y Método de Estudio: Con el fin de ampliar los estudios sobre las hormonas de crecimiento y proteínas relacionadas como los lactógenos placentarios, se llevó a cabo el estudio de la biosíntesis de HGHR y de ésta fusionada a la proteína de unión a maltosa (HGH-MBPr) en un sistema de expresión en *E.coli* con los plásmidos pBHx y pMALchGH22K, respectivamente. Se evaluó la influencia de la concentración de glucosa en el medio de cultivo (% Gluc), la densidad óptica al inicio de la inducción (D.O.) y el tiempo de inducción (T.I.) sobre los niveles de producción y el porcentaje relativo de HGHR ó HGH-MBPr en homogenados celulares, mediante la determinación de proteínas totales por el método de Bradford y un análisis densitométrico de geles de poliacrilamida SDS-PAGE. Además, se llevó a cabo un análisis estadístico de los resultados obtenidos. Por otro lado, se evaluó una estrategia de purificación de HGHR a partir del sistema de expresión con el plásmido pBHx, la cual involucró un paso cromatográfico de fase reversa, previa precipitación con sulfato de amonio. La evaluación de esta estrategia se realizó empleando la determinación de proteínas totales, análisis densitométrico de geles de SDS-PAGE y un ELISA contra HGH. Por último, se llevó a cabo la estrategia de producción de anticuerpos monoclonales contra HGHR, empleando la tecnología del hibridoma y una estrategia de inmunización con diferentes antígenos.

Contribuciones y Conclusiones: Los resultados de la evaluación de la biosíntesis de HGHR y HGH-MBPr indican una influencia decreciente de T.I., % Gluc y D.O. sobre los niveles de producción de HGHR y HGH-MBPr. Sin embargo, se observó un efecto diferente de dichas variables en los dos sistemas de expresión sobre los niveles de producción y sobre todo sobre los porcentajes relativos de las proteínas recombinantes. Esto indica la importancia de la evaluación de las variables de fermentación en un sistema de expresión recombinante para optimar los niveles de producción.

Por otro lado, la estrategia de purificación evaluada mostró bajos rendimientos en la obtención de HGHR. Sin embargo, la pureza de HGH obtenida fue alta, lo cual indica la eficacia del empleo de una columna de fase reversa en la purificación y además, la utilidad de dicha técnica de separación para la cuantificación y/o análisis cualitativo de HGHR en sistemas de expresión recombinantes. En la producción de anticuerpos monoclonales, los resultados mostraron que la estrategia de inmunización empleada fue adecuada para conseguir altos niveles de producción de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados. Sin embargo, no se obtuvieron los rendimientos esperados en la obtención de hibridomas productores de anticuerpos específicos contra HGHR. Lo anterior podría ser debido a la falta de control en las condiciones de incubación empleadas durante el proceso, lo cual provoca una baja sobrevivencia de los hibridomas.

FIRMA DEL ASESOR



V

TABLA DE CONTENIDO

| Capítulo | Página |
|--|--------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Historia Breve de la Biotecnología | 1 |
| 1.2 Hormona del Crecimiento Humana (HGH) | 5 |
| 1.3 Biosíntesis de HGH (HGHR) | 7 |
| 1.3.1 Sistemas de Expresión en <i>Escherichia coli</i> | 7 |
| 1.3.2 Biosíntesis de HGHR en <i>Escherichia coli</i> | 10 |
| 1.3.3 Biosíntesis de HGHR en Otros Hospederos | 13 |
| 1.4 Purificación de Hormonas del Crecimiento (GHs) | 14 |
| 1.4.1 Purificación de GHs a partir de su Fuente Natural | 14 |
| 1.4.2 Purificación de GHs Recombinantes | 15 |
| 1.4.2.1 Purificación de HGHR | 17 |
| 1.5 Producción de Anticuerpos Monoclonales | 19 |
| 1.5.1 La Tecnología del Hibridoma y la Producción de Anticuerpos Monoclonales | 19 |
| 1.5.2 Producción de Anticuerpos Monoclonales anti-HGH | 21 |
| 1.6 Objetivos | 23 |
| 1.6.1 Objetivos Generales | 23 |
| 1.6.2 Objetivos Específicos | 23 |
| 2. MATERIAL Y MÉTODOS | 25 |
| 2.1 Área de Trabajo y Equipo | 25 |
| 2.2 Métodos | 26 |
| 2.2.1 Estrategia General | 26 |
| 2.2.2 Biosíntesis de HGHR y HGH-MBPr en <i>E. coli</i> | 27 |
| 2.2.2.1 Ensayos de Transformación y Caracterización de <i>E. coli</i> TB1 con pBHX y <i>E. coli</i> TB1 con pMALchGH22K ... | 28 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.2.2.2 | Ensayos de Fermentación de Clonas Recombinantes de <i>E. coli</i> | 32 |
| 2.2.2.3 | Análisis de los Sistemas de Expresión Bacterianos | 34 |
| 2.2.2.3.1 | Determinación de Proteínas Totales | 35 |
| 2.2.2.3.2 | Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE) y Análisis Densitométrico | 36 |
| 2.2.2.3.3 | Evaluación Analítica del Sistema de Expresión | 38 |
| 2.2.2.3.4 | Inmunodetección | 39 |
| 2.2.2.4 | Evaluación de la Influencia de Variables en la Fermentación de los Sistemas de Expresión Recombinantes | 40 |
| 2.2.3 | Aislamiento de HGH-MBPr y Aislamiento y Purificación de HGHr | 42 |
| 2.2.3.1 | Aislamiento de HGH-MBPr | 43 |
| 2.2.3.2 | Purificación de HGHr por CLAR-FR | 44 |
| 2.2.3.2.1 | Aislamiento de HGHr | 45 |
| 2.2.3.2.2 | Método de Separación e Identificación de HGHr por CLAR-FR | 46 |
| 2.2.3.2.3 | Estrategia de Purificación: Separación, Recolección y Análisis de HGHr por CLAR-FR | 47 |
| 2.2.3.3 | Evaluación del Proceso de Purificación de HGHr | 47 |
| 2.2.4 | Producción de Anticuerpos Monoclonales anti-HGHr | 48 |
| 2.2.4.1 | Esquema de Inmunización | 48 |
| 2.2.4.2 | Evaluación de la Respuesta de Anticuerpos contra HGHr | 49 |
| 2.2.4.3 | Obtención de Hibridomas | 50 |
| 2.2.4.3.1 | Sensibilidad a Aminopterina de Líneas Celulares de Mieloma de Ratón | 50 |
| 2.2.4.3.2 | Ensayos de Fusión Celular | 51 |
| 2.2.4.4 | Selección de Hibridomas Productores de anti-HGHr | 54 |
| 2.2.4.4.1 | Ensayos de Inmunodot | 54 |
| 2.2.4.4.2 | Ensayos de ELISA | 56 |
| 2.2.4.4.3 | Ensayos de Western-Blot | 57 |
| 2.2.4.5 | Clonación de Hibridomas Productores de anti-HGHr | 59 |
| 2.2.4.5.1 | Ensayo de Clonación a Dilución Limitante | 59 |

| | |
|--|-----|
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 60 |
| 3.1 Biosíntesis de HGHR en <i>E. coli</i> | 60 |
| 3.1.1 Transformación y Caracterización de la clona de <i>E. coli</i> con pBHX | 60 |
| 3.1.2 Detección y Análisis de la Producción de HGHR | 62 |
| 3.1.3 Evaluación de la Influencia de Variables en el Proceso de Fermentación | 65 |
| 3.2 Biosíntesis de HGH-MBPr en <i>E. coli</i> | 69 |
| 3.2.1 Transformación y Caracterización de la clona de <i>E. coli</i> con pMALchGH22K | 69 |
| 3.2.2 Detección y Análisis de la Producción de HGH-MBPr | 71 |
| 3.2.3 Evaluación de la Influencia de Variables en el Proceso de Fermentación | 74 |
| 3.3 Aislamiento de HGH-MBPr y Aislamiento y Purificación de HGHR ... | 78 |
| 3.3.1 Análisis del Extracto Enriquecido con HGH-MBPr y del Extracto Enriquecido con HGHR | 78 |
| 3.3.2 Identificación de HGHR por CLAR-FR | 79 |
| 3.3.3 Análisis Cromatográfico del Extracto Enriquecido con HGHR por CLAR-FR | 81 |
| 3.3.4 Evaluación de la Purificación | 82 |
| 3.4 Producción de Anticuerpos Monoclonales anti-HGHR | 84 |
| 3.4.1 Evaluación de la Respuesta de Anticuerpos contra HGHR | 84 |
| 3.4.2 Sensibilidad a Aminopterina de las Líneas Celulares | 86 |
| 3.4.3 Ensayos de Fusión | 87 |
| 3.4.4 Selección de Hibridomas Productores de anti-HGHR | 89 |
| 3.4.4.1 Ensayos de Inmunodot | 89 |
| 3.4.4.2 Ensayos de ELISA | 90 |
| 3.4.4.3 Ensayos de Western-Blot | 91 |
| 3.4.5 Clonación de Hibridomas Productores de anti-HGHR | 93 |
| 3.4.5.1 Ensayo de Clonación a Dilución Limitante | 93 |
| 4. CONCLUSIONES | 94 |
| 5. BIBLIOGRAFÍA | 96 |
| 6. ANEXOS | 103 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1. | Modelo Estructural de la HGH Basado en el Modelo Trazado para la Cadena Polipeptídica de la Hormona del Crecimiento Porcina | 6 |
| 2. | Plásmido Típico de Expresión Procariótica | 9 |
| 3. | Mapa de Restricción de los Plásmidos pMAL | 13 |
| 4. | Estrategia General | 26 |
| 5. | Estrategia para la Biosíntesis | 28 |
| 6. | Estrategia de Transformación y Caracterización de los Sistemas de Expresión | 29 |
| 7. | Estrategia para los Ensayos de Fermentación | 33 |
| <hr/> | | |
| 8. | Estrategia de Análisis de los Sistemas de Expresión | 35 |
| 9. | Estrategia de Aislamiento de HGHR y HGH-MBPr | 42 |
| 10. | Estrategia de Purificación de HGHR | 44 |
| 11. | Caracterización Enzimática del Plásmido pBHX | 61 |
| 12. | Análisis Cualitativo de HGHR en el Sistema de Expresión de <i>E. coli</i> con pBHX | 62 |
| 13. | Análisis Densitométrico de HGHR en el Sistema de Expresión de <i>E. coli</i> con pBHX | 63 |
| 14. | Influencia de las Variables de Fermentación sobre la Producción de HGHR | 65 |
| 15. | Influencia de las Variables de Fermentación sobre el Porcentaje Relativo de HGHR | 66 |

| Figura | Página |
|--|---------------|
| 16. Caracterización Enzimática del Plásmido pMALchGH22K | 70 |
| 17. Análisis Cualitativo de HGH-MBPr en el Sistema de Expresión de <i>E. coli</i> con pMALchGH22K | 71 |
| 18. Análisis Densitométrico de HGH-MBPr en el Sistema de Expresión de <i>E. coli</i> con pMALchGH22K | 72 |
| 19. Influencia de las Variables de Fermentación sobre la Producción de HGH-MBPr | 74 |
| 20. Influencia de las Variables de Fermentación sobre el Porcentaje Relativo de HGH-MBPr | 75 |
| 21. Análisis por SDS-PAGE de los Extractos Enriquecidos de HGH-MBPr y HGHR | 76 |
| 22. Análisis Densitométrico de los Extractos Enriquecidos de HGH-MBPr y HGHR | 79 |
| 23. Análisis Cromatográfico del Sistema de Expresión de <i>E. coli</i> con pBHX | 80 |
| 24. Análisis Cromatográfico del Extracto Enriquecido con HGHR | 81 |
| 25. Respuesta de Anticuerpos anti-HGHR en Ratones BALB/c | 85 |
| 26. Sensibilidad a Aminopterina de la Línea Celular P3/X63/Ag8U.1 | 86 |
| 27. Sensibilidad a Aminopterina de la Línea Celular P3/X63/Ag8.653 | 87 |
| 28. Fotografías de Hibridomas en Cultivo Obtenidas por Microscopía de Contraste de Fases | 89 |
| 29. Detección de Hibridomas Productores de anti-HGHR por Inmunodot | 90 |
| 30. Detección de Hibridomas Productores de anti-HGHR por ELISA | 91 |
| 31. Detección de Hibridomas Productores de anti-HGHR por Western-Blot | 92 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|--------------|---|---------------|
| I. | Análisis de Restricción del Plásmido pMALchGH22K | 32 |
| II. | Variables de Fermentación para los Sistemas de Expresión | 41 |
| III. | Esquema de Inmunización | 49 |
| IV. | Análisis de la Producción de HGHR | 64 |
| V. | Análisis de t de Student en la Biosíntesis de HGHR | 68 |
| VI. | Análisis de la Producción de HGH-MBPr | 73 |
| VII. | Análisis de t de Student en la Biosíntesis de HGH-MBPr | 77 |
| VIII. | Evaluación de la Purificación de HGHR | 82 |
| <hr/> | | |
| IX. | Evaluación de la Etapa Cromatográfica en la Purificación de HGHR .. | 83 |
| X. | Título de Anticuerpos anti-HGHR en Ratones BALB/c | 85 |
| XI. | Ensayos de Fusión Celular | 88 |

