UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

# PRODUCCION EN BIORREACTOR, PURIFICACION Y BIOENSAYO DE HORMONAS RECOMBINANTES DEL CRECIMIENTO

Por

M.C. JORGE ANGEL I. ASCACIO MARTINEZ

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

Marzo, 2004

M.C. JORGE ANGEL I. ASCACIO MARTINEZ

TD
QP572
.S6
A7
2004
c.1

1080123883

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

# PRODUCCION EN BIORREACTOR, PURIFICACION Y BIOENSAYO DE HORMONAS RECOMBINANTES DEL CRECIMIENTO

Por

M.C. JORGE ANGEL I. ASCACIO MARTINEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Marzo, 2004

TD
QP572
.S6
A7
2004

B.U. Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS DOCTORADO

**PRODUCCION EN BIORREACTOR, PURIFICACION Y BIOENSAYO DE HORMONAS RECOMBINANTES DEL CRECIMIENTO**

**Aprobación de la Tesis:**

**DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA**
**Director de la tesis**

**DR. LUIS J. GALAN WONG**
**Comisión de tesis**

**DR. MARCO A. RITO PALOMARES**
**Comisión de tesis**

**DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ**
**Comisión de tesis**

**DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA**
**Comisión de tesis**

**DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO**
**Subdirector**
**de Investigación y Estudios de Posgrado**

**El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, del Departamento de Bioquímica, en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.**

**AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme alcanzar una nueva meta en mi vida.

Al Dr. Hugo Barrera por su valiosa asesoría durante este periodo, por su apoyo y por su amistad.

A los doctores Herminia G. Rodríguez Martínez, Agnés Revol de Mendoza, Marco Antonio Rito Palomares y Luis Jesús Galán Wong por la revisión y sugerencias de esta tesis.

A todo el personal de la ULIEG, secretarias, intendentes, técnicos, docentes y no docentes. Que a fin de cuentas somos un mismo equipo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios.

A mis hermanos, amigos y conocidos que se interesaron por mis estudios.

A mi familia por todo el apoyo brindado durante este tiempo.

*Científicos inútiles somos,*
*porque tan solo hacemos*
*lo que debemos y no*
*vamos más allá.*

## DEDICATORIA

A mi esposa Ana Isabel Ramírez de Ascacio, a mis hijos: Anaisa Jocabeth, Jorge Angel y Carlos Daniel Ascacio Ramírez. Sin el apoyo de ellos esto no hubiera sido posible.

Muy especialmente a mi esposa, por el apoyo total e incondicional que recibo desde 1992 en los estudios de mi maestría, hasta el 2004 con la terminación de los estudios del doctorado. El trabajo fue de equipo, pero el mayor esfuerzo fue de ella. Yo tan solo me divertí en este mundo facinante de la ciencia. Lo menos que puedo hacer es agradecerle y dedicarle esta tesis.

