1. INTRODUCCION

Hace casi 80 años que se observó por primera vez que la administración de las hormonas del crecimiento (GHs) a animales estimulaba su crecimiento. La primera GH que se produjo en forma recombinante fue la de origen humano (HGH) y luego le siguió la bovina (BGH). La primera se comercializa para el tratamiento de enanismo hipofisiario, mientras que la segunda para estimular la producción lechera. Luego, con el hallazgo de la capacidad de las GHs de mamíferos para estimular el crecimiento en peces, se vislumbraron importantes aplicaciones para incrementar la eficiencia de producción en la acuacultura.

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

Dado el crecimiento de la población humana, en la primera mitad de este nuevo siglo se deberá igualar la producción de alimentos generada a lo largo de toda la historia de la humanidad. Comparado con los países desarrollados, el esfuerzo que México debe hacer frente a este enorme reto es aun mayor, pues sus sistemas de producción de alimentos son, en promedio, hasta diez veces menos eficientes que los de las naciones líderes (Barrera-Saldaña, 2001).

INTRODUCCION

Cada día más personas demandan mayor consumo de carne (derivada principalmente de las ganaderías bovina y porcina), de leche y sus derivados, así como de pollo y huevo. Mientras que estos últimos dos alimentos son el resultado de programas intensos de mejoramiento genético, tecnología y sistemas de producción bastante bien desarrollados y extendidos en nuestro país, las ganaderías bovina y porcina de carne y la bovina de leche, aun sufren de grandes rezagos (Saad y cols., 2000).

Para el sector pecuario, este reto reclama un impulso inusitado a la investigación en nuevos sistemas de producción animal, con al menos dos vertientes: incrementar la productividad y mejorar la salud de los animales. En esta última, la investigación se debe extender además a la salud de los animales salvajes en cautiverio y a la de los domesticados de alto

Aunque los esfuerzos a favor de la salud humana han sido de tal magnitud que se les reconoce como el motor que conduce a la investigación biomédica, en la salud animal el escenario es otro totalmente distinto. En general, la medicina veterinaria ha centrado sus esfuerzos en la nutrición y la prevención de enfermedades. Sin embargo, urge encontrar nuevos medicamentos que contribuyan a contrarrestar los problemas suscitados por el cautiverio de animales salvajes, por las enfermedades de los de rancho y granja, por el envejecimiento de nuestras mascotas y por los problemas asociados a las exigencias de mejores rendimientos de los animales de competencia (Barrera-Saldaña, 2000).

rendimiento para competencias deportivas.

1.2 La Biotecnología.

La biotecnología es la manipulación de los microorganismos, plantas y animales para hacer productos y procesos que beneficien al hombre. Su impulso reciente se debe al perfeccionamiento de las técnicas de aislamiento y manipulación de genes (tecnología del ADN recombinante o ingeniería genética) inventadas en la década de 1970. Con su nuevo arsenal, la biotecnología moderna contribuye a áreas tan diversas como la producción de alimentos, degradación de desechos industriales, la minería y la medicina.

Los logros más recientes incluyen a las plantas y animales transgénicos (aquellos que en el laboratorio se les introdujo un nuevo gen) y la producción de medicamentos por éstos; así como también a la explotación comercial de las secuencias génicas generadas por los proyectos genómicos de las principales plantas y animales de interés comercial, mismos que a disposición de los investigadores permitirán fabricar en organismos modificados genéticamente, proteínas de utilidad terapéutica, como vacunas, enzimas y hormonas.

1.3 La familia de la hormona de crecimiento.

Las GHs, que se producen naturalmente en la hipófisis y la placenta de los mamíferos, han demostrado poseer muchas cualidades de gran valor, tanto para incrementar la producción, como para mejorar la salud de animales de rancho y domésticos. Tales hallazgos han propiciado cada día

más investigaciones sobre las GHs en muchos laboratorios del mundo, incluyendo al nuestro (Barrera-Saldaña, 1998; Barrera-Saldaña y cols., 2000).

Las GHs pertenecen a una familia de proteínas con similitud estructural y funcional, también incluyen otras proteínas como lo son la prolactina (Prl), la somatolactina (SL), la somatomamotropina coriónica (CS) o lactógeno placentario (PL), la proliferina (PLF), y proteínas relacionadas a Prl (PLP) (Niall y cols., 1971). Esta familia multigénica representa uno de los grupos proteicos fisiológicamente más diversos que han evolucionado por duplicación génica. Los dos miembros más estudiados de la familia han sido la GH y la Prl, habiendo sido descritas desde los peces primitivos hasta los mamíferos, como importantes reguladores metabólicos producidas en los somatotropos de la hipófisis anterior.

En general, las Hormonas del Crecimiento presentan gran similitud en sus secuencias, son de tipo globular, generalmente constan de 190-191 residuos aminoacídicos, con un peso molecular alrededor de 22 kDa, poseen 4 hélices alfa y dos puentes disulfuro y por lo regular carecen de residuos de azúcares (figura 1). Recién sintetizadas presentan un péptido señal de 26 residuos aminoacídicos para dirigir el transporte de la pre-hormona a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso hacía el aparato de Golgi, de donde son secretadas al torrente sanguíneo ya en su forma de hormona madura.

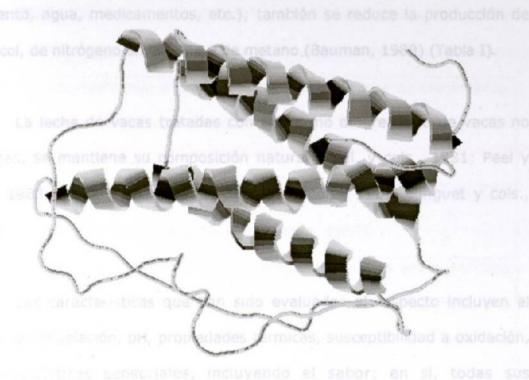


Figura 1. Estructura tridimensional consenso de las hormonas del crecimiento. Las GHs poseen en general 190 residuos aminoacídicos, cuatro hélices alfa y dos puentes disulfuro.

1.4 Hormonas del crecimiento animal.

1.4.1 Hormona del crecimiento bovino (BGH).

La hormona del crecimiento bovino (BGH) o somatotropina bovina (BST) mejora la eficiencia de producción de leche (por unidad de alimento consumido), y la producción (peso corporal) y composición (relación músculo:grasa) de la carne. En el caso del ganado lechero, esto permite la reducción del número de animales requeridos para la producción de leche y

el consecuente ahorro de dinero en el mantenimiento de los animales, (alimento, agua, medicamentos, etc.); también se reduce la producción de estiércol, de nitrógeno en la orina y de metano (Bauman, 1989) (Tabla I).

La leche de vacas tratadas con *BGHr*, no difiere de la de vacas no tratadas, se mantiene su composición natural (Peel, y cols., 1981; Peel y cols., 1983; Fronk y cols., 1983; Bauman y cols., 1989; Ringuet y cols., 1989).

Las características que han sido evaluadas al respecto incluyen el punto de congelación, pH, propiedades térmicas, susceptibilidad a oxidación, y características sensoriales, incluyendo el sabor; en si, todas sus propiedades organolépticas se conservan. Tampoco se han encontrado diferencias en las propiedades requeridas para producir queso.

TABLA I

CONSIDERACIONES ECONOMICAS Y DE BIOSEGURIDAD DE LA BGHr

- Su administración a animales incrementa la tasa de crecimiento,
 ganancia de peso y producción de carne y leche (Etherton y cols.,
 1984).
- Incrementa la producción de leche en el ganado vacuno lechero hasta 25% en promedio (Peel y Bauman, 1987).
- Estudios de la FDA de EUA demostraron que la BGHr no tiene efecto en dosis diarias equivalentes a 2.3 millones de veces a lo que sería expuesto un humano en cinco vasos de 8 onzas de leche al día (Sun, 1989).
- El uso de BGHr en ganado vacuno lechero no representa ningún riesgo para la salud de los consumidores (Sun, 1989; Juskevich y cols., 1990).

La administración de la *BGHr* se lleva a cabo por vía subcutánea y la formulación que actualmente se utiliza comercialmente (Prosilac) es una suspensión de liberación prolongada de 500 mg que se aplica cada catorce días. El sabor de la carne y leche de bovinos tratados con *BGHr* no es alterado, pero el contenido de grasa en la carne es menor, generándose carne de mayor calidad.