INTRODUCCIÓN

1.1 Historia Breve de la Biotecnología

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Hormona del Crecimiento Humana (HGH)

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

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

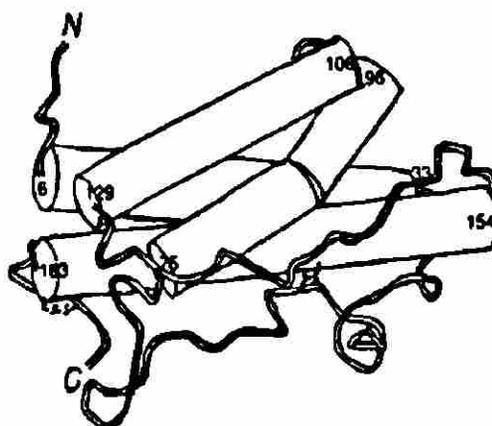


Figura 1. Modelo Estructural de la HGH basado en el Modelo para la Cadena Polipeptídica de la Hormona del Crecimiento Porcina. Los puntos al inicio y al final de las α -hélice están numerados de acuerdo a la secuencia de HGH. N indica el extremo amino terminal y C el extremo carboxilo terminal. Se indican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

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

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

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

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

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

1.3.1 Sistemas de Expresión en *Escherichia coli*

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

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

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

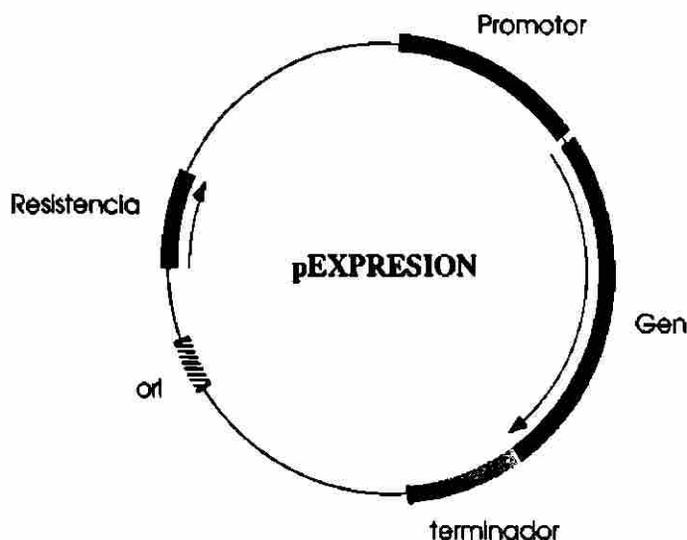


Figura 2. Plásmido Típico de Expresión Procariótica. Estos plásmidos portan algunos elementos necesarios para su replicación (ori), genes de resistencia ó selección, un promotor de la transcripción (Tac, Trc), terminador de la transcripción y el gen que se desea expresar.

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

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

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

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

1.3.2 Biosíntesis de la HGHr en *Escherichia coli*

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

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

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

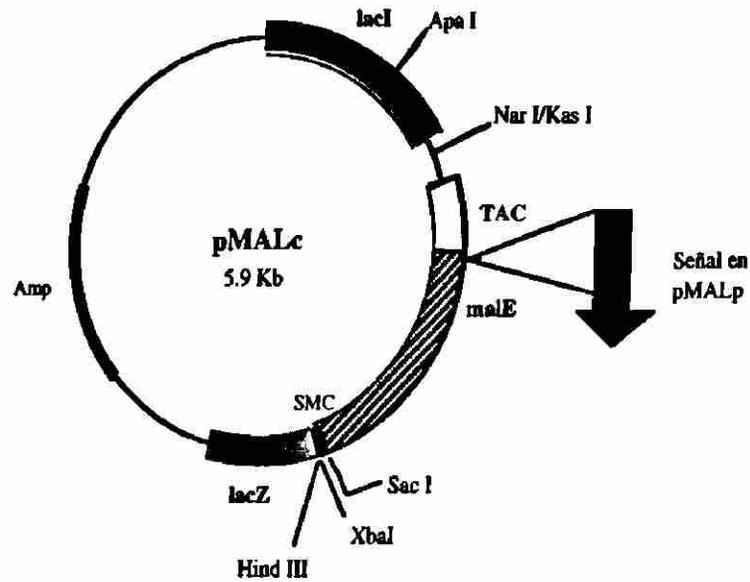
la producción se incrementó cuando se alteraron los codones que codifican para el péptido señal (21). También se ha usado el péptido señal de la proteína de membrana externa (OMP) de *E. coli* para lograr producir una forma madura en periplasma, la cual fue correctamente procesada en el espacio periplásmico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

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

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

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

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



Sitio Múltiple de Clonación

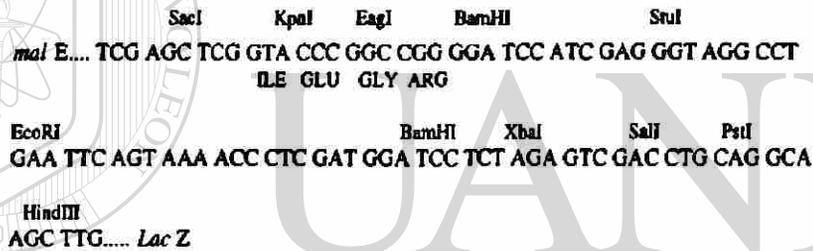


Figura 3. Mapa de Restricción de los Plásmidos pMAL. Esta serie de plásmidos permite la sobreexpresión de proteínas en fusión con la proteína de unión a maltosa. El sitio múltiple de clonación facilita la inserción del gen de interés en la región donde se fusionan los genes *malE* y *lacZ*.

1.3.3 Biosíntesis de HGhr en Otros Hospederos

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

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

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

1.4 Purificación de Hormonas del Crecimiento (GHs)

1.4.1 Purificación de GH a partir de su fuente natural

Veinte años atrás, sólo se podía obtener una proteína para su posterior estudio físico y/o bioquímico mediante su aislamiento a partir de su fuente natural. Las proteínas cuya estructura era conocida se encontraban en forma abundante en algún tejido fácilmente obtenible. En el ámbito de las hormonas del crecimiento se han reportado diversas metodologías de aislamiento y purificación a partir de tejido hipofisario.

Inicialmente se emplearon técnicas cromatográficas en columna abierta con una estrategia que usaba varios modos cromatográficos en forma secuencial. Chapman y col. (39) purificaron HGH de 20 kDa a partir de cadáveres humanos combinando la cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-100 y la cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-celulosa. Obtuvieron también un dímero de la HGH de 20 kDa. Wood y col. (40) purificaron BGH de hipófisis empleando inicialmente una extracción y posteriormente cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-celulosa; las fracciones obtenidas se controlaron por CLAR en fase reversa y SDS-PAGE. Rand-Weaver y col. (41) describieron un método rápido y sencillo de aislamiento de GH de hipófisis de rata, el cual se basa en una extracción alcalina y una combinación de una cromatografía de exclusión en Sephadex G-75 y cromatografía de fase reversa. En general, estos métodos

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

1.4.2 Purificación de GHs recombinantes (GHR)

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

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

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

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

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

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.4.2.1 Purificación HGhr

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

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

1.5 Producción de Anticuerpos Monoclonales

1.5.1 La Tecnología del Hibridoma y la Producción de Anticuerpos Monoclonales

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5.2 Producción de Anticuerpos Monoclonales anti-HGH

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

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

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

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

1.6 Objetivos

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

1.6.1 Objetivos Generales

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

1.6.2 Objetivos Específicos

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

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

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

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Área de Trabajo y Equipo

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

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

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

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

2.2 Métodos

2.2.1 Estrategia General

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

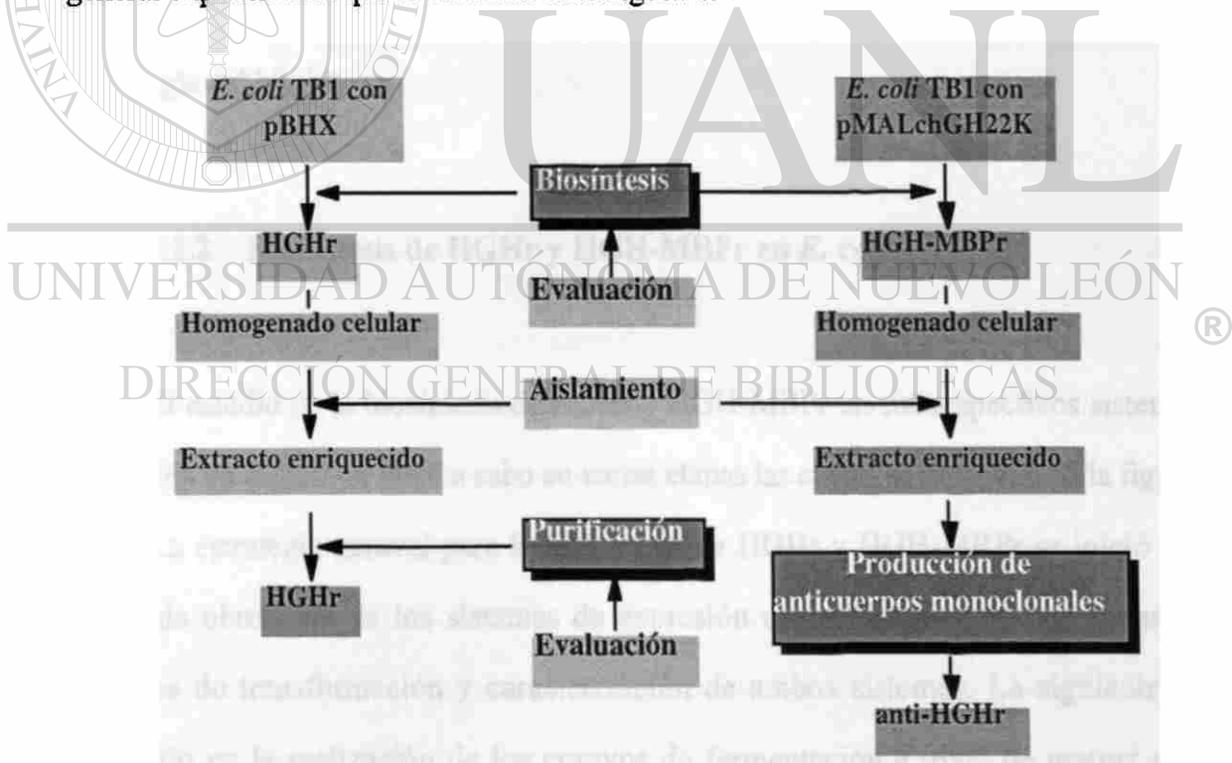


Figura 4. Estrategia General. Se muestran las partes que constituyen el proyecto experimental: biosíntesis, purificación y producción de anticuerpos monoclonales y sus relaciones entre cada una de ellas.