## INDICE


**1. INTRODUCCION** ..... 1

**1.1** El reto creciente de mejorar la productividad y salud animal ..... 1

**1.2** La Biotecnología ..... 3

**1.3** La familia de la hormona de crecimiento ..... 3

**1.4** Hormonas del crecimiento animal ..... 5

**1.4.1** Hormona del crecimiento bovino (BGH) ..... 5

**1.4.2** Hormona del crecimiento caprino (CHGH) ..... 8

**1.4.3** Hormona del crecimiento equino (ECGH) ..... 11

**1.4.4** Hormona del crecimiento canino (CFGH) ..... 12

**1.4.5** Hormona del crecimiento felino (FCGH) ..... 14

**1.4.6** Hormona del crecimiento humano (HGH) ..... 15

**1.4.7** Lactógeno placentario humano (HPL) ..... 18

**1.5** Potencial biotecnológico de las GHs ..... 20

**1.6** Sistemas de expresión para las hormonas del crecimiento 22

**1.6.1** *Pichia pastoris* como sistema de expresión ..... 23

**2. JUSTIFICACION** ..... 28

**3. OBJETIVOS** ..... 30

**3.1** Objetivo general ..... 30

**3.2** Objetivos particulares ..... 30

**4. MATERIAL** ..... 31

**4.1** Reactivos químicos y medios de cultivo ..... 31
**4.2** Biológicos ..... 32
**4.3** Infraestructura ..... 33

**5. METODOLOGIA** ..... 35

**5.1** Estrategia general ..... 35
**5.2** Construcción de los plásmidos pBS-xGH para cada hormona 38
**5.2.1** Diseño de los oligonucleótidos para amplificar el ADNc de cada hormona ..... 38
**5.2.2** Amplificación por la RCP de los ADNcs de cada Hormona ..... 40
**5.2.3** Clonación del ADNc de cada GH en el vector pBS por "Vector T" ..... 42
**5.2.3.1** Minipreparación de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina ..... 43
**5.2.3.2** Generación del Vector "T" en el plásmido pBS II (+) ..... 45
**5.2.3.3** Ligación de cada ADNc de GH al vector pBS ..... 46
**5.2.3.4** Transformación con células calcio competentes *Escherichia coli XL1 Blue* 47
**5.2.3.5** Selección de colonias portadoras de plásmidos recombinantes ..... 48
**5.2.3.6** Caracterización por la RCP de los plásmidos pBS-xGH recombinantes ..... 49
**5.2.3.7** Verificación de la clonación de los ADNcs de cada hormona por enzimas de restricción 50

**5.3** Construcción de los vectores de expresión pPIC9-xGH para cada hormona ..... 50
**5.3.1** Hormona del crecimiento canino (CFGH) ..... 51
**5.3.2** Hormona del crecimiento equino (ECGH) ..... 52
**5.3.3** Hormona del crecimiento felino (FCGH) ..... 54
**5.3.4** Lactógeno placentario humano (HPL) ..... 56
**5.4** Construcción de las nuevas cepas de *Pichia pastoris* portadoras del "casete" de expresión para cada hormona 59
**5.4.1** Integración de cada vector pPIC9-xGH al genoma de *Pichia pastoris* ..... 59
**5.4.2** Verificación de la integración del "casete" de expresión por la RCP ..... 61
**5.4.2.1** Extracción de ADN genómico de las levaduras transfectadas ..... 62
**5.4.2.2** Detección del "casete" de expresión por RCP ..... 63
**5.5** Construcción del testigo negativo de expresión con el "casete" pPIC9 ..... 65
**5.6** Análisis del fenotipo $Mut^+$ o $Mut^s$ de las construcciones ..... 66
**5.7** Producción y análisis de las hormonas recombinantes a nivel matraz ..... 67
**5.7.1** Análisis de proteínas del medio de cultivo por EGPA-SDS ..... 69
**5.7.2** Diálisis y cuantificación de las proteínas totales del medio de cultivo ..... 70
**5.8** Otras cepas de *Pichia pastoris* productoras de GHs que se ensayaron ..... 70
**5.9** Escalamiento de la producción en biorrector ..... 71
**5.9.1** Etapa de preparativos ..... 73
**5.9.2** Etapa de preinóculo ..... 73
**5.9.3** Etapa de inoculación ..... 73
**5.9.4** Etapa de lote alimentado con glicerol ..... 74

**5.9.5** Etapa de inducción de lote alimentado con metanol 74
**5.9.6** Etapa de cosecha ..... 74
**5.10** Métodos y parámetros evaluados ..... 75
**5.11** Semipurificación de las hormonas recombinantes ..... 76
**5.12** Ensayo de la actividad biológica de las hormonas ..... 80