1.4.2 Hormona del crecimiento caprino (CHGH).

La investigación sobre producción lechera en ganado caprino, se ha venido incrementando debido a las consideraciones económicas que representa esta industria, lo que ha conducido a un mayor éxito comercial; tal como ha sucedido para la industria lechera del ganado bovino (Larson, 1978; Peel y Bauman, 1987; Haenlein, 1996; Klinger y Rosenthal, 1997; Loewenstein y cols., 1980; Kapture, 1982; Haenlein, 1985; Pinkerton, 1991; Hankin, 1992; Jackson, 1992). La leche de cabra puede ser un sustituto de la leche de vaca en aquellas personas que presentan intolerancia a esta última, sobre todos en los bebés donde se justifica por necesidad médica, debido a la intolerancia a las proteínas de la leche de vaca. Hay estudios que muestran que la leche de vaca es la causa principal de cólicos a veces fatales del 12 al 30 % en infantes menores de tres meses de edad, alimentados con fórmula láctea vacuna (Lothe y cols., 1982). En infantes alimentados con leche materna, los cólicos se relacionaron con el consumo de leche de vaca por las madres (Baldo, 1984; Cant y cols., 1985; Host y cols., 1988).

En infantes de mayor edad, se observó una incidencia cercana al 20% de intolerancia a las proteínas de la leche de vaca (Nestle, 1987). Además, se estimó que del 20 al 50% de todos los bebés con intolerancia a la leche de vaca, también lo eran a las proteínas de la leche de soya (Lothe y cols., 1982). Aproximadamente el 40% de los pacientes sensibles a las proteínas de la leche de vaca toleran bien las proteínas de la leche de cabra

(Brenneman, 1978; Zeman, 1982), posiblemente porque la lactoalbúmina es inmunoespecífica entre las especies (Hill, 1939), no así, la beta-lactoglobulina que parece ser el principal alergeno en la leche de vaca.

Una cabra en promedio produce alrededor de 750 litros de leche por año y muchas logran producir más de 1,000 litros. Existe ganado especial para la producción lechera, dentro del cual se han reportado cabras excelentes productoras de leche, que han llegado a sobrepasar los 3000 litros por año, incluso el record lo tiene una australiana que llegó a producir cerca de los 3500 litros.

Existen estudios en cabras en lactación en las que la administración de la BGHr incrementó hasta en un 30% la producción láctea y se estimuló el crecimiento de la glándula mamaria por encima del grupo estimulado con ordeña frecuente (Henderson, y cols., 1985; Knight, 1992; Baldi, 1999; Davis y cols., 1999; Baldi y cols., 2002; Boutinaud y cols., 2003). Sin embargo, no se ha reportado la fabricación de la CHGH recombinante, la cual por cierto es idéntica a la ovina y por ende pudiera emplearse en ambos ganados, lo que impactaría positivamente a la industria lechera caprina (figura 2).

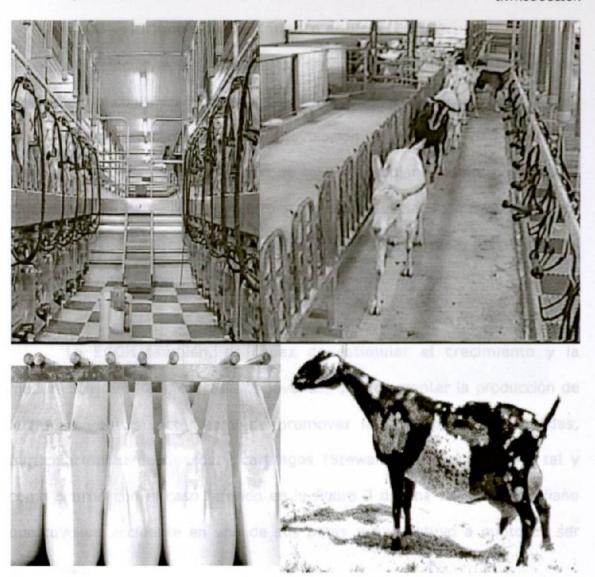


Figura 2. Industria caprina lechera. En la parte superior se muestran los corrales de ordeña automatizada, la cabra de la parte inferior corresponde a la raza nubian, una de las mejores productoras de leche y carne. En América uno de los países más productores de leche de cabra es Canadá, principalmente en la región de Ontario con más de 10 millones de litros producidos al año. Actualmente la industria lechera caprina ha ido en aumento y se pretende que llegue a ser como la industria lechera bovina.

1.4.3 Hormona de creclmiento equino (ECGH).

En relación a los caballos, la GH se utiliza en la prevención del desgaste muscular, en la reparación de tendones y de huesos fracturados, así como en el tratamiento de la anovulación en yeguas. Aparte de esto, también se utiliza en la reparación de tejido muscular y como tonificador y vigorizante en caballos de registro y de competencia, lo mismo que para mejorar las condiciones físicas en caballos de edad avanzada, restaurando el balance del nitrógeno.

La ECGH también, es capaz de estimular el crecimiento y la maduración temprana de caballos jóvenes, de incrementar la producción de leche en yeguas lactantes y de promover la cicatrización de heridas, particularmente de huesos y cartílagos (Stewart y Tuffnell, 1991), tal y como ocurrió con el caso referido en la figura 3 de una caballo australiano que tuvo un accidente en una de sus patas y que estuvo a punto de ser sacrificado.



Figura 3. Usos de la GH equina. Se muestra a "Might and Power" un caballo de carreras (derecha) que resultó ganador de la copa de Melbourne Australia en 1997. En 1999 se lastimó severamente el tendón de una de sus patas, fue sometido a tratamiento con ECGH, se recuperó y en el 2000 pudo regresar a las competencias de carreras.

1.4.4 Hormona de crecimiento canino (CFGH).

Respecto al perro (Canis familiaris), cada día hay mas evidencia del papel que juega su GH (CFGH) en el tratamiento de fracturas óseas, sobre las que la hormona ayuda a disminuir el tiempo de restauración del hueso (Millis y cols., 1998). No es menos importante el tratamiento de obesidad en perros, gracias a la activación del metabolismo que hace la hormona (Wilkens y cols., 1996), para la remoción de ácidos grasos, y en general,

INTRODUCCION

para contrarrestar todos los síntomas derivados de la ausencia o disminución de ésta. Además, por ser esta hormona idéntica a la GH del cerdo (PGH) (Ascacio-Martínez y Barrera-Saldaña, 1994a; Secchi y cols., 2001), todas sus virtudes son también válidas para la aplicación de la CFGH en la industria porcícola, donde genera carne más magra (figura 4) y por ende de mayor valor (Klindt y cols., 1992; Klind y cols., 1995; Ouyang y cols., 2003). Se ha reportado la producción de la PGH en diversos sistemas, en *Escherichia coli* (Seeburg y cols., 1983), en células en cultivo (Hwang y cols., 1992), en levaduras (Jo y cols., 1996; Ouyang y cols., 2001), en células de insecto (Ouyang y cols., 2000; Ouyang y cols., 2002).

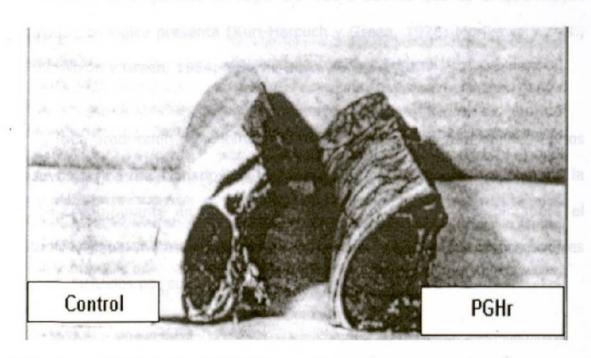


Figura 4. Efectos de la PGHr sobre cerdos de engorda. Estos lomos provienen de cerdos tratados durante 77 días con excipiente (control) y con una dosis diaria de 140 μg/kg de peso corporal de la PGHr (Tomado de Evock y cols., 1988).

1.4.5 Hormona de crecimiento felino (FCGH).

Aunque existe escasa literatura acerca de la GH del gato (FCGH), sin duda los beneficios identificados en las otras GHs se aplicarían sobre esta especie felina, ya que estos animales también presentan los síntomas arriba referidos para el perro, originados por la ausencia o baja concentración de la FCGH (enanismo y alopecia, entre otros síntomas).

Además, como está referido en la literatura, los ensayos biológicos de actividad adipogénica en células en cultivo (fibroblastos 3T3), utilizan suero de gato (que contiene FCGH) por carecer o tener baja concentración de factores adipogénicos en lugar del suero bovino que es el que mayor actividad biológica presenta (Kuri-Harcuch y Green, 1978; Morikawa y cols., 1982; Nixon y Green, 1984; Salazar-Olivo y cols., 1995).

La producción recombinante de esta GH sería de gran utilidad en los ensayos arriba mencionados. Ni que se diga sobre la utilidad que tendría la FCGH recombinante en las investigaciones que están por venir sobre el estudio y papel metabólico de esta hormona en su misma y otras especies felinas, incluidos por supuesto los grandes felinos en cautiverio.