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

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

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

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

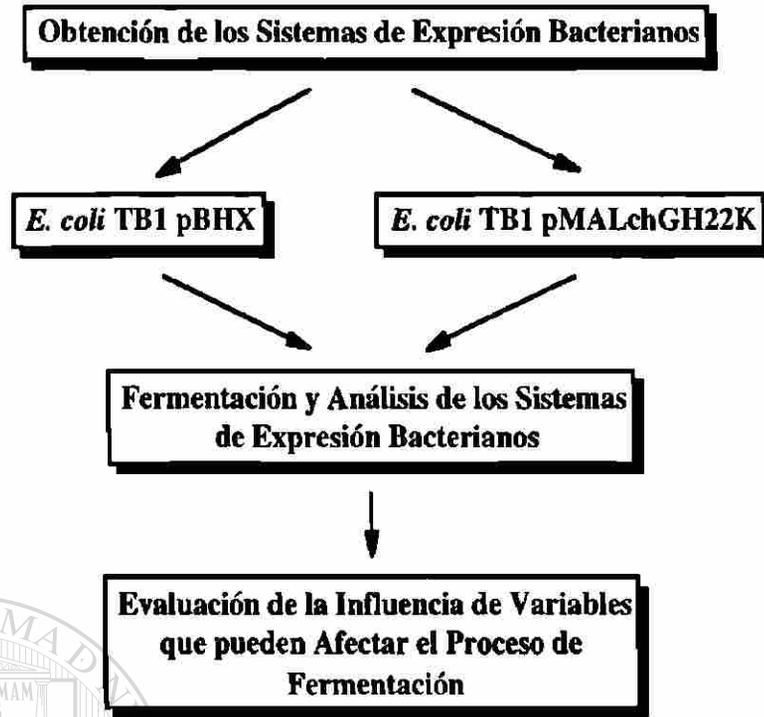


Figura 5. Estrategia para la Biosíntesis. La figura muestra las etapas para el estudio de la biosíntesis de HGhr y HGH-MBPr. Estas etapas son la obtención, fermentación y análisis de los sistemas de expresión y la evaluación de la influencia de variables en los procesos de fermentación.

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

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

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

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

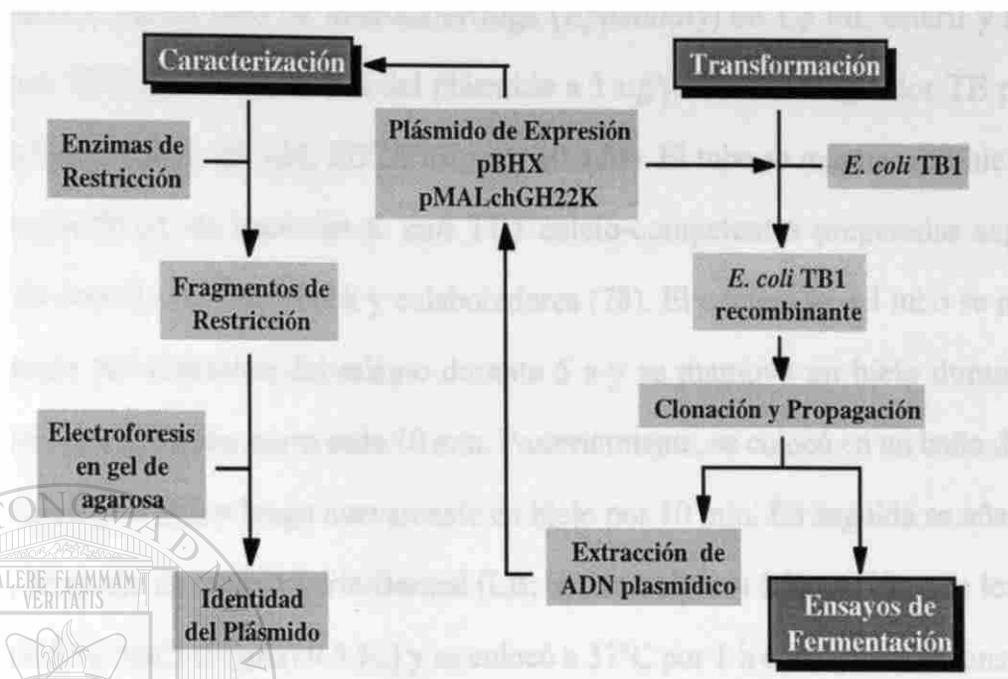


Figura 6. Estrategia de Transformación y Caracterización de los Sistemas de Expresión. Se muestran las etapas de transformación de *E. coli* con los plásmidos, la clonación, propagación y caracterización de las clonas recombinantes.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

pb: pares de bases

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

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

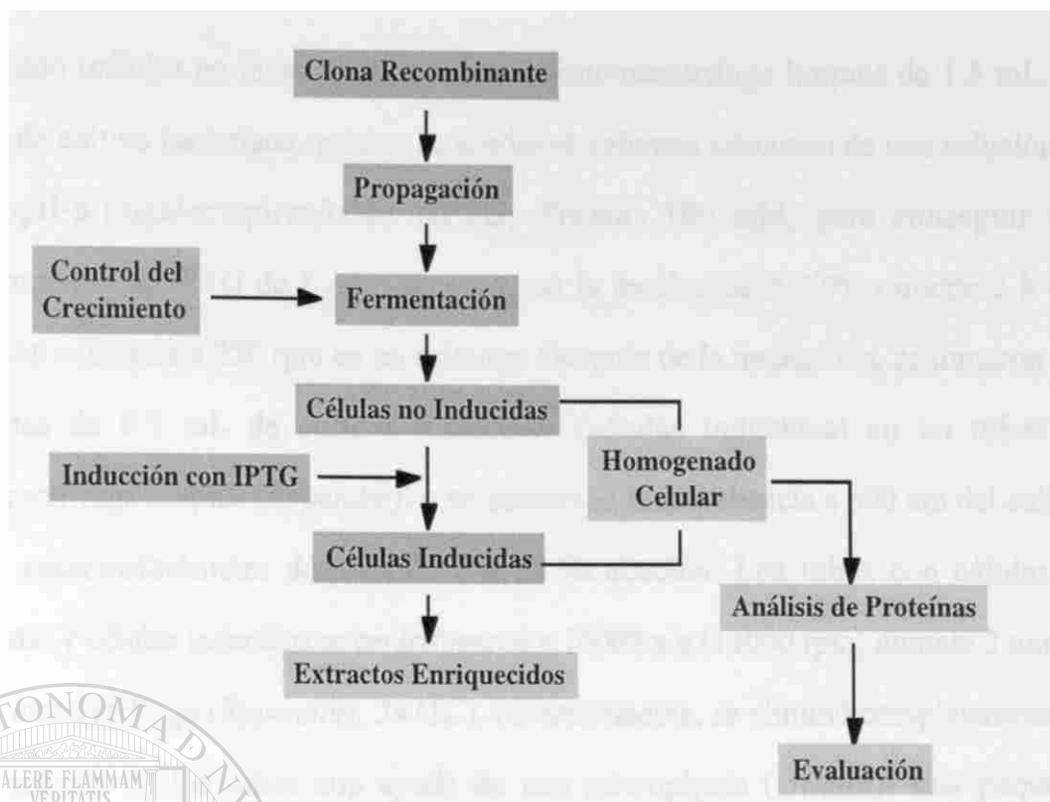


Figura 7. Estrategia para los Ensayos de Fermentación. Se muestran las etapas de la fermentación iniciando con la propagación de la clona recombinante de *E. coli*, inducción de la biosíntesis de la proteína recombinante durante la fermentación y análisis del sistema de expresión.

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

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
2.2.2.3 Análisis de los Sistemas de Expresión Bacterianos Recombinantes
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

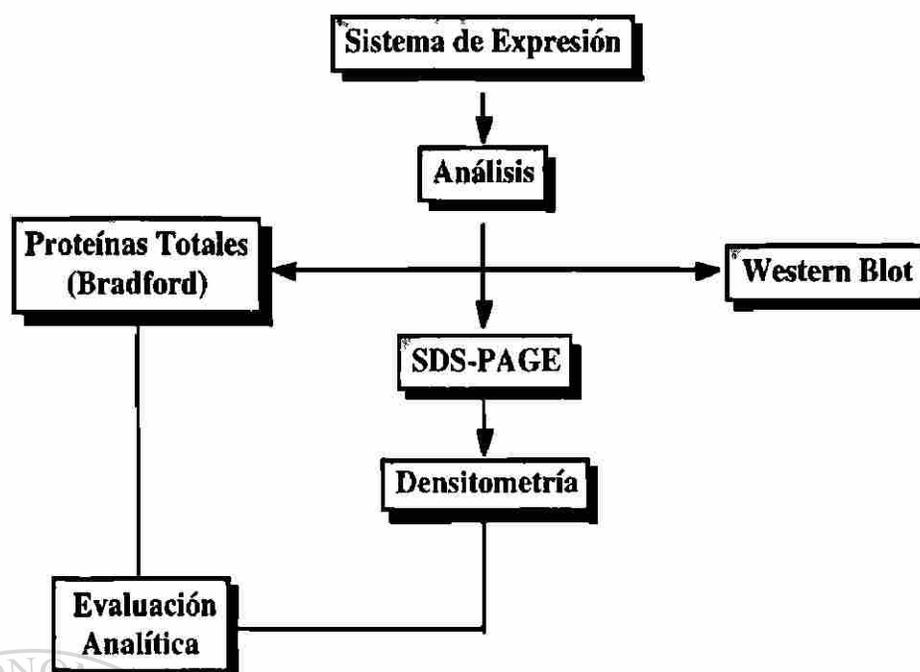


Figura 8. Estrategia de Análisis de los Sistemas de Expresión. Se muestran las técnicas utilizadas para el análisis de los sistemas de expresión: determinación de proteínas totales y análisis densitométrico de homogenados celulares separados por SDS-PAGE, los cuales se utilizaron su vez para la evaluación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

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

2.2.2.3.1 Determinación de Proteínas Totales

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2.2.3.3 Evaluación Analítica del Sistema de Expresión