**6. RESULTADOS** ..... 83

**6.1** Iniciadores del ADNc de cada hormona ..... 83
**6.2** Amplificación por la RCP de los ADNcs de cada hormona 84
**6.3** Construcción de los plásmidos pBS-xGH ..... 85
**6.4** Construcción de los vectores pPIC9-xGH ..... 88
**6.5** Construcción de las nuevas cepas de *Pichia pastoris* ..... 92
**6.5.1** Verificación por RCP de la integración de los "casetes" de expresión ..... 92
**6.6** Construcción de la cepa testigo negativo de expresión ..... 94
**6.7** Identificación del fenotipo Mut de cada cepa ..... 96
**6.8** Producción y análisis a nivel matraz de las hormonas ..... 97
**6.9** Escalamiento a biorreactor de la producción de las hormonas ..... 101
**6.9.1** Proceso y desarrollo de la fermentación en biorreactor para la CFGH ..... 102
**6.9.2** Proceso y desarrolllo de la fermentación en biorreactor para el HPL ..... 105
**6.9.3** Proceso y desarrolllo de la fermentación en biorreactor para la HGH ..... 107
**6.9.4** Proceso y desarrolllo de la fermentación en biorreactor para la ECGH ..... 109
**6.9.5** Proceso y desarrolllo de la fermentación en biorreactor para la FCGH ..... 111
**6.9.6** Proceso y desarrolllo de la fermentación en biorreactor para la BGH ..... 113

**6.10** Semipurificación de las hormonas recombinantes ..... 115
**6.11** Inmunodetección de HGH recombinante del medio de cultivo de biorreactor ..... 119
**6.12** Ensayo de la actividad biológica en la línea celular Nb2 123
**6.13** Resumiendo ..... 126

**7. DISCUSION** ..... 127

**7.1** Construcción de las cepas ..... 127
**7.2** Producción de las hormonas recombinantes ..... 131
**7.3** Comparación con otros sistemas productores de GH ..... 135
**7.4** Semipurificación de las hormonas recombinantes ..... 143
**7.5** Otros análisis ..... 146

**8. CONCLUSIONES** ..... 149

**9. PERSPECTIVAS** ..... 151

**10. BIBLIOGRAFIA** ..... 152

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Estructura tridimensional consenso de las hormonas del crecimiento ..... 5