1.4.6 Hormona del crecimiento humano (HGH).

La hormona del crecimiento humana (HGH 22 kDa) es uno de los productos estrella de la biotecnología farmacéutica, pues además de ser la cura para el enanismo hipofisiario, se utiliza en el tratamiento del Síndrome de Turner y en los pacientes con SIDA para ganar masa muscular. Además, se ha empezado a usar como anabólico en el atletismo, en la prevención de síntomas de la vejez, y en el tratamiento de traumatismos entre otros (Tabla II; Elian y cols., 1999). Sin embargo, no sucede lo mismo con el resto de las proteínas e isoformas pertenecientes a la familia: la isoforma hipofisiaria de 20 kDa (HGH 20 kDa), la variante placentaria (HGH-V), la isoforma también de 20 kDa de esta última (HGH-V 20 kDa), y el lactógeno placentario (HPL). En parte por ello, aún se desconoce mucho sobre sus funciones, mecanismos de acción y potencial farmacéutico.

TABLA II

NUEVAS FUNCIONES ATRIBUIDAS A LA HGH 22 kDa

INMUNIDAD Y CICATRIZACION

- Resistencia a enfermedades Elasticidad de la piel. comunes.
- Capacidad de cicatrización.
- Cicatrización de lesiones Crecimiento de pelo nuevo. antiquas.
- Cicatrización de otras lesiones.
- Tratamiento de úlceras.

FACTORES SEXUALES

- Duración de la erección.
- Aumento de la líbido.
- Potencia/frecuencia de la actividad Aspecto general y actitud. sexual.
- Regulación y control del ciclo menstrual.
- Bochornos y síntomas asociados.
- Efectos positivos en el sistema reproductivo.
- Incrementa el volumen de la leche materna.

FUERZA Y TONO MUSCULAR

- Aumenta la fuerza muscular.
- Promueve la ganancia de masa muscular.
- Proporciona energía en general.

GRASAS

- Remoción de ácidos grasos.
- Eleva los niveles de colesterol "bueno"(HDL).
- Reducción de grasa.

PIEL Y PELO

- Engrosamiento de la piel.
- Textura de la piel.
- Desaparición de arrugas.
- Hidratación de la piel.

FUNCION MENTAL

- Estabilidad emocional.
- Memoria.
- Energía mental y claridad de pensamiento.

SISTEMA CIRCULATORIO

- Mejora la circulación.
- Estabiliza la presión sanguínea.
- · Mejora el funcionamiento del corazón.

HUESO

- Aumenta la flexibilidad en la espalda y articulaciones.
- Tratamiento de fracturas óseas.
- Tratamiento de osteoporosis.

(Tomado de Elian y cols., 1999).

Todavía más, se sospecha que algunas de las variantes naturales menos abundantes de la hormona, como la HGH 20 kDa, pudieran retener las propiedades deseables de la hormona principal como lo es la promoción del crecimiento (Kostyo y cols., 1985; Smal y cols., 1987) y carecer de las otras indeseables de ésta, tales como el efecto diabetogénico que se desencadena con su uso prolongado (Lewis y cols., 1981; Daughaday, 1985; Towns y cols., 1992).

En ensayos biológicos realizados sobre las GHs humanas, al comparar la actividad biológica parecida a la insulina, resultó ser del 5% para la HGH 20 kDa y del 20% para la met-HGH 20 kDa en relación a la HGH 22 kDa (Frigeri y cols., 1979; Kostyo y cols., 1985).

Cabe mencionar que la forma proteica que presenta la actividad biológica es la monomérica, las formas oligoméricas tienen nula o poca actividad, tal es el caso de la forma dimérica de la HGH 22 kDa, donde la estimulación del crecimiento se ve disminuida alrededor de un 90% (Lewis y cols., 1977; Becker y cols., 1987). Inclusive, existen numerosos reportes donde se ha comparado la HGH 22 kDa en distintas actividades biológicas a la cual se le asigna el 100% de actividad, contra otras GHs de animales de diferentes especies, como la BGH bovina, la cual presentó el mismo porcentaje de actividad promotora del crecimiento, la GH de tortuga de mar con un 12% (Farmer y cols., 1976; Farmer y Papkoff, 1979). Es de notar

que la GH de la rana-toro presentó un 115% de actividad biológica (Farmer y cols., 1976; Farmer y cols., 1977).

La actividad biológica antilipolítica es otro bioensayo donde destacan las GHs de algunos peces en relación a la HGH 22 kDa, por ejemplo la GH de salmón presentó más del 600% de actividad; otros peces como el pez "bonito" y el "cola amarilla" presentaron también muy altos valores (Campbell y cols., 1991).

1.4.7 Lactógeno placentario humano (HPL).

Aparte de los dos genes hGH (normal y variante), tres hPLs complementan la familia multigénica hGH-hPL del genoma humano y se acomodan en el siguiente orden: hGH-N, hPL-1, hPL-2, hGH-V y hPL-3 (Chen y cols., 1989; Barrera-Saldaña, 1998) (figura 5). Mientras que el hPL-1 es un pseudogen, el hPL-2 y hPL-3 son muy activos en placenta e interesantemente las versiones maduras de las hormonas que codifican son idénticas (Barrera-Saldaña y cols., 1983).

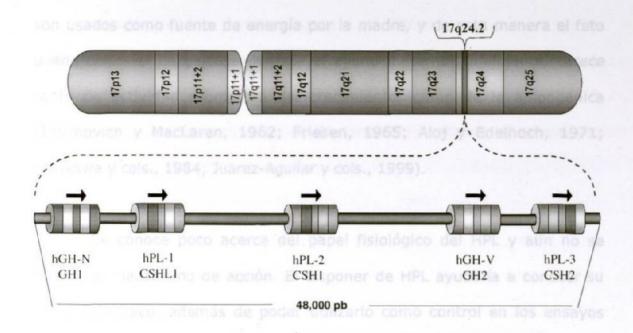


Figura 5. El complejo multigénico hGH-hPL. De la región del cromosoma 17 correspondiente a la banda q24.2, se muestra el locus de 48,000 pb con los genes que constituyen la familia hGH-hPL.

HPL se detecta en suero materno a partir de la cuarta semana de gestación, incrementándose a lo largo del embarazo de manera lineal, hasta alcanzar niveles de producción de hasta un par de gramos diarios al final de la gestación. Interviene en el metabolismo materno en favor del feto, pues aumenta la secreción de insulina, disminuye la tolerancia a la glucosa, retiene el nitrógeno de la madre durante el embarazo.

Estas acciones resultan en una elevación de la glucosa y los aminoácidos en la circulación materna, mismos que utiliza el feto para su

INTRODUCCION

desarrollo; además, genera ácidos grasos libres por su efecto lipolítico, que son usados como fuente de energía por la madre, y de esta manera el feto puede disponer de glucosa durante el ayuno materno; finalmente, carece tanto de actividad promotora del crecimiento, como de la adipogénica (Josimovich y MacLaren, 1962; Friesen, 1965; Aloj y Edelhoch, 1971; Morikawa y cols., 1984; Juarez-Aguilar y cols., 1999).

Se conoce poco acerca del papel fisiológico del HPL y aun no se conoce el mecanismo de acción. El disponer de HPL ayudaría a conocer su papel fisiológico, además de poder utilizarlo como control en los ensayos biológicos donde sería un referente negativo para los ensayos de propiedades somatotróficas y adipogénicas, así como uno positivo de las lactotróficas.

1.5 Potencial biotecnológico de las GHs.

Numerosos trabajos muestran el valioso potencial de las GHs, pues aparte de su uso en sus especies de origen, se ha demostrado que las GHs de los primates tienen actividad sobre los demás animales filogenéticamente inferiores, incluyendo a los peces y no al revés. Existen experimentos donde la BGH y la GH porcina (PGH) se han utilizado para el tratamiento del enanismo hipofisiario en perros (Eigenmann y cols., 1981) y en gatos (Muller y cols., 1989).

En cuanto a animales de granja respecta, los ganados porcino, bovino, caprino y ovino, han sido tratados con GH exógena para mejorar la producción, pues aumenta la eficiencia de conversión alimenticia, la tasa de crecimiento, la ganancia de peso y la producción de leche y carne. Más sorprendente ha sido el hallazgo en el que la BGH estimula el crecimiento del salmón, y todavía más interesante aún, el que el lactógeno placentario (PL) bovino funciona aún mejor (Devlin y cols., 1994), tal y como se ilustra en la figura 6.