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2.2.3.5 Inmunodetección

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

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

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

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

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

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

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

% Glc. Concentración de glucosa en el medio de cultivo

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

T.I. Tiempo de inducción en horas

LB Medio de cultivo Luria Bertani

LBG Medio de cultivo Luria Bertani con glucosa

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

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

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

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

% Glc. Concentración de glucosa en el medio de cultivo

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

T.I. Tiempo de inducción en horas

LB Medio de cultivo Luria Bertani

LBG Medio de cultivo Luria Bertani con glucosa

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

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

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

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

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

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

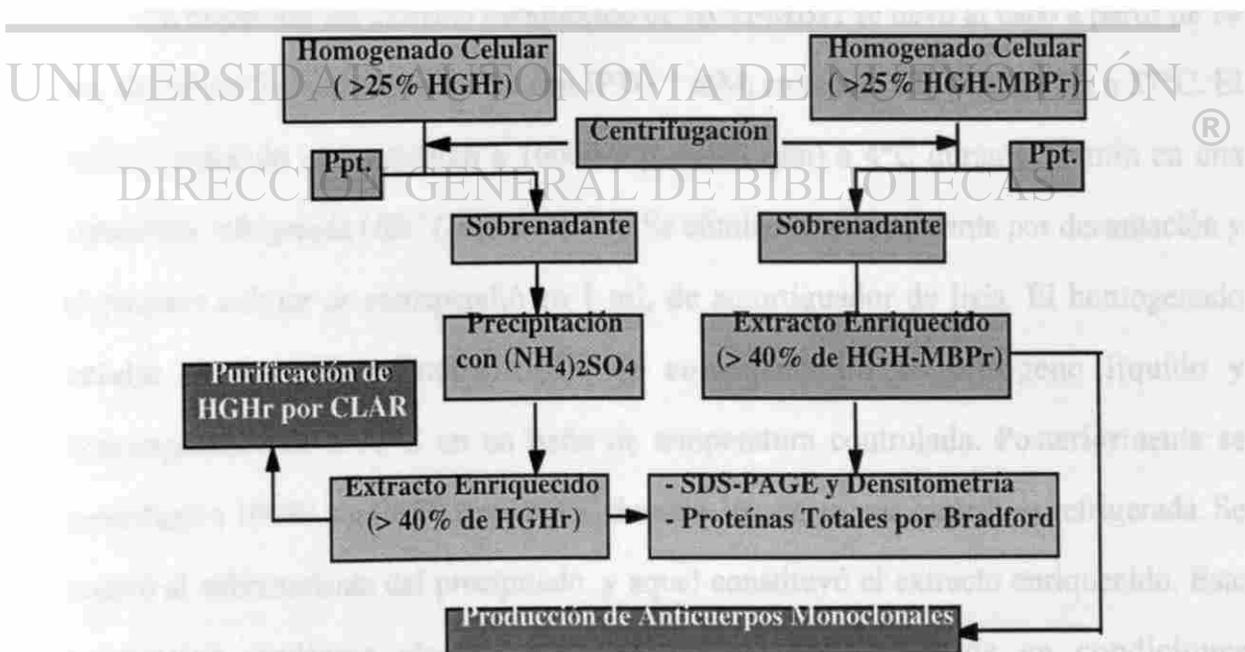


Figura 9. Estrategia de Aislamiento de HGHR y HGH-MBPr. Se muestran las diferentes etapas utilizadas en cada uno de los aislamientos de las proteínas recombinantes. Además de la utilidad de los extractos enriquecidos en las siguientes etapas del proyecto experimental.

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

2.2.3.1 Aislamiento de HGH-MBPr

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

2.2.3.2 Purificación de HGhr por CLAR-FR

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

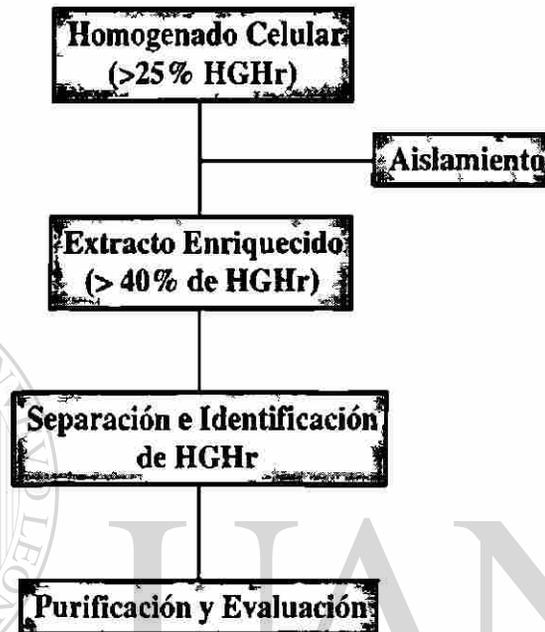


Figura 10. Estrategia de Purificación de HGhr. Se muestran las diferentes etapas utilizadas en la purificación de HGhr. Estas fueron aislamiento, separación, identificación y purificación de HGhr. Además se realizó una evaluación del proceso de purificación.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

2.2.3.2.1 Aislamiento de HGHR

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

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

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

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

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

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

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

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.2.3.3 Evaluación del Proceso de Purificación de HGhr

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

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

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

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

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

2.2.4 Producción de Anticuerpos Monoclonales anti-HGHR

2.2.4.1 Esquema de Inmunización

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

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

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

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

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

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

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
2.2.4.2 Evaluación de la Respuesta de Anticuerpos contra HGHR ®
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

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

2.2.4.3 Obtención de Hibridomas

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

2.2.4.3.1 Sensibilidad a Aminopterina de Líneas Celulares de Mieloma de Ratón

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

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

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

2.2.4.3.2 Ensayos de Fusión Celular

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

transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio y estéril de 1.5 mL en una campana de flujo laminar. El tubo se centrifugó a 610 x g (2000 rpm) en una microcentrífuga a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante del tubo y se realizaron dos lavados del paquete celular con 1 mL de medio de cultivo DMEM con SBF al 10 %. En seguida de los lavados las células se resuspendieron en medio de cultivo DMEM con SBF al 10 % y se determinó su concentración y viabilidad celular en una cámara de Neubauer empleando una coloración vital con azul de tripano. Las células se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm³ a concentración celular de 2 x 10⁵ células/mL en un volumen entre 6 y 8 mL de medio de cultivo DMEM con SBF al 10 %. Se incubaron en una incubadora a 37°C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5 %. Un día antes de la fusión se analizó la viabilidad y concentración celular del cultivo y se preparó un cultivo de células en fase *log* y viabilidad mayor del 95 %, el cual se utilizó para los ensayos de fusión.

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

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

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

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

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 μ L de medio fresco. Posteriormente a los dos días se reemplazaron 100 μ L de cada pozo por 100 μ L 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 μ L de sobrenadante (se restituyó con 100 μ L 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 μ l de amortiguador TBS pH 7.5 y se drenó mediante un sistema de vacío. Posteriormente se agregó a cada pozo 50 μ l 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 (tetrahidrocloruro) 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 μL 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 μl 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 μL por pozo e invirtiendo la placa para eliminar la solución. En seguida se añadieron 200 μl 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 μL por pozo e invirtiendo la placa para eliminar la solución. Se añadieron a continuación 200 μL 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 μL por pozo e invirtiendo la placa para eliminar la solución. La detección se realizó añadiendo 200 μL 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 μL 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

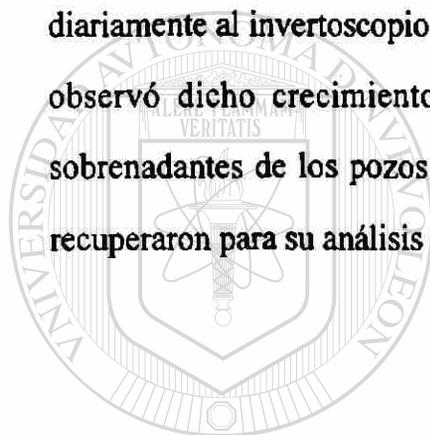
El análisis de sobrenadantes de microcultivos de hibridomas se realizó además por medio de un ensayo de inmunoelectrotransferencia sobre membrana de nitrocelulosa. En este ensayo se utilizó como antígeno un homogenado de células inducidas de *E. coli* con pBHX. Se inició con la separación de dicho homogenado celular siguiendo el procedimiento descrito en el punto 2.2.2.3.2 con algunas modificaciones, empleando 100 µg de proteína total en 200 µL 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 µm 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 µL 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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

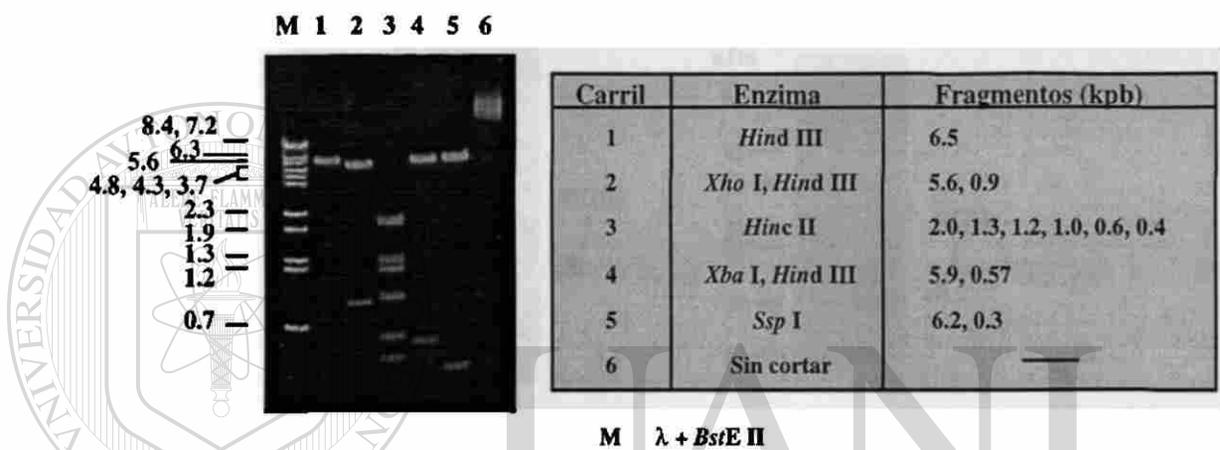


Figura 11. Caracterización Enzimática del Plásmido pBHX. Este plásmido fue extraído de una clona recombinante y fue digerido con las enzimas de restricción de la tabla de la derecha. Los fragmentos de restricción esperados se analizaron en un gel de agarosa al 1.6 % teñido con bromuro de etidio (fotografía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

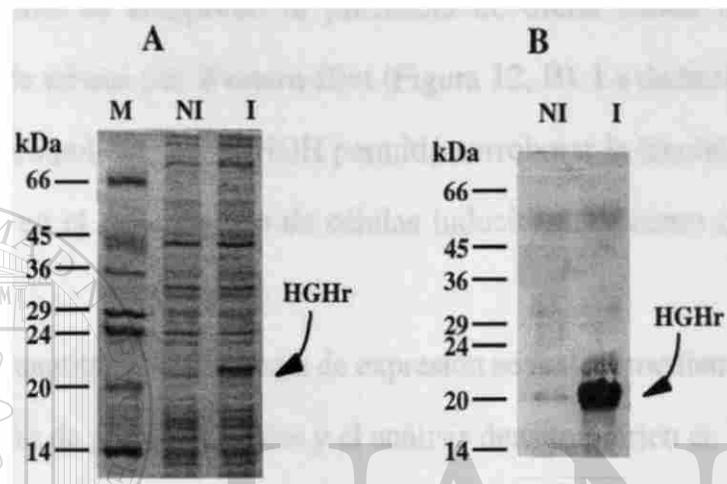


Figura 12. Análisis Cualitativo de HGhr en el Sistema de Expresión *E. coli* con pBHX. A) Análisis del sistema de expresión por SDS-PAGE. En el gel se muestran en los carriles M: marcador de peso molecular de proteínas, NI: homogenado de células no inducidas y N: homogenado de células inducidas. B) Análisis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

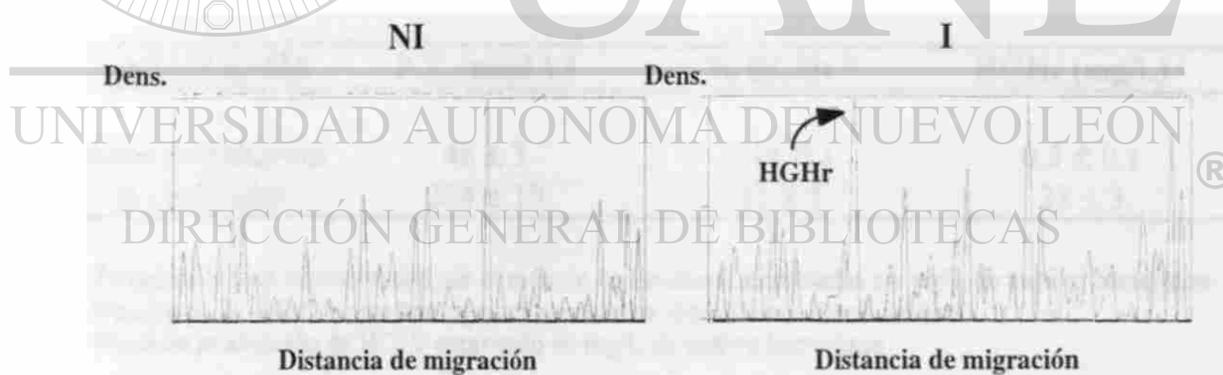


Figura 13. Análisis Densitométrico de HGHR en el Sistema de Expresión *E. coli* con pBHX. NI) Densitograma del homogenado de células no inducidas y N) Densitograma del homogenado de células inducidas. En este último se observa la presencia de un pico de alta densidad que correspondió a HGHR.