**Figura 2.** Industria caprina lechera ..... 10

**Figura 3.** Usos de la GH equina ..... 12

**Figura 4.** Efectos de la PGHr sobre cerdos de engorda ..... 13

**Figura 5.** El complejo multigénico hGH-hPL ..... 19

**Figura 6.** Uso del lactógeno placentario bovino en peces ..... 21

**Figura 7.** Producción de biomasa por *Pichia pastoris* ..... 25

**Figura 8.** Vector de expresión pPIC9 para *Pichia pastoris* ..... 26

**Figura 9.** Estrategia general para la construcción de las cepas .... 36

**Figura 10.** Estrategia general para producir y caracterizar a las hormonas recombinantes ..... 37

**Figura 11.** Esquema de la construcción de los pBS-xGH ..... 43

**Figura 12.** Construcciones de los vectores de expresión pPIC9-cfGH y pPIC9-ecGH ..... 53

**Figura 13.** Construcción del vector de expresión pPIC9-fcGH ..... 55

**Figura 14.** Construcción del vector de expresión pPIC9-hPL ..... 57

**Figura 15.** Esquema del proceso de fermentación ..... 68

**Figura 16.** Producción de hormonas recombinantes en biorreactor .... 72

**Figura 17.** Proceso de "Down Stream" para las hormonas recombinantes ..... 76

**Figura 18.** Iniciadores para amplificar el ADNc de las hormonas ... 83

**Figura 19.** Amplificación de los ADNcs de las GHs y el hPL ..... 84

**Figura 20.** Detección y caracterización de pBS-cfGH (ecGH y hPL) 87

**Figura 21.** Detección por RCP de las clonas con pPIC9-xGH ..... 89

**Figura 22.** Caracterización de pPIC9-cfGH, pPIC9-ecGH, pPIC9-fcGH y pPIC9-hPL ..... 91

**Figura 23.** Detección del "casete" de cfGH, ecGH, fcGH y hPL en el genoma de *Pichia pastoris* ..... 93

**Figura 24.** Identificación de las clonas "mock" (testigo negativo de expresión) de *Pichia pastoris* ..... 95

**Figura 25.** Caracterización del fenotipo Mut en las cepas de *Pichia pastoris* ..... 97

**Figura 26.** Producción en *Pichia pastoris* de las GHs (CFGH, HGH, HGH-V y ECGH) recombinantes ..... 98

**Figura 27.** Producción en matraz de todas las cepas productoras de las hormonas recombinantes ..... 99

**Figura 28.** Desarrollo de la fermentación en biorreactor de la CFGH 104

**Figura 29.** Desarrollo de la fermentación en biorreactor del HPL 106

**Figura 30.** Desarrollo de la fermentación en biorreactor de la HGH 108

**Figura 31.** Desarrollo de la fermentación en biorreactor de la ECGH 110

**Figura 32.** Desarrollo de la fermentación en biorreactor de la FCGH 112

**Figura 33.** Desarrollo de la fermentación en biorreactor de la BGH 114

**Figura 34.** Semipurificación de la CFGH ..... 116

**Figura 35.** Semipurificación de la BGH ..... 117

**Figura 36.** Semipurificación de las GHs animales y PL humano ..... 118

**Figura 37.** Detección por anticuerpos de la HGH recombinante ..... 121

**Figura 38.** Inmunodetección de las GHs y HPL ..... 122

**Figura 39.** Bioensayo en células Nb2 de la HGH y el HPL recombinantes ..... 124

**Figura 40.** Bioensayo en células Nb2 de las GHs animales ..... 125

## LISTA DE TABLAS

**Tabla I.** Consideraciones económicas y de bioseguridad de la BGHr ..... 7

**Tabla II.** Nuevas funciones atribuidas a la HGH 22 kDa ..... 16

**Tabla III.** Longitud característica de las GHs de mamíferos ..... 39

**Tabla IV.** Condiciones de la reacción de la RCP en la amplificación del ADNc ..... 40

**Tabla V.** Características de los ciclos del termociclador usados en la RCP de los ADNcs de las hormonas ..... 41

**Tabla VI.** Condiciones de reacción para la adición de timinas al vector pBS linerizado con *Eco* RV ..... 45

**Tabla VII.** Condiciones de reacción para la ligación del ADNc de cada hormona al vector de clonación pBS ..... 46

**Tabla VIII.** Condiciones para la reacción de ligación del ADNc de cada hormona con pPIC9 ..... 51

**Tabla IX.** Condiciones de la RCP para evidenciar la inserción del "casete" de expresión para cada hormona en el genoma de *Pichia pastoris* ..... 64

**Tabla X.** Programa de amplificación para los inciadores aox1 ..... 65

**Tabla XI.** Estimación del porcentaje de cada hormona en el medio de cultivo ..... 100

**Tabla XII.** Rendimiento y pureza de las hormonas recombinantes 119

**Tabla XIII.** Resumen de las cepas y hormonas analizadas en este trabajo ..... 126

## LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| **°C** | Grados Celsius. |
| **α-MF** | Factor de apareamiento alfa. |
| **µg** | Microgramos. |
| **µL** | Microlitros. |
| **µM** | Micromolar. |
| **aa** | Residuos aminoacídicos. |
| **Abs** | Absorbancia. |
| **ADN** | Acido desoxirribonucléico. |
| **ADNc** | ADN complementario al ARNm. |
| **Agit** | Agitación. |
| **$Amp^r$** | Gen de resistencia a ampicilina. |
| **AOX1** | Alcohol Oxidasa 1. |
| **aox1** | Gen de la alcohol oxidasa 1. |
| **AOX2** | Alcohol Oxidasa 2. |
| **aox2** | Gen de la alcohol oxidasa 2. |
| **ARN** | Acido ribonucléico. |
| **ARNm** | ARN mensajero. |
| **BGH** | Hormona del crecimiento bovino. |
| **bGH** | Gen de la hormona del crecimiento bovino. |
| **BMGY** | Medio rico amortiguado con glicerol. |
| **BMMY** | Medio rico amortiguado con metanol. |
| **BSA** | Albúmina sérica bovina. |
| **BST** | Somatotropina bovina o BGH. |
| **CFGH** | Hormona del crecimiento canino. |
| **cfGH** | Gen de la hormona del crecimiento canino. |
| **CHGH** | Hormona del crecimiento caprino. |
| **chGH** | Gen de la hormona del crecimiento caprino. |