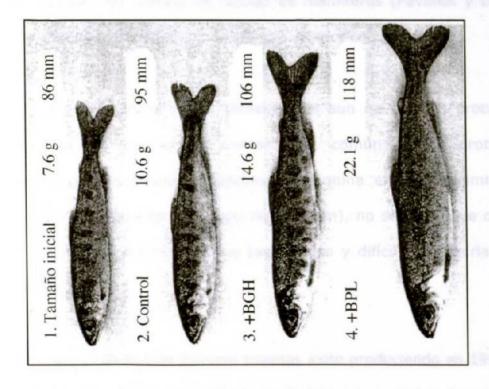


Figura 6. Uso del lactógeno placentario bovino en peces. Efecto en el salmón juvenil con la administración de inyecciones semanales de albúmina sérica bovina (BSA) (control), BGH o somatotropina bovina (BST) y lactógeno placentario bovino (BPL).

1.6 Sistemas de expresión para las hormonas del crecimiento.

De entre los primeros genes clonados y expresados en la bacteria *Escherichia coli*, se encuentran precisamente el de la HGH (Goeddel y cols., 1979) y el de la BGH (Miller y cols., 1980). Los trabajos con la primera ilustran los diferentes sistemas que se han probado para producirla, habiéndose conseguido su fabricación comercial no sólo en *Escherichia coli*, sino también en *Bacillus subtillis* (Franchi y cols., 1991) y en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Tokunaga y cols., 1985) y *Hansenula polymorpha* (Aprikian y cols., 1991). También se han probado sistemas de producción basados en cultivos de células de mamíferos (Pavlakis y cols., 1981), lo mismo que en animales transgénicos (Kerr y cols., 1997).

Sin embargo, los animales transgénicos aun no ofrecen procesos rentables, mientras que en las bacterias es común que la proteína recombinante sufra cambios indeseables (metionina extra, plegamiento incorrecto y precipitación como cuerpo de inclusión), no se modifique como se requiere (glicosilación nula) y que sea tedioso y difícil recuperarla con actividad biológica.

En nuestro laboratorio primero tuvimos éxito produciendo en 1994 la CFGHr y la HGHr en *Escherichia coli*, fusionándola a la proteína de unión a maltosa (CFGH-MBPr y HGH-MBPr, respectivamente). Sin embargo, conscientes de que para recuperar la hormona, ya sea del periplasma o del citoplasma bacteriano, se requería de estrategias complicadas, sumado a las

limitaciones del sistema bacteriano para plegar y procesar proteínas heterólogas correctamente, nos abocamos a buscar un sistema de expresión que permitiera sintetizar la proteína, purificarla con mayor facilidad y retener su funcionalidad.

Se sabe que las levaduras ofrecen las mejores características de los sistemas bacterianos y eucariontes, pues además de realizar varias de las modificaciones postraduccionales comunes a los organismos superiores, son casi tan fáciles de crecer en matraces y biorreactores como las bacterias, empleando medios de cultivo relativamente baratos (Romanos y cols, 1992).

específicamente la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* es un excelente sistema de expresión para hormonas del crecimiento (Escamilla y cols., 2000). Recientemente, un grupo de investigadores chinos logró construir una cepa de *Pichia pastoris* capaz de producir y secretar al medio de cultivo la hormona del crecimiento porcina biológicamente activa (Ouyang y cols., 2003).

1.6.1 Pichia pastoris como sistema de expresión.

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica (capaz de crecer en metanol como única fuente de carbono), que lleva a cabo modificaciones postraduccionales, produce niveles de proteínas recombinantes de uno a dos órdenes de magnitud por encima de Saccharomyces cerevisiae (Faber y

INTRODUCCIÓN

cols., 1995), es capaz de secretar proteínas heterólogas al medio de cultivo (donde los niveles de proteínas nativas son muy bajos) y que en contraste con esta última, puede cultivarse a altas densidades celulares de más de 450g/L en peso húmedo y de 100 g/L de peso seco (Siegel y Brierley, 1989; Cereghino y Cregg, 2000) (figura 7), haciéndola con mucho una de las más productivas, logrando concentraciones hasta de gramos del recombinante por litro de medio de cultivo (Romanos y cols., 1991; Clare y cols., 1991a).

El promotor del gen de la alcohol oxidasa 1 (aox1) de *Pichia pastoris* es uno de los que más se emplean para dirigir la síntesis de proteínas recombinantes. Es tan fina su regulación, que en presencia de otra fuente de carbono que no sea metanol (como glicerol o glucosa), el sistema está apagado completamente (Ellis y cols, 1985) y basta reemplazar dicha fuente por metanol para encenderlo.

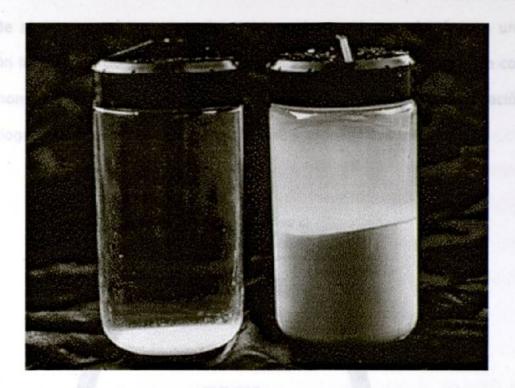


Figura 7. Producción de biomasa por Pichia pastoris. Esta levadura alcanza altas densidades celulares en biorreactores. Se muestran dos botellas que contienen medio de cultivo con biomasa a diferente densidad celular. El de la izquierda corresponde a uno crecido en matraz con deflectores con una Densidad Optica (DO) a 600 nm de 1.0. Mientras que el de la derecha corresponde a uno crecido en un biorreactor y tiene una DO a 600 nm de 500.

Gracias a los desarrollos que con *Pichia pastoris* han hecho varios laboratorios de universidades norteamericanas y de la Compañía Invitrogen (San Diego, Ca, EUA) principalmente, ya se cuenta con protocolos para transformar fácilmente a la levadura con el vector plasmídico de integración, como los de la familia pPIC (figura 8) que tiene la capacidad de integrar un

gen de alguna proteína de interés. Tal transformación se efectúa con una versión linearizada de dicho plásmido en regiones génicas que comparte con el genoma de la levadura, lo que estimula su integración por recombinación homóloga en este último, donde se mantiene y propaga establemente.

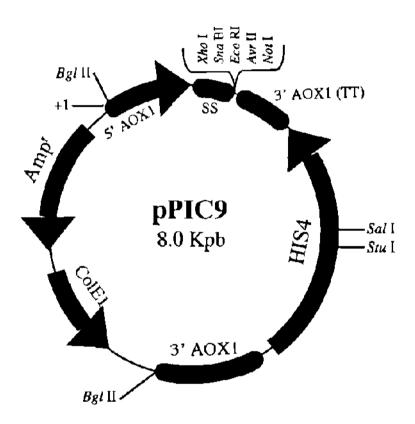


Figura 8. Vector de expresión pPIC9 para *Pichia pastoris*. Posee los siguientes genes: región 5´ de la alcohol oxidasa (5´ aox1), secuencia señal de *Saccharomyces cerevisiae* (SS), señal de terminación de la transcripción (3' aox1 TT), gen de la histidinol deshidrogenasa (HIS4), región 3´ de la alcohol oxidasa (3´ aox1), origen de replicación de *Escherichia coli* (ColE1) y el gen de resistencia a ampicilina (Ampf). Además, posee una región de sitios únicos de clonación en tandem enfrente de la región SS.

INTRODUCCION

En nuestro laboratorio de Biotecnología de la ULIEG hemos desarrollado la capacidad de obtener por clonación molecular prácticamente cualquier gen o ADNc de la familia de la GH de cualquier especie animal y humana, habiéndolo ya logrado en los casos de las GHs de perro, coyote, tlacuache, gato, león, jirafa, vaca, cabra, caballo, chimpancé, mono verde, mono araña y humano. Finalmente, en la búsqueda de mejores tecnologías de expresión para las hormonas del crecimiento susceptibles de ser comercializadas, en nuestro laboratorio se desarrolló la cepa de la levadura *Pichia pastoris* productora de la HGHr (Escamilla-Treviño y cols, 2000).

Posteriormente, en búsqueda de aumentar la producción de HGH, se subclonó el ADNc de HGH de pPIC9 a pPIC9K tratando de obtener cepas multicopias, lográndose obtener una cepa de *Pichia pastoris* 30% más productora de HGHr (Sánchez-Domínguez, 1998). Otros autores han reportado el mejoramiento de la expresión proteica en cepas multicopia (Clare y cols., 1991a; Clare y cols., 1991b; Vassileva y cols., 2001). En virtud del enorme potencial que las GHs animales y humana pueden ofrecer para la industria pecuaria, medicina veterinaria y sector salud de nuestro país, en el presente trabajo documentamos los logros obtenidos al conseguir construir cuatro nuevas cepas de *Pichia pastoris* productoras de las GHs canina-porcina, equina, felina y lactógeno placentario humano, así como del escalamiento a biorreactor, desarrollo del esquema de purificación y bioensayo de las ya mencionadas hormonas, incluyendo además las GHs humana y bovina.