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.

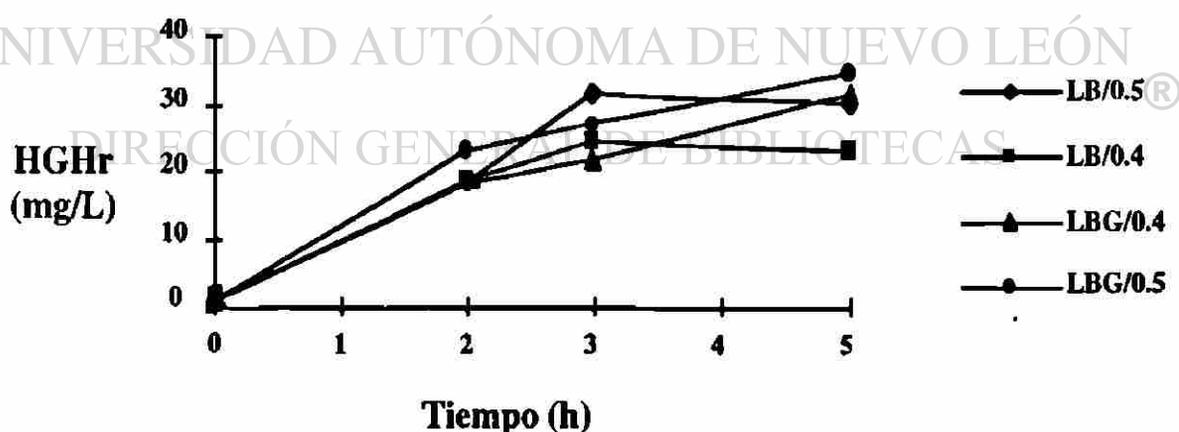


Figura 14. Influencia de las Variables de Fermentación sobre la Producción de HGhr. Producción de HGhr (mg/L) respecto al tiempo en cada uno de los ensayos de fermentación evaluados. Los puntos representan la media de tres ensayos. Los coeficientes de variación fueron menores del 20%.

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.

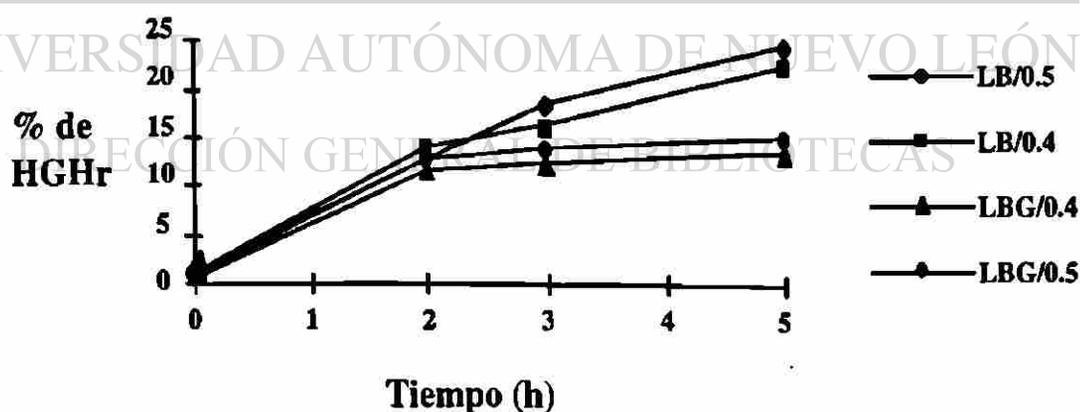


Figura 15. Influencia de las Variables de Fermentación sobre el Porcentaje Relativo de HGhr. Porcentaje relativo de HGhr obtenido en los homogenados celulares respecto al tiempo en cada uno de los ensayos de fermentación evaluados. Los puntos representan la media de tres ensayos. Los coeficientes de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

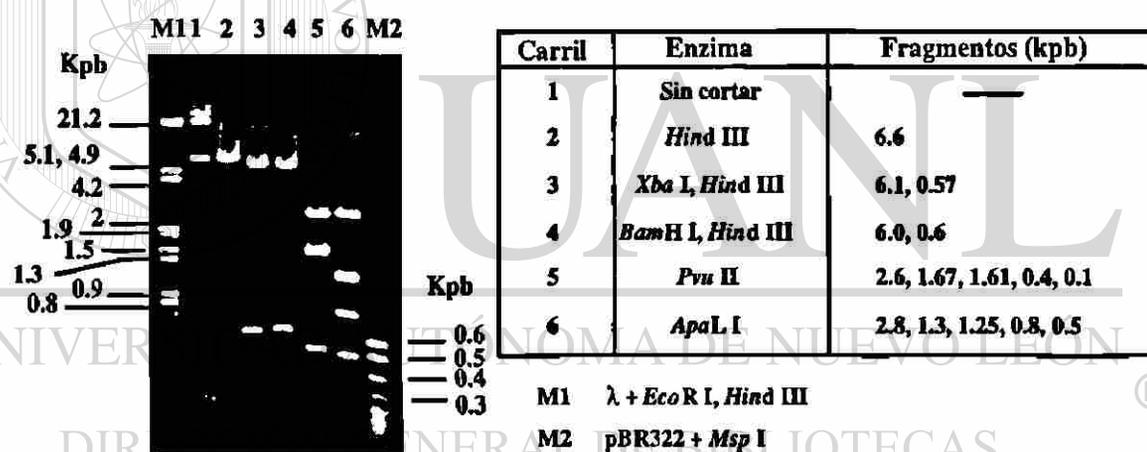


Figura 16. Caracterización Enzimática del Plásmido pMALchGH22K. Este plásmido fue extraído de una clona recombinante y fue digerido con las enzimas de restricción indicadas en la tabla de la derecha. Los productos de restricción se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro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

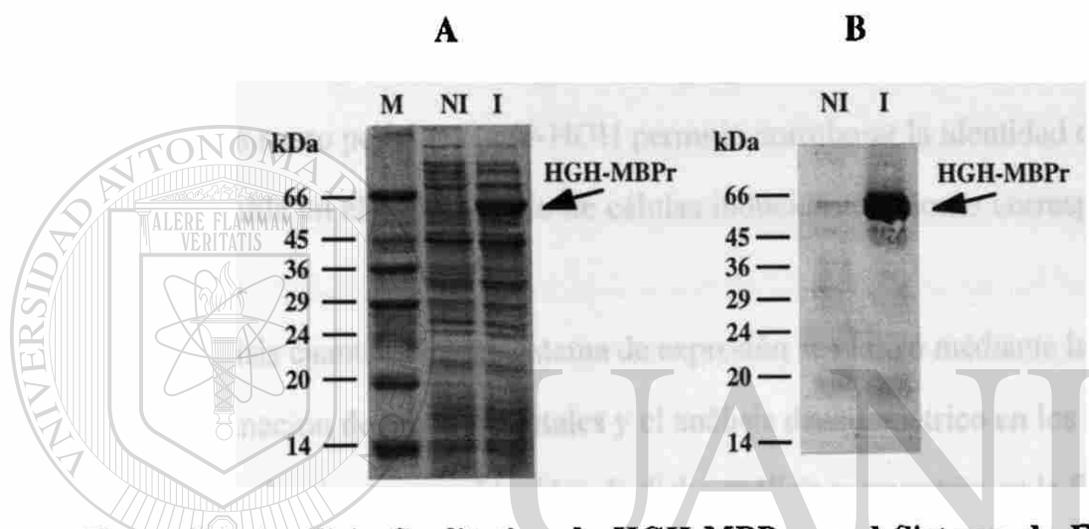


Figura 17. Análisis Cualitativo de HGH-MBPr en el Sistema de Expresión *E. coli* con pMALchGH22K. A) Análisis del sistema de expresión por SDS-PAGE. En el gel se muestran en los carriles M: marcador de peso molecular de proteínas, NI: homogenado de células no inducidas y N: homogenado de células inducidas.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

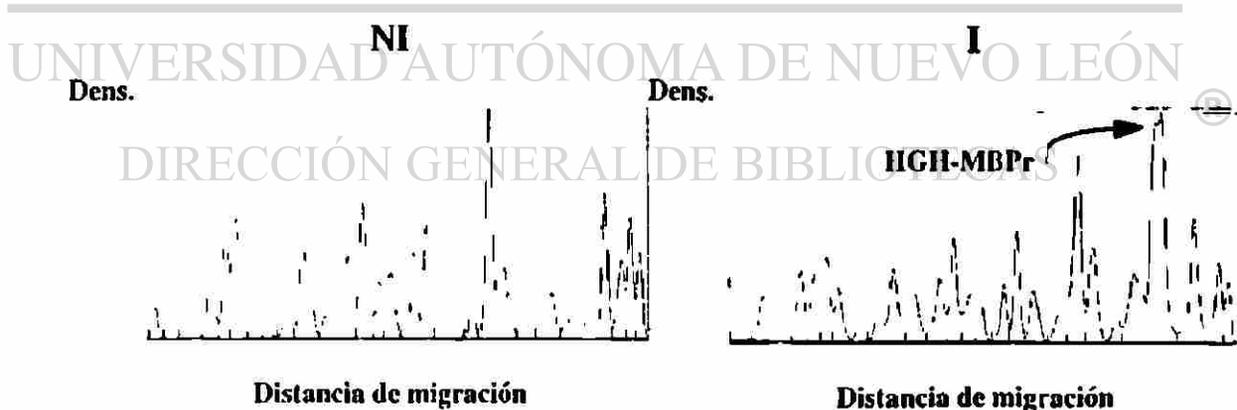


Figura 18. Análisis Densitométrico de HGH-MBPr en el Sistema de Expresión *E. coli* con pMALchGH22K. NI) Densitograma del homogenado de células no inducidas y N) Densitograma del homogenado de células inducidas. En este último se observa la presencia de un pico de alta densidad que correspondió a HGH-MBPr.

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 HGHR-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.

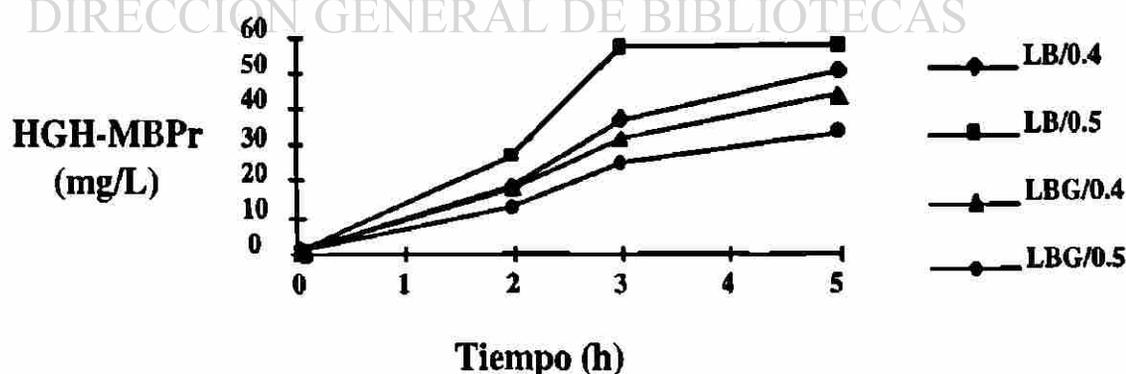


Figura 19. Influencia de las Variables de Fermentación sobre la Producción de HGH-MBPr. Producción de HGH-MBPr (mg/L) respecto al tiempo en cada uno de los ensayos de fermentación evaluados. Los puntos representan la media de tres ensayos. Los coeficientes de variación fueron menores del 20%.