| | |
|---|---|
| **CLAR** | Cromatografía líquida de alta resolución. |
| **Col E1** | Origen de replicación del ADN en Escherichia coli |
| **CS** | Somatomamotropina coriónica. |
| **CSH** | Somatomamotropina coriónica humana o HPL. |
| **dNTPs** | Desoxirribonucleósidos trifosfatados. |
| **DO** | Densidad óptica. |
| **$DO_{600\ nm}$** | Densidad óptica a 600 nm. |
| **DTT** | Ditiotreitol. |
| **ECGH** | Hormona del crecimiento equino. |
| **ecGH** | Gen de la hormona del crecimiento equino. |
| **EDTA** | Acido etilendiaminotetraacético. |
| **EGPA-Nativo** | Electroforesis en gel de poliacrilamida nativo |
| **EGPA-SDS** | Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante |
| **FCGH** | Hormona del crecimiento felino. |
| **fcGH** | Gen de la hormona del crecimiento felino. |
| **FDA** | Food and Drug Administration. |
| **FPLC** | Cromatografía líquida de baja presión. |
| **g** | Gramos. |
| **GHrs** | Hormonas del crecimiento recombinantes. |
| **GHs** | Hormonas del crecimiento. |
| **GRAS** | "generally regarded as safe". |
| **HDL** | High-density lipoprotein. |
| **hGH** | Gen de la hormona del crecimiento humano. |
| **HGH** | Hormona del crecimiento humano. |
| **HGH-N** | Hormona normal del crecimiento humano de 22 kDa. |
| **hGH-N** | Gen de la GH normal humana de 22 kDa. |
| **HGHr** | Hormona del crecimiento humano recombinante. |
| **HGH-V** | Hormona variante del crecimiento humano. |
| **hGH-V** | Gen de la hormona variante del crecimiento humano. |
| **his4** | Gen de la histidinol deshidrogenasa. |
| **His4** | Histidinol deshidrogenasa. |
| **hPL-1** | Gen del lactógeno placentario humano 1. |

| | |
|---|---|
| **hPL-2** | Gen del lactógeno placentario humano 2. |
| **hPL-3** | Gen del lactógeno placentario humano 3. |
| **HPL-3** | Lactógeno placentario humano 3. |
| **hrs** | horas. |
| **HS** | Suero de caballo. |
| **IPTG** | Isopropil β-tiogalactósido. |
| **kDa** | Kilodaltones. |
| **Kg** | Kilogramo. |
| **kpb** | Kilo par de bases. |
| **L** | Litros. |
| **LB** | Medio de cultivo de Luria-Bertani |
| **M** | Concentración Molar. |
| **met-HGH** | metionil-HGH. |
| **mg** | Miligramos. |
| **min** | minuto. |
| **mL** | Mililitros. |
| **mM** | Concentración milimolar. |
| **mm** | Milímetro. |
| **MTT** | Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazolio. |
| **$Mut^+$** | Methanol utilization plus. |
| **$Mut^s$** | Methanol utilization slow. |
| **ng** | Nanogramos. |
| **nm** | Nanómetros. |
| **NR** | Condiciones no reductoras. |
| **nuc** | Nucleótidos. |
| **OGH** | Hormona del crecimiento ovino. |
| **Oligo** | Oligonucleótidos o iniciadores. |
| **P** | Promotor. |
| **pb** | Pares de bases. |
| **PGH** | Hormona del crecimiento porcino. |
| **pGH** | Gen de la hormona del crecimiento porcino. |
| **pH** | -log $[H^+]$. |