2. JUSTIFICACION

Las GHs animales además de participar en el crecimiento corporal aumentan la producción de leche, la eficiencia alimenticia y mejoran las condiciones físicas de los animales. Por su parte la HGH se utiliza en el tratamiento del enanismo hipofisiario y en el síndrome de Turner entre otros. Tanto la GH bovina (BGH) como la HGH existen desde hace años en el mercado y México las importa, por lo que sería muy deseable generar tecnología propia para producir estas GHs. Lo mismo aplica a otras GHs de importancia para el área pecuaria y veterinaria, como lo son la del perro, cerdo, gato, caballo y vaca.

También resulta de interés el lactógeno placentario (PL), al que nuevas propiedades se le siguen descubriendo, como sucedió con el PL bovino cuyo estímulo al crecimiento del salmón resultó superior al de la BGH (Devlin y cols., 1994). 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 (Cregg y cols., 2000).

JUSTIFICACION

Por lo anterior nace el presente proyecto, cabiendo mencionar que esta es la primera vez que se realiza este tipo de investigación de manera integral sobre la construcción, producción en matraz, escalado de la producción a biorreactor, purificación, análisis y bioensayo de tres GHs y un lactógeno placentario humano recombinantes; así como el escalamiento en biorreactor y análisis de otras GHs previamente construidas en nuestro laboratorio.

Como ya se dijo, las GHs de mamíferos tienen actividad en animales filogenéticamente inferiores, no obstante, se pueden desencadenar reacciones potencialmente adversas a la terapia con GHs heterólogas, por lo que el contar con la GH especie-específica evitaría tales efectos indeseables.

Con los conocimientos adquiridos podremos ofrecer al sector industrial tecnología y asesoría en el campo. Además, la disponibilidad de las GHs animales permitirá iniciar estudios para su aprovechamiento en la industria ganadera (equina, bovina y porcícola); lo mismo aplica para la de origen humano en su área respectiva.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Construir cepas de *Pichia pastoris* portadoras de los ADNcs de las GHs equina, canina, felina y el lactógeno placentario humano; producirlas en biorreactor incluyendo las GHs de origen bovino y humano; purificar y ensayar su actividad biológica en cultivo celular.

3.2 Objetivos particulares.

- 1. Diseñar los iniciadores para amplificar los ADNcs de cada hormona.
- 2. Amplificar por la RCP los ADNcs de cada hormona.
- Construir los plásmidos pBS con los ADNcs amplificados de las hormonas.
- Construir los vectores pPIC9 de levadura para cada hormona.
- **5.** Construir las cepas de *Pichia pastoris* productoras de las hormonas.
- **6.** Construir el testigo negativo de expresión pPIC9 en GS115.
- **7.** Caracterizar el genotipo Mut de cada construcción.
- **8.** Producir y analizar a nivel matraz las hormonas recombinantes.
- **9.** Escalar la producción en biorreactor de cada hormona.
- 10. Desarrollar el esquema de semipurificación de las GHs y del HPL.
- Analizar y caracterizar las hormonas recombinantes producidas.
- **12.** Probar la actividad biológica de las GHs y del HPL en cultivo celular.

4. MATERIAL

4.1 Reactivos químicos y medios de cultivo.

Los iniciadores u oligos necesarios para llevar a cabo la amplificación específica de cada ADNc para cada GH y del Lactógeno Placentario Humano, se mandaron sintetizar a la compañía Gibco-BRL (Grand Island, NY. EUA).

Los reactivos para elaborar las soluciones (amortiguadores, soluciones salinas, medios de cultivo, geles etc.) se obtuvieron de las siguientes casas comerciales: Sigma Chemical Company, Inc (ST. Louis, MO. EUA); Merck (Monterrey, México), Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, WI. EUA) y Difco (Detroit, MI. EUA).

Las enzimas de restricción y de modificación de ácidos nucleicos que se utilizaron se obtuvieron de las siguientes casas comerciales Bethesda Research Laboratories, Inc. (BRL, Gaithersburg, MD. EUA) y New England Biolabs, Inc. (NEB, Beverly, MA. EUA), la Taq polimerasa de ADN se obtuvo de Perkin Elmer-Cetus (Almeda, CA. EUA) y los desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTPs) de Promega Co. (Madison, WI. EUA).

4.2 Biológicos.

La cepas de *Escherichia coli* XL1-Blue y DH-5α utilizadas para la transformación y construcción de los vectores de expresión, así como la cepa de levadura GS115 de *Pichia pastoris* utilizada en la transformación de los "casetes" de expresión de cada GH, fueron adquiridos de la cepateca de la ULIEG. Los plásmidos que contienen el ADNc que codifica para cada hormona, el Bluescript utilizado en la clonación por vector "T" y el vector de expresión pPIC9 para *Pichia pastoris*, fueron adquiridos de la plasmidoteca de la ULIEG.

El estuche de *Pichia pastoris* que se utilizó para la construcción de los sistemas de expresión se adquirió de la compañía Invitrogen Co. (Gaithersburg, MD. EUA). La línea celular de linforma de rata Nb2 que se utilizó para los ensayos de la actividad biológica, fue proporcionada por la Dra. Carmen Clapp y el Dr. Carlos Arámburo del Instituto de Neurobiología (INB) de la UNAM.

4.3 Infraestructura,

Se emplearon los siguientes equipos y aparatos: Ultracongelador So-Low de Environmental Equipment (Cincinati, Ohio, EUA termocicladores PTC-100 de la marca MJ Research (Waltham, MA. EUA) secuenciador automatizado modelo *IR* 4200 [LI-COR (Lincoln, NE. EUA)], bomba peristáltica dynamax, modelo RP-1 de Rainin (EUA), liofilizadora LABCONCO modelo 4.5 (Kansas, EUA), centrífugas y ultracentrífugas de la marca Beckman-Coulter (Fullerton, CA. EUA) modelos: Allegra 21R, Optima TLX, TJ-6, J2-MI y L5-50E y de la marca Eppendorf (Barkhausenweg, Hamburgo, Alemania) modelos: 5414, 5415C y 5402, dos sistemas de esterilización por calor húmedo Market Forge (Sterilmatic), autoclave de 30x30x30 in. de doble cámara modelo Arévalo (Guanajuato, Gto. Mx.), incubadoras Shel Lab SL (Sheldon Manufacturing Inc.) modelos: 1535 y 1330GX y agitador orbital (ORBIT) de Lab Line.

También, se usó un sistema de digitalización y análisis de imagen GEL DOC 1000/PC de la marca BIO-RAD (Hercules, CA. EUA) e ImageJ versión 1.30P (USA), espectrofotómetro de la marca Beckman-Coulter (Fullerton, CA. EUA) modelo Du-70, biofotómetro (Eppendorf), balanzas de la marca OHAUS modelos Analytical *Plus* y Precision *Standard*, potenciómetro digital de la marca ORION modelo 420 A, unidad ultraconcentradora de 100 mL (Spectrum) (EUA), concentrador al vacío CENTRIVAP de la marca LABCONCO (Kansas City, MO. EUA), fuentes de poder para electroforesis de la marca Gibco-BRL-Life Technologies Inc.

(Carlsbad, CA. EUA) modelo 500, cámaras de electroforesis horizontal de la marca BIO-RAD (Hercules, CA. EUA), campana de extracción y gabinete de bioseguridad nivel II de la marca LABCONCO (Kansas City, MO. EUA), biorreactor de 1 litro, modelo Bioflo 3000 de la marca New Brunswick Scientific (NBSC) (EUA).

El trabajo de cómputo se realizó en un ordenador Apple modelo G4 640/400. Los programas requeridos para el análisis y manipulación de secuencias nucleotídicas fueron: Amplify versión 2.53 (Bill Engels, ©1992, Madison, WI. EUA), DNA Strider™ versión 1.3 (© Ch. Marck & C.E.A. Service de Biochimie Département de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), Oligo versión 4.0 (1992 Wojciech Rychlik, National Bioscience, Inc., Plymouth, MN. EUA).

5. METODOLOGIA

5.1 Estrategia General.

Las siguientes son las etapas de la estrategia general (figuras 9 y 10) en las que se dividió el trabajo:

- a) Construcción de las nuevas cepas de *Pichia pastoris* productoras de las hormonas recombinantes.
- **b)** Producción en matraz de las hormonas.
- **c)** Escalamiento a biorreactor.
- d) Análisis y caracterización de las hormonas producidas.
- e) Desarrollo del esquema de semipurificación de las hormonas.
- f) Determinación de la actividad biológica de cada hormona.