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 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.

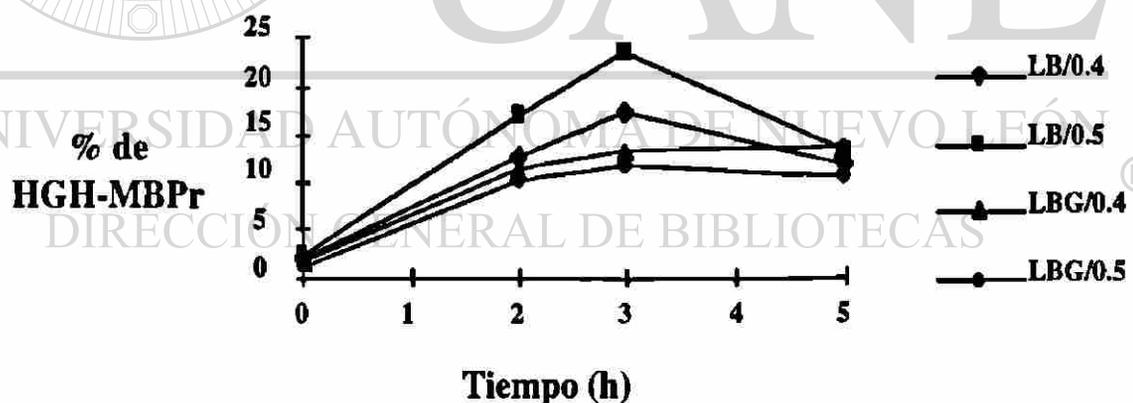


Figura 20. Influencia de las Variables de Fermentación sobre el Porcentaje Relativo de HGH-MBPr. Porcentaje relativo de HGH-MBPr obtenido en los homogenados celulares respecto al tiempo en cada uno de los ensayos de fermentación evaluados. Los puntos representan la media de tres ensayos. Los coeficientes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

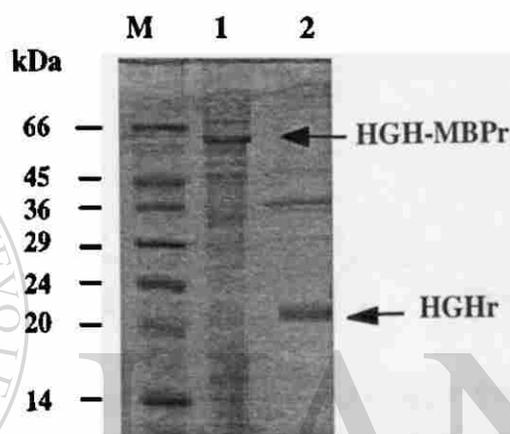


Figura 21 Análisis por SDS-PAGE de los Extractos Enriquecidos de HGH-MBPr y HGHr. Se muestra en el carril M el marcador de peso molecular de proteínas, en el carril 1 el extracto enriquecido con HGH-MBPr y en el carril 2 el extracto enriquecido de HGHr.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

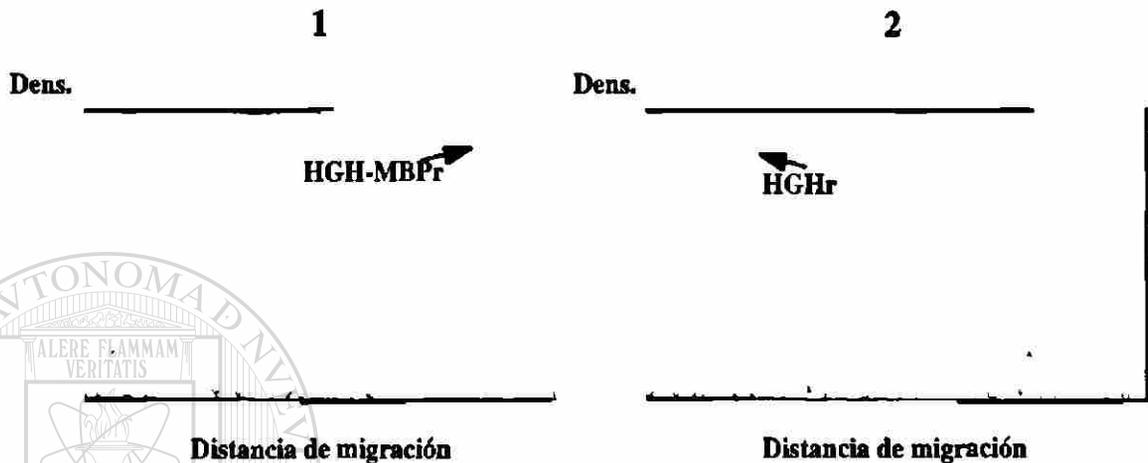


Figura 22 Análisis Densitométrico de los Extractos Enriquecidos de HGH-MBPr y HGHr. Se muestra en el carril 1 el extracto enriquecido con un 41 % de HGH-MBPr y en el carril 2 el extracto enriquecido con un 43 % de HGHr.

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.

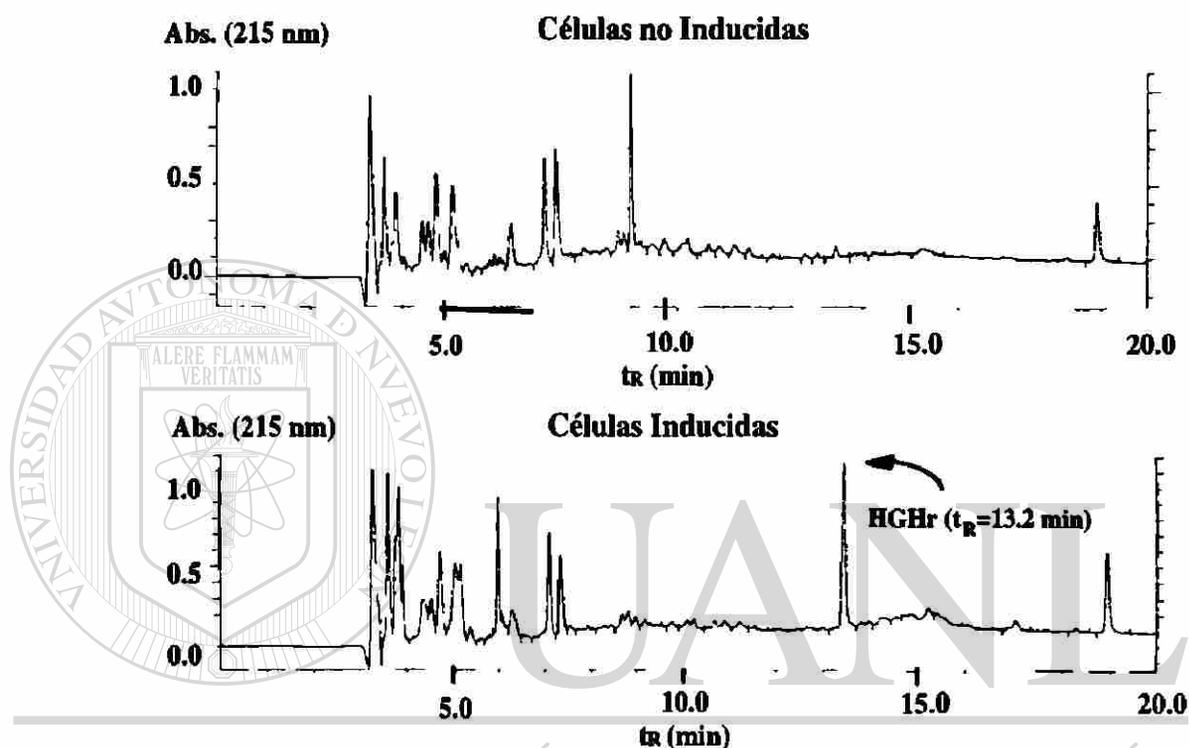


Figura 23. Análisis Cromatográfico del Sistema de Expresión de *E. coli* con pBHX. Cromatogramas correspondientes al análisis de la fracción soluble de los homogenados de células no inducidas e inducidas por CLAR-FR con detección a 215 nm. La comparación del perfil cromatográfico obtenido en ambos cromatogramas 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 HGH. 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.

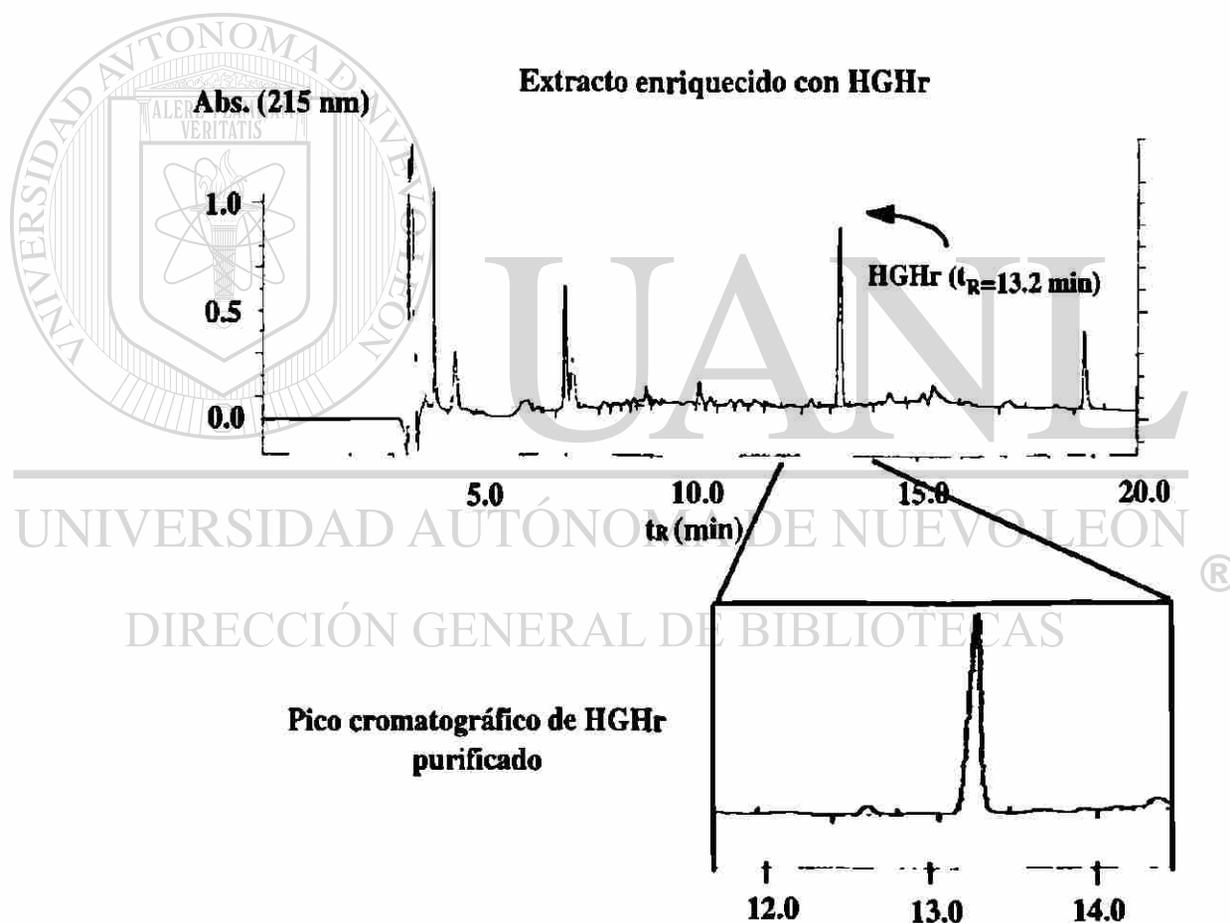


Figura 24. Análisis Cromatográfico del Extracto Enriquecido con HGhr. Cromatograma correspondiente a el extracto enriquecido con HGhr obtenido por análisis de CLAR-FR con detección a 215 nm. Se observó una disminución franca de otros componentes en la matriz. Además, el pico de HGhr es simétrico, agudo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