| | |
|---|---|
| **pI** | Punto isoeléctrico. |
| **PL** | Péptido líder. |
| **PLF** | Proliferina. |
| **Prl** | Prolactina. |
| **Pro** | Promotor. |
| **PSI** | Libras por pulgada cuadrada. |
| **QS-FF** | Q-Sepharose fast flow. |
| **R** | Condiciones reductoras. |
| **r.p.m.** | Revoluciones por minuto. |
| **RCP** | Reacción en cadena de la polimerasa. |
| **RDB** | Medio de regeneración con dextrosa. |
| **RPRL** | Prolactina de rata. |
| **s** | Segundos. |
| **SBF** | Suero bovino fetal. |
| **SDS** | Lauril sulfato de sodio. |
| **Sevag** | Cloroformo-alcohol-isoamílico (24:1). |
| **SL** | Somatolactina. |
| **SS** | Secuencia señal. |
| **Taq** | *Thermus aquaticus*. |
| **TE** | Tris.Cl-EDTA. |
| **TSNT** | Técnica universal de extracción de ADN. |
| **TT** | Región terminadora. |
| **U** | Unidades. |
| **V** | Voltios. |
| **X-gal** | 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido. |
| **XGH** | Cualquiera de las GHs analizadas. |
| **YNB** | Base nitrogenada de levadura. |
| **YPD** | Medio de extracto de levadura, peptona y dextrosa. |
| **YPG** | Medio de extracto de levadura, peptona y glicerol. |

## RESUMEN

**Jorge A. Ascacio Martínez** **Fecha de Graduación: Marzo, 2004**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Medicina**

**Título de la tesis:** **PRODUCCION EN BIORREACTOR, PURIFICACION Y BIOENSAYO DE HORMONAS RECOMBINANTES DEL CRECIMIENTO**

**Número de páginas: 200** **Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.**

**Area de Estudio: Ingeniería Genética y Biotecnología**

**Propósito y método del estudio:** Las GHs además de participar en el crecimiento corporal, aumentan la producción de leche, la eficiencia alimenticia y mejoran las condiciones fisicas. Tanto la GH bovina (BGH) como la HGH existen desde hace años en el mercado y México las importa. Es muy deseable generar tecnología propia para producir estas GHs, lo mismo que otras de importancia para el área pecuaria y veterinaria, como lo son la del perro, cerdo, gato y caballo. Igualmente para el caso del lactógeno placentario (PL), cuyas nuevas propiedades siguen descubriéndose, como sucede con el PL bovino que estimula el crecimiento del salmón aun más que la BGH. Todas las GHs comerciales provienen de bacteria, siendo *Pichia pastoris* una excelente opción para producirlas de manera abundante, secretadas al medio de cultivo y biológicamente activas.

Se utilizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) para tanto amplificar como modificar el ADN complementario (ADNc) de cada hormona, el cual se clonó en pBS por la técnica del vector T, y de allí se subclonó en el vector de expresión pPIC9. El plásmido resultante se caracterizó, linearizó y transfirió al genoma de *Pichia pastoris* por recombinación homóloga. Para cada hormona se indujeron con metanol varias clonas para analizar la expresión a nivel de matraz. Se seleccionaron las clonas mejores productoras en cada caso y se escaló la producción de cada una de éstas en biorreactor. Se semipurificaron las hormonas probando diferentes resinas cromatográficas y por último se ensayó la actividad biológica en células Nb2.

**Contribuciones y conclusiones:** Se desarrolló el paquete biotecnológico que va desde la construcción de las cepas productoras de las hormonas de interés, su escalamiento en biorreactor, su recuperación y purificación, hasta el ensayo de su actividad biológica. Con éste fue posible elaborar todas las hormonas recombinantes biológicamente activas.

**FIRMA DEL DIRECTOR:** **Dr. Hugo A. Barrera Saldaña**