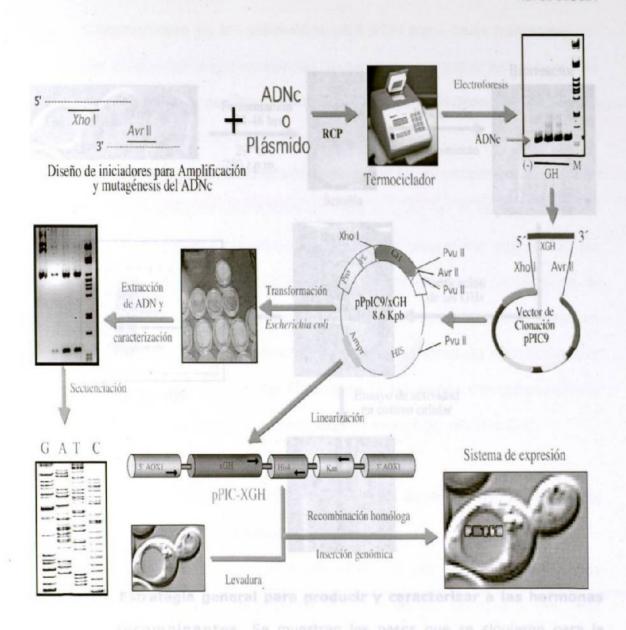


Figura 9. Estrategia general para la construcción de las cepas. Se muestran los pasos que se siguieron para construir y caracterizar las nuevas cepas de *Pichia pastoris* productoras de las GHs y del Lactógeno Placentario Humano. Los protocolos que se siguieron están basados en los de Ausubel y cols., 1999 y en los de Sambrook y cols., 1989, a menos que se indique otra cosa.

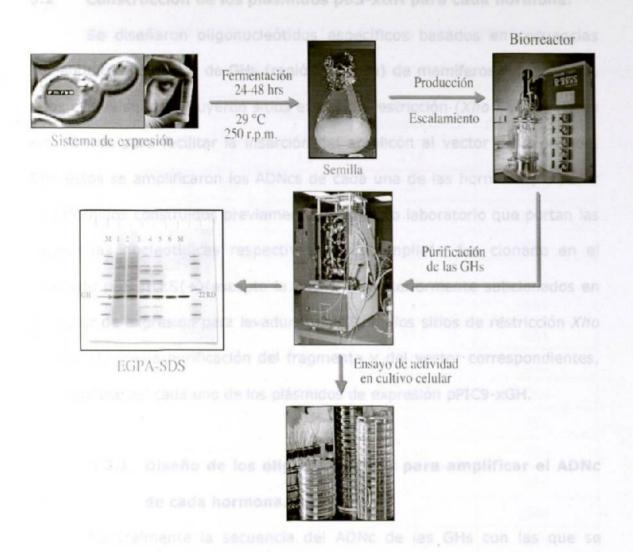


Figura 10. Estrategia general para producir y caracterizar a las hormonas recombinantes. Se muestran los pasos que se siguieron para la producción y escalamiento de las hormonas recombinantes, su semipurificación y bioensayo de cada una de las distintas hormonas recombinantes.

5.2 Construcción de los plásmidos pBS-xGH para cada hormona.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos basados en secuencias nucleotídicas consenso de GHs (región madura) de mamíferos relacionados, a los cuales se les incluyeron sitios extras de restricción (*Xho* I y *Avr* II) en sus flancos para facilitar la inserción del amplicón al vector de expresión. Con éstos se amplificaron los ADNcs de cada una de las hormonas, a partir de plásmidos construidos previamente en nuestro laboratorio que portan las secuencias nucleotídicas respectivas. Cada amplicón fue clonado en el plásmido pBS II KS(+)(excepto la FCGH) y posteriormente subclonados en el vector de expresión para levaduras pPIC9, en los sitios de restricción *Xho* I y *Avr* II, previa purificación del fragmento y del vector correspondientes, originándose así cada uno de los plásmidos de expresión pPIC9-xGH.

5.2.1 Diseño de los oligonucleótidos para amplificar el ADNo de cada hormona.

Naturalmente la secuencia del ADNc de las GHs con las que se trabajó corresponde a una longitud de 648 pb y de 651 pb para el HPL, ésta codifica para una proteína de 216 residuos aminoacídicos en el caso de las GHs y de 217 para el HPL. De éstos, los primeros 26 residuos corresponden al péptido líder, necesario para que la proteína pueda ser secretada hacia el medio de cultivo, eliminándolo en este proceso de tal forma que la hormona queda en su versión madura, con una longitud de 190 residuos aminoacídicos para las GHs y de 191 residuos para el HPL (Tabla III).

TABLA III

LONGITUD CARACTERISTICA DE LAS GHS DE MAMIFEROS

HORMONA DE CRECIMIENTO	Péptido Líder (aa)	Proteína Madura (aa)	Longitud Aminoacídica	Longitud Nucleotídica
Caballo	26	190	216	648
Регго	26	190	216	648
Gato	26	190	216	648
HPL*	26	191	217	651
Humano	26	191	217	651
Marmoset	26	191	217	651
Mono rhesus	26	191	217	651
Jirafa	26	191	217	651
Borrego	27	191	218	654
Cabra	27	191	218	654
Vaca	27	191	218	654
Chevrotain	27	190	217	651
Tlacuache	25	190	215	645
Otros mamíferos	26	190	216	648

^{*} Lactógeno Placentario Humano

En estos casos se tomó en cuenta únicamente la secuencia del ADNc correspondiente a cada hormona madura, ya que el vector de expresión pPIC9 tiene su propio péptido líder que es el del factor de apareamiento α (α -MF) de la levadura Saccharomyces cerevisiae.

5.2.2 Amplificación por la RCP de los ADNcs de cada hormona.

Se utilizó un termociclador PTC-100 (M. J. Research, Inc) para realizar la amplificación de los ADNcs de las hormonas del crecimiento y del lactógeno placentario. Se prepararon las mezclas de reacción, las condiciones que se utilizaron para realizar la RCP se muestran en la Tabla IV.

TABLA IV

CONDICIONES DE LA REACCION DE LA RCP
EN LA AMPLIFICACION DEL ADNO

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACION FINAL
Agua ultrapura	10.0 µL	Volumen final=25 µL
Amortiguador 10 X	2.5 μL	1 X
MgCl₂ 25 mM	1 .5 µL	1.5 mM
dNTPs 10 mM	0.75 μL	300 μΜ
Oligo 5΄ 5 μM	2.5 µL	0.5 μΜ
Oligo 3΄ 5 μM	2.5 μL	0.5 μΜ
ADNc 10 ng/μL	5.0 µL	2.0 ng/µL
ADN Polimerasa Taq (5U/µL)	0.3 μL	0.06 U/µL

Se mezclaron bien los tubos y se les agregó una gota de aceite mineral para evitar la evaporación. Por último, se sometieron a la reacción en el termociclador. Las condiciones de los ciclos (tiempo y temperatura) de amplificación en el termociclador que se usaron en la síntesis de los ADNcs de las hormonas se muestran en la Tabla V.

TABLA V

CARACTERISTICAS DE LOS CICLOS DEL TERMOCICLADOR USADOS
EN LA RCP DE LOS ADNOS DE LAS HORMONAS

PASO	TEMPERATURA °C	TIEMPO
1	94	5 min.
2	94	30 seg.
3	58	45 seg.
4	72	1 min.
5 (Del 2 al 4)		28 ciclos
6	72	5 min.
7	FIN	

5.2.3 Clonación del ADNc de cada GH en el vector pBS por "Vector T".

Durante la RCP, la Taq ADN polimerasa adiciona un nucleótido extra de adenina en el extremo 3' de los amplicones. Esta característica es aprovechada en la técnica de clonación por "Vector T" (Clark, 1988; Mole y cols., 1989; Marchuk y cols., 1991), donde el vector de clonación se corta con una enzima de restricción que deje los extremos "romos". Luego se adiciona el nucleótido timina que es complementario al de adenina en su extremo 3'. Posteriormente el amplicón (ADNc de interés) y el vector pBS son ligados y las construcciones plasmídicas (pBS-xGH) son propagadas en *Escherichia coli*, en la figura 11 se esquematizan los pasos que se siguieron para la construcción.

La clonación se inició con la obtención de ADN plasmídico de pBS II KS(+) a partir de colonias de *Escherichia coli* (XL1 Blue) portadoras del plásmido con el fin de disponer de suficiente material para el proceso de clonación de los ADNcs según Sambrook y cols., 1989.