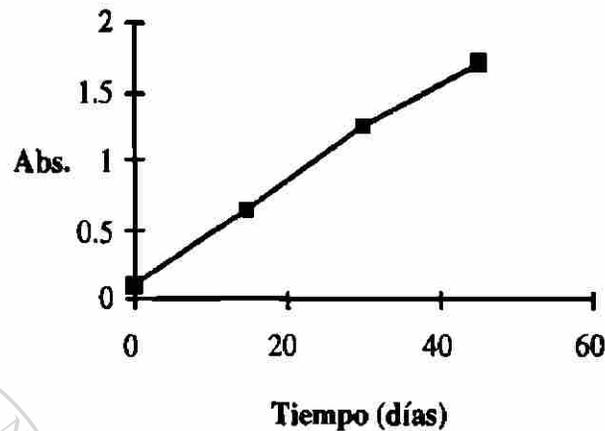


Figura 25 Evaluación de la Respuesta de Anticuerpos anti-HGhr en Ratones BALB/c. Los puntos representan el promedio del análisis de 5 ratones inmunizados. Se muestran los valores de absorbancia obtenidos por ELISA correspondientes a los sueros diluidos 1:100, analizados a los 0, 15, 30 y 45 días.

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.

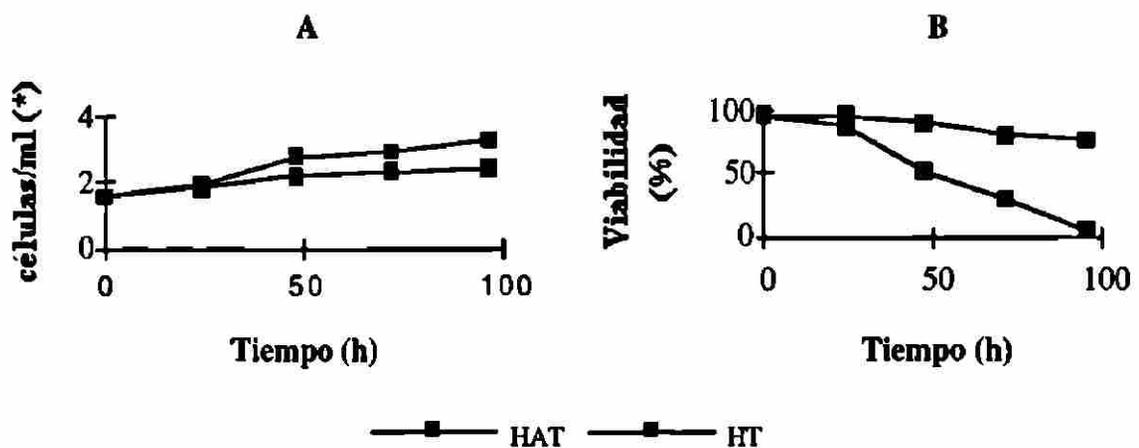


Figura 26 Sensibilidad a Aminopterina de la Línea Celular P3X63Ag8U.1. Las gráficas muestran la sensibilidad a aminopterina determinando la proliferación celular (A) y determinando la viabilidad celular (B). Los

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.

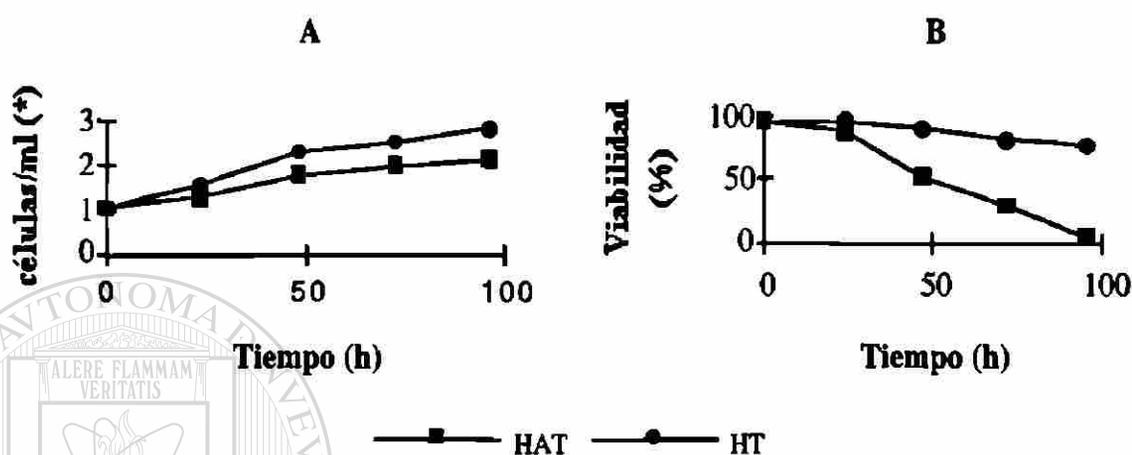


Figura 27 Sensibilidad a Aminopterina de la Línea Celular Ag8.653. Las gráficas muestran la sensibilidad a aminopterina determinando la proliferación celular (A) y determinando la viabilidad celular (B). Los valores representan la media de tres ensayos. (*: el valor de eje y se multiplica por 1×10^6)

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.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

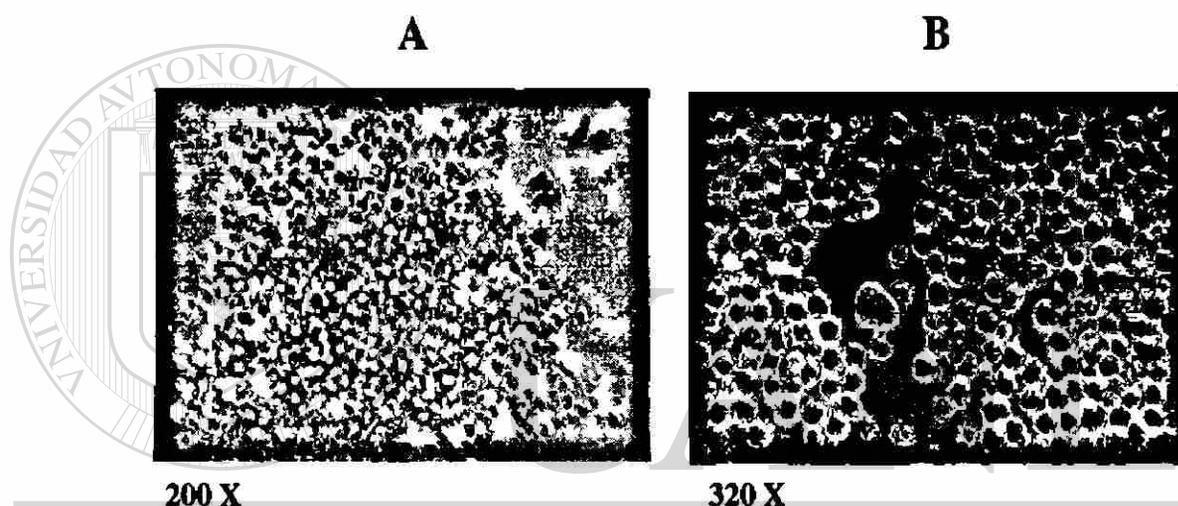


Figura 28 Fotografías de Hibridomas en Cultivo obtenidas por Microscopía de Contraste de Fases. A: Hibridoma en crecimiento al tercer día después de la fusión celular. B: Cultivo de hibridoma productor de anti-HGhr.

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).

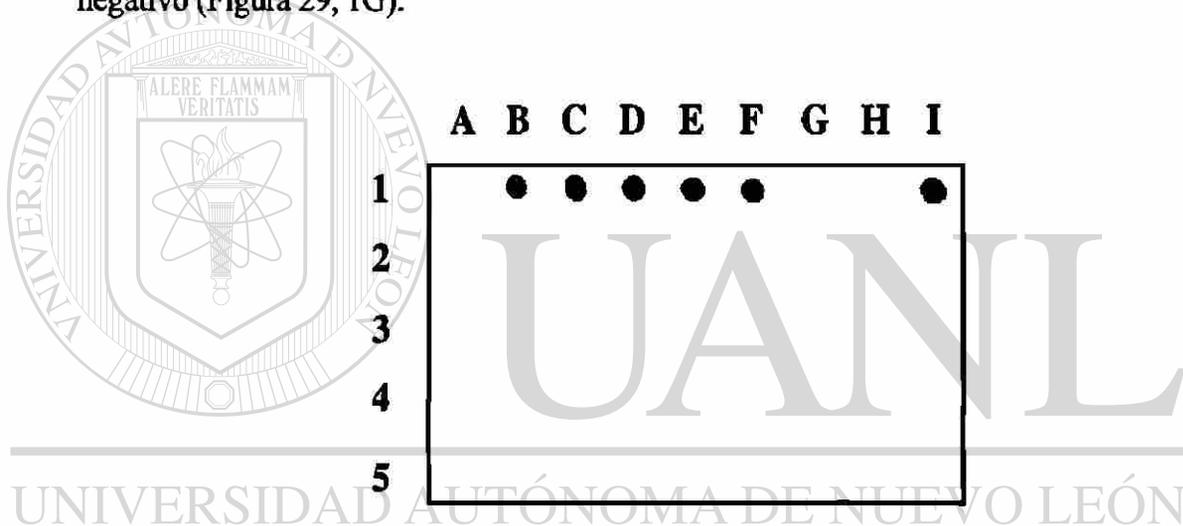


Figura 29 Detección de anti-HGHR en Sobrenadantes de Cultivos de Hibridomas por Inmunodot. Se observó una señal negativa en los análisis de sobrenadantes (2A a 5I) sin diluir. Los pozos del 1A al 1F son diferentes diluciones del suero a los 45 días del ratón inmunizado. El control negativo (1G) fue el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

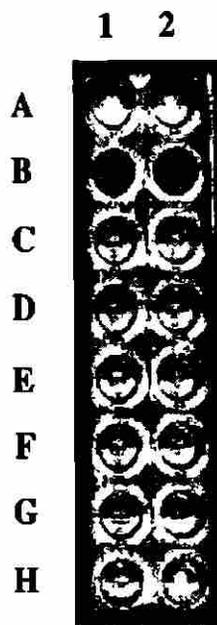


Figura 30 Detección de anti-HGHr en Sobrenadantes de Cultivos de Hibridomas por ELISA. No se observó señal en los sobrenadantes (C1 a H2). Los pozos del B1 al B2 son diferentes diluciones del suero a los 45 días del ratón inmunizado. El control negativo (A1) fue el suero del día 0 diluido 1:100.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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.