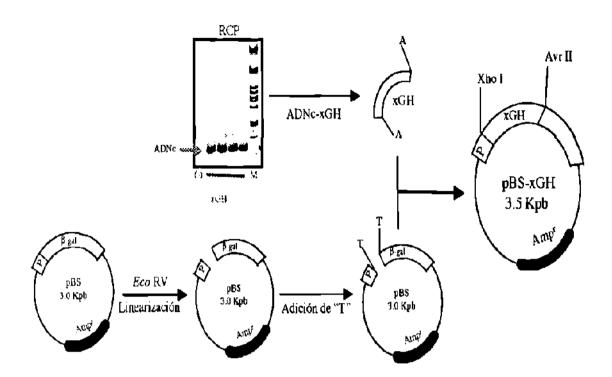


Figura 11. Esquema de la construcción de los pBS-xGH. Se ilustra la secuencia que se siguió para la construcción de pBS-xGH, donde x corresponde a los ADNcs de las GHs o HPL.

5.2.3.1 Minipreparación de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina.

Esta técnica está basada en el método de Morelle en 1989. Las bacterias portadoras del plásmido de interés fueron incubadas en tubos de vidrio que contenían 4 mL de medio LB con ampicilina durante toda la noche a 37°C con agitación a 250 r.p.m. Después de este tiempo se cosecharon y empastillaron las células por centrifugación en tubos de 1.5 mL durante 1 min. a 12,000 r.p.m. Cada pastilla se resuspendió en 200 µL de solución I

de lisis (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM y Lisozima a 4 mg/mL), posteriormente se incubaron por 5 min. a temperatura ambiente.

En seguida, se le agregaron 400 µL de solución II alcalina (NaOH 0.2 N y SDS al 1%) y se mezcló e incubó 10 min. en hielo. Posteriormente se le agregaron 300 µL de solución III (Acetato de amonio 7.5 M), se mezcló e incubó por 10 min. en hielo. Luego, se centrifugó 8 min. a 13,000 r.p.m., se recuperó y transfirió el sobrenadante a otro microtubo, al cual se le agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló e incubó 20 min. Luego, se centrifugó a 13,500 r.p.m. por 8 min., se desechó el sobrenadante, se lavó la pastilla de ADN sin despegarla con 500 µL de etanol al 70% y se secó en el evaporador centrífugo al vacio.

La pastilla se disolvió en 50 μL de agua destilada, más 1 μL de ARNasa (1mg/mL), se incubó 15 min. a 37°C. La pastilla de ADN se disolvió en 100 μL de agua destilada. Se le hizo extracción fenol-Sevag, posteriormente se le agregó un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y se añadió 2.5 volúmenes de etanol al 100 %, se incubó mínimo por 20 min. a -20 °C. Se centrifugó a 13,500 r.p.m. durante 8 min. y la pastilla de ADN se lavó con 500 μL de etanol al 70%. Por último se secó en el evaporador centrífugo al vacío y se resuspendió en 30 μL de agua ultrapura. El ADN plasmídico se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

5.2.3.2 Generación del Vector "T" en el plásmido pBS II (+).

Se digirieron por toda la noche 5 μg del plásmido pBS II KS(+) con la enzima de restricción *Eco* RV, en un volumen final de 100 μ l, y se aseguró que estuviera totalmente digerido.

Se tomaron 20 μL equivalentes a 1 μg de plásmido linearizado y se procedió como se describe en la Tabla VI para la adición de timinas al vector linearizado.

TABLA VI

CONDICIONES DE REACCION PARA LA ADICION DE "TIMINAS" AL

VECTOR PBS LINEARIZADO CON Eco RV

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACION FINAL
Agua ultrapura	51.0 μL	Volumen final=100 μL
ADN pBS II KS(+) 1 µg/µL	20.0 μL	20 ng/μL
Amortiguador RCP 10x	10.0 μL	1 X
Mg Cl ₂ 25 mM	8.0 µL	2 mM
dTTPs 10 mM	10.0 μL	1 mM
ADN Polimerasa Taq (5U/μL)	1.0 µL	0.05 U/μL

La mezcia de reacción se incubó a 72 °C durante 30 min. y los productos de la reacción, adicionados con timina, se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

5.2.3.3 Ligación de cada ADNc de GH al vector pBS.

Para favorecer la generación de vectores recombinantes se empleó una relación molar 1:5 de vector-inserto; las condiciones de la reacción de ligación se muestran en la Tabla VII.

TABLA VII

CONDICIONES DE REACCION PARA LA LIGACION DEL ADNC DE CADA

HORMONA AL VECTOR DE CLONACION pBS

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACION FINAL
Agua ultrapura	5.5 μL	Volumen final=25 μL
Amortiguador de ligación 5X	5.0 μL	1 X
Vector T 10 ng/µL	10.0 µL	4.0 ng/µL
ADNc 40 ng/µL	2.5 μL	4.0 ng/µL
Ligasa 2 U/μL	2.0 µL	0.16 U/μL

La reacción de ligación fue incubada a 16 °C toda la noche y posteriormente el ADN se precipitó con etanol absoluto y sales, se resuspendió en TE y se almacenó a -20 °C.

5.2.3.4 Transformación con células calcio-competentes Escherichia coli XL1 Blue.

Se sembró *Escherichia coli* (XL1-Blue) por estría en una caja con medio LB se incubó a 37°C por 12-14 hrs, se levantó una colonia e inoculó en tubo de ensayo con 4 mL de medio LB a 37°C por 12 hrs con agitación vigorosa. Se inoculó un matraz que contenía 50 mL de LB con una dilución 1:100 del cultivo celular del tubo y se creció hasta una densidad óptica (600 nm) de 0.30-0.35 unidades aproximadamente de 2 a 2.5 hrs. Se colocó el matraz en hielo por 10 min. Se pasaron las bacterias a un tubo Falcon de 50 mL. Se empastillaron las bacterias y decantó el sobrenadante (todo en hielo y en condiciones de esterilidad). Se resuspendió la pastilla en 20 mL de cloruro de calcio 100 mM frío e incubó 20 min. en hielo, se volvió a empastillar y se repitió este último paso. Se empastillaron las células y se ajustaron a un volumen final de 2 mL de CaCl₂ 0.1 M por 20 min. y se transformaron, usando 200 µL de células o bien las guardamos a 4°C por no mas de 2 días.

La transformación se realizó mezclando 1/3 del volumen de ligación con 200 μL de células calcio competentes, se plaqueó en medio LB sólido conteniendo ampicilina (50 μg/mL) y X-gal (800 μg/mL) e IPTG (800 μg/mL) y se incubó a 37°C durante 12-16 horas. Adicionalmente se llevó a cabo una transformación en paralelo con 1 ng de pBS II KS (+) como testigo de transformación y para verificar la eficiencia del proceso.

5.2.3.5 Selección de colonias portadoras de plásmidos recombinantes.

El vector pBS II KS (+) tiene la primera parte del gen (amino terminal) de la enzima β -galactosidasa (lac Z) y se complementa con la parte terminal del gen Lac Z (carboxí-terminal) presente en las cepas de *Escherichia coli*. Por lo que dicha cepa es capaz de llevar a cabo la α -complementación cuando es transformada con dicho plásmido.

El plásmido pBS tiene su sitio de policionación múltiple acomodado de tal forma que se mantiene el marco de lectura abierta para generar la enzima β -galactosidasa. De manera que las dos regiones en forma separada no funcionan para producirla, siendo exclusivamente funcionales cuando se complementan, es decir se lleva a cabo la α complementación entre el pBS con su secuencia intacta y la bacteria.

Estas bacterias Lac⁺ se caracterizan por la formación de un compuesto cromógeno que se origina por la acción de la β-galactosidasa producida por causa del inductor IPTG, cuando actúa sobre el sustrato X-gal. De manera que esta actividad le conflere a las colonias un color azul peculiar que las hace fácilmente distinguibles. Esto siempre y cuando el pBS no haya sufrido una mutación en dicho gen o que por causa de la inserción en el sitio de policionación de algún fragmento de interés (como lo es el caso de los ADNcs de cada hormona) se haya perdido el marco de lectura abierto para la β-galactosidasa, de manera que la generación de colonias no azules, es

decir blancas, indica que se tienen clonas candidatas que han incorporado el ADNo de interés.

Para determinar cuales de las colonias blancas obtenidas por tamizaje en el medio de selección (Agar LB/Amp) eran portadoras de plásmidos recombinantes, cada una de ellas se transfirió a medio LB/Amp (4 mL) y se incubaron por 16 horas a 37 °C. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción del ADN plasmídico por miniprep y se efectuó una electroforesis en agarosa al 0.8%. Por comparación con la migración del plásmido pBS II KS (+) se determinó cuales de las clonas candidatas contenían plásmidos recombinantes (portadores de cada ADNc) que al tener mayor número de pares de bases por contener el fragmento adicional del ADNc, migraban más lentos en el gel que la versión original de pBS.