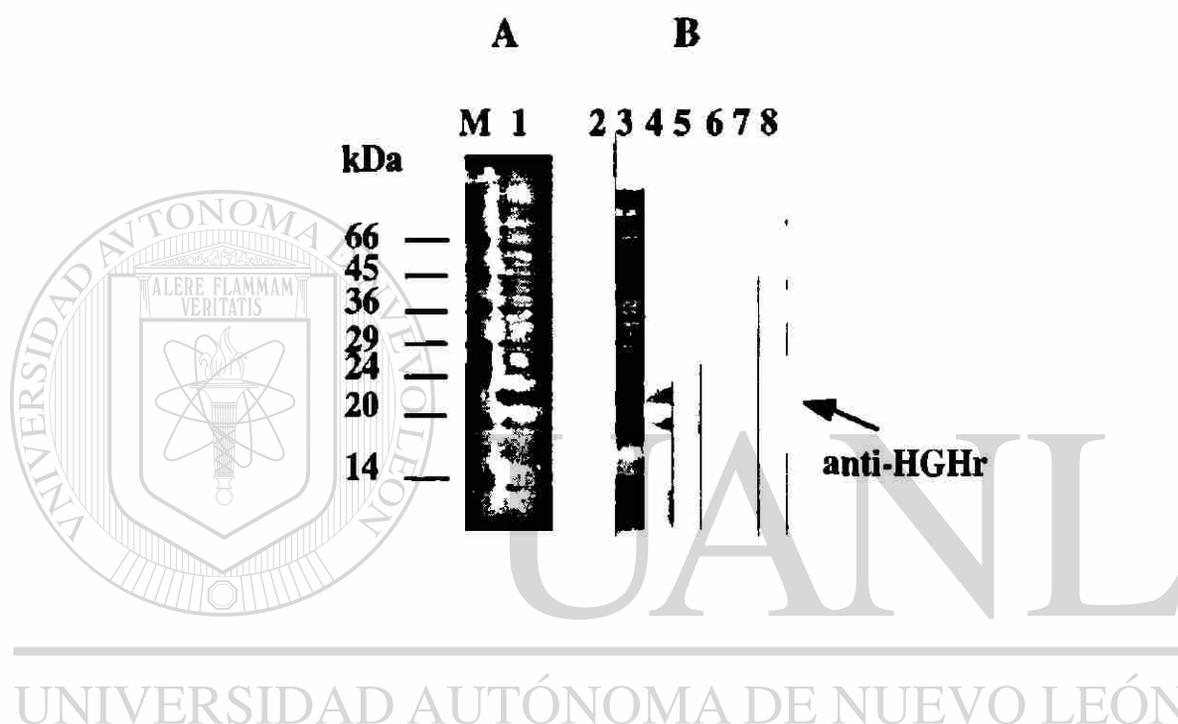


Figura 31 Detección de anti-HGHR en Sobrenadantes de Cultivos de Hibridomas por Western-Blot. A: Análisis por SDS-PAGE del antígeno utilizado (1) y del marcador de peso molecular (M). B: Análisis de algunos sobrenadantes de cultivos bacterianos por Western-Blot (4 al 8), suero control positivo (3) y 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 aminoptericina, 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.

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 un 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 (HGHR) 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 monkey 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

tcagggtcctgtggacagctcacctageggca**ATGGCTACAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCCTG**
GCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGCCCTGGCTTCAAGAGGGCAGTGCCTTCCCAACCATTC CCTTA
 TCCAGGCTTTTTGACAACGCTATGCTCCGCGCCCATCGTCTGCACCAGCTGGCCTTTGACACCTACCAGGA
 GTTTGAAGAAGCCTATATCCCAAAGGAACAGAAATTCATTCCTGCAGAACCCCCAGACCTCCCTCTGTT
 TCTCAGAGTCTATTCCGACACCCCTCCAACAGGGAGGAAACACAACAGAAATCCAACCTAGAGCTGCTCCGC
 ATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTGTGCGCTGGAGCCGTGCAGTTCCTCAGGAGTGTCTTCGCCAACAGCCT
 GGTGTACGGCGCCTCTGACAGCAACGTCTATGACCTCCTAAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGA
 TGGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCGGACTGGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACA
 AACTCACACAACGATGACGCACTACTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAA
 GGTCGAGACATTCCCTGCGCATCGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGctgcccgggt
 ggcateccctgtgacccctccccagtgccctctcctggccctggaagtgccactccagtgcccaccagcctt
 gtccctaataaaaattaag

Minúsculas normales: Secuencias 3' y5' no traducibles

Mayúsculas negritas: Secuencia señal nativa de hGH

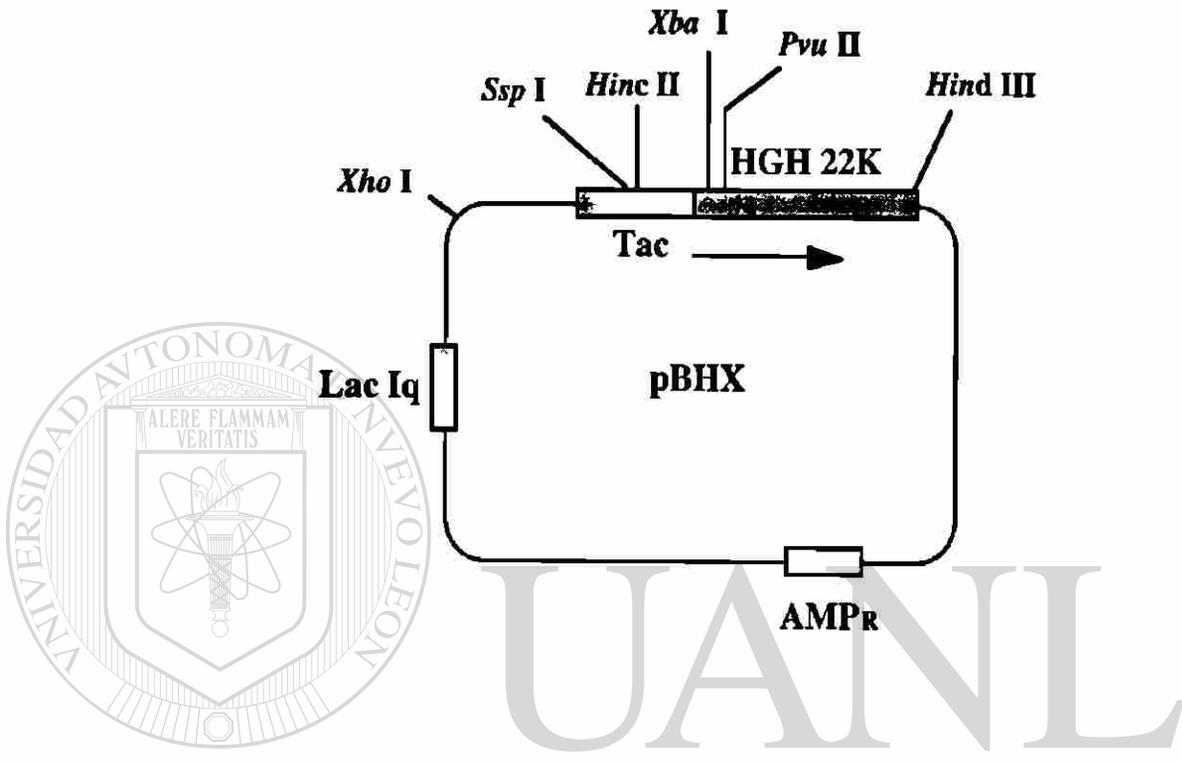
Mayúsculas normales: Secuencia que codifica para la hormona madura

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 gly 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 | TGC 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

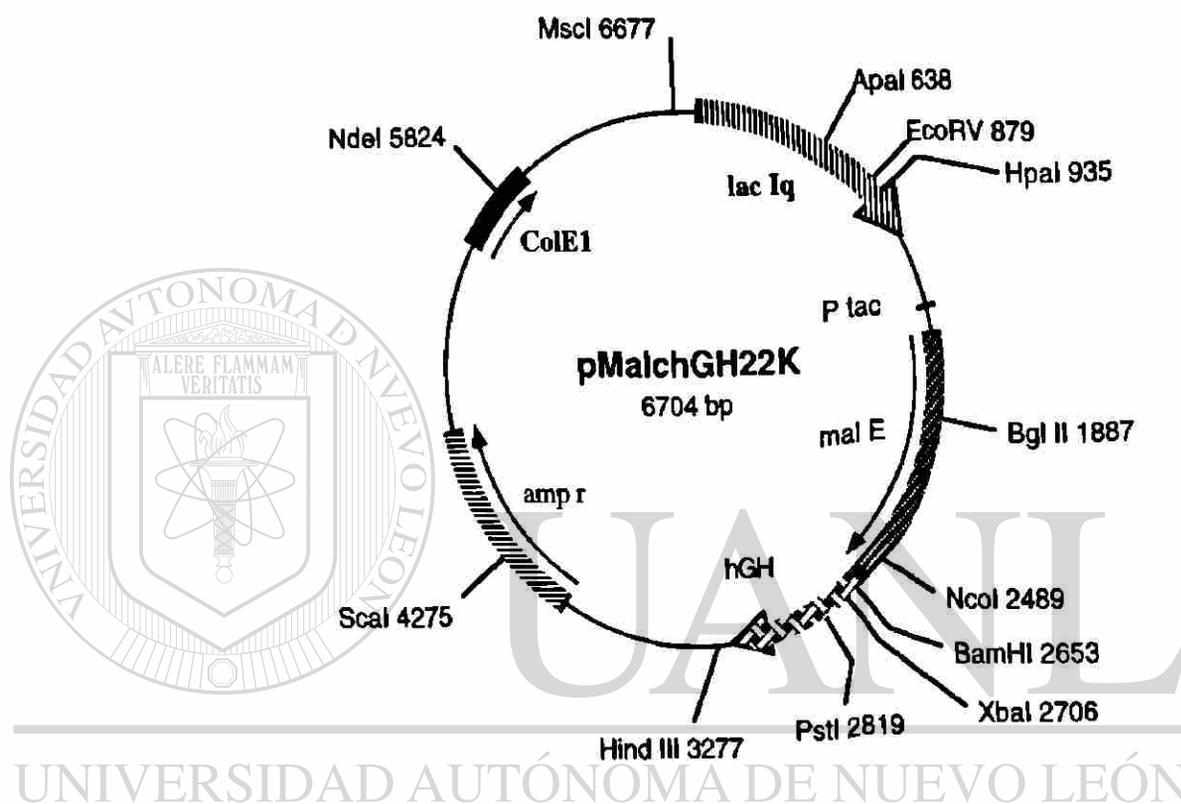


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

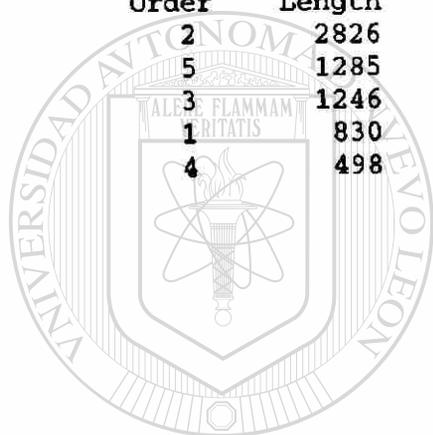
| | | | | |
|---|------|----------------|----|----------------|
| 2 | 6077 | 3261 *Hind III | -> | 2653 *BamH I |
| 1 | 608 | 2653 *BamH I | -> | 3261 *Hind III |

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 |



UANL

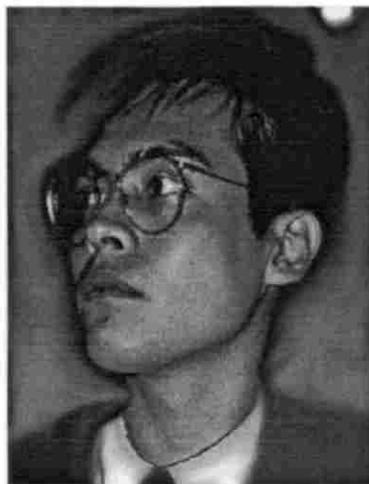
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