5.2.3.6 Caracterización por la RCP de los plásmidos pBS-xGH recombinantes.

Se utilizaron los iniciadores "Forward" y "Reverse" de pPUC18 para realizar la RCP sobre las clonas que resultaron de la transformación con la ligación del vector pBS y cada amplicón proveniente de la RCP correspondiente al ADNc de la hormona respectiva, esperándose un producto de 800 pb para las clonas candidatas de pBS-xGH y de 200 pb para las clonas que no integraron el ADNc correspondiente. Esto como primer tamizaje de las construcciones deseadas.

5.2.3.7 Verificación de la clonación de los ADNcs de cada hormona por enzimas de restricción.

Para verificar la presencia del inserto en los plásmidos recombinantes, 450 ng de cada uno de ellos se sometieron a una doble digestión con las enzimas *Xho* I y *Avr* II, en un volumen de reacción de 15 μL.

Cepas portadoras de ambos vectores fueron incubadas en 4 mL. de medio LB a 37°C a 250 r.p.m. por 18 hrs. Posteriormente se realizaron extracciones de ADN plasmídico por miniprep (Morelle, 1989).

5.3 Construcción de los vectores de expresión pPIC9-xGH para cada hormona.

Se realizaron digestiones preparativas con las enzimas *Xho* I y *Avr* II, de pBS-xGH y pPIC9. Luego, tanto el fragmento como el vector fueron purificados (QIAEX II "Gel extraction Kit") de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por la compañía QIAGEN. Una vez purificados, se ligaron de acuerdo con las condiciones descritas en la Tabla VIII, en una relación molar inserto:vector de 7:1.

TABLA VIII

CONDICIONES PARA LA REACCION DE LIGACION DEL ADNC DE
CADA HORMONA CON pPIC9

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Agua ultrapura	5.5 µL	Volumen final=30 μL
Amortiguador de ligación 5X	6 µL	1 X
Vector pPIC9 (Xho I/Avr II) 20 ng/µL	10 μL	6.6 ng/µL
ADNc (Xho I/Avr II) 10 ng/µL	10 µL	3.3 ng/µL
Ligasa 2 U/µL	2 μL —	0.13 U/μL

La ligación se llevó a cabo a 16 °C durante toda la noche. Una vez verificada ésta por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, 1 y 3 µl de la reacción de ligación entre pPIC9 y cada ADNc fueron utilizados para transformar células Ca⁺⁺ competentes de *Escherichia coli* XL1-Blue.

5.3.1 Hormona del crecimiento canino (CFGH).

Se diseñaron oligonucleótidos específicos basados en secuencias nucleotídicas consenso de GHs de mamíferos relacionados, a los cuales se les incluyeron sitios extras de restricción (*Xho* I y *Avr* II) en sus flancos para facilitar la inserción del amplicón al vector de expresión. Con éstos se amplificó el ADNc de CFGH, a partir de un plásmido construido previamente en nuestro laboratorio que porta la secuencia nucleotídica respectiva (pMALc-cfGH) (*Ascacio-Martínez y Barrera-Saldaña*, 1994a).

El amplicón fue clonado en el plásmido pBS II KS(+) y posteriormente subclonado en el vector de expresión para levaduras pPIC9, en los sitios de restricción *Xho* I y *Avr* II, previa purificación del fragmento (ADNc de CFGH) a partir de pBS-cfGH y del vector pPIC9, originándose así el plásmido de expresión pPIC9-cfGH. La figura 12 ilustra la estrategia de construcción de este nuevo vector de expresión.

Dada la inusual circunstancia de que la proteína madura para la que codifica este plásmido es idéntica a la GH del cerdo, en este caso el "casete" de expresión se convierte en fuente de producción de ambas hormonas.

5.3.2 Hormona del crecimiento equino (ECGH).

Para la construcción del vector de expresión pPIC9-ecGH, se siguió la misma estrategia y metodología descrita arriba para la construcción del vector de expresión de la GH canina (pPIC9-cfGH). En este caso se empleó como fuente del ADNc de la GH del caballo, a un plásmido construido previamente en nuestro laboratorio (pMALc-ecGH) (Ascacio-Martínez y Barrera-Saldaña, 1994b) portador de dicho ADNc, en la figura 12 se describe la estrategia de construcción de ambos vectores de expresión).

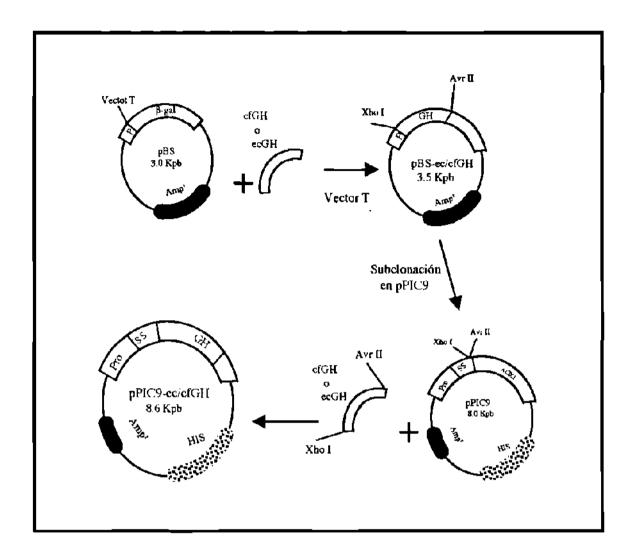


Figura 12. Construcciones de los vectores de expresión pPIC9-cfGH y pPIC9-ecGH. Una vez recuperados los ADNcs correspondientes, se clonaron en pBS donde fueron secuenciados y luego se transfirieron a pPIC9. Pro= Promotor de la alcohol oxidasa 1. SS= Secuencia señal del factor α de apareamiento de Saccharomyces cerevisiae. aox1= parte del gen de la alcohol oxidasa. HIS= Gen de la histidinol deshidrogenasa. y Ampr= gen de resistencia a ampicilina.

5.3.3 Hormona del crecimiento felino (FCGH).

Al igual que en la estrategia anterior, se diseñaron oligonucleótidos consenso de GHs relacionadas de estos animales, y se les incluyeron los sitios de restricción extras *Xho* I y *Avr* II para facilitar su clonación.

Se amplificó por RCP el ADNc correspondiente a la FCGH madura, partiendo una vez más de un plásmido construido previamente en nuestro laboratorio que porta dicha secuencia el pMALc-fcGH (Castro-Peralta y Barrera-Saldaña, 1995).

A diferencia de las dos clonaciones que se describieron anteriormente, para este caso, la clonación se hizo directa (sin pasar por el plásmido pBS): el amplicón correspondiente (ADNc de FCGH) fue previamente digerido con las enzimas de restricción Xho I y Avr II, posteriormente se ligó con el vector de expresión pPIC9, el cual fue abierto en los mismos sitios de restricción, originándose de este modo el plásmido de expresión pPIC9-fcGH. La figura 13 ilustra la estrategia correspondiente para llevar a cabo la construcción de este vector.

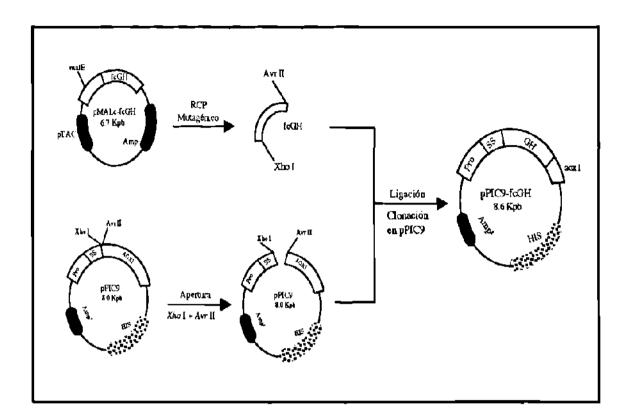


Figura 13. Construcción del vector de expresión pPIC9-fcGH. Se amplificó por la RCP el ADNc de la GH del gato, al cual se le incluyeron sitios de restricción Xho I γ Avr II para facilitar la clonación, misma que se consiguió al digerir el producto amplificado con las enzimas mencionadas y poniéndolo a ligar con el vector pPIC9 digerido en los mismos sitios. Pro= Promotor de la alcohol oxidasa 1. SS= Secuencia señal del factor α de apareamiento de Saccharomyces cerevisiae. aox1= parte del gen de la alcohol oxidasa. HIS= Gen de la histidinol deshidrogenasa. y Ampr= gen de resistencia a ampicifina.

5.3.4 Lactógeno placentario humano (HPL).

A partir de un plásmido previamente construido, el pHPL815, que contiene la secuencia del ADNc que codifica para el hPL3 se amplificó por la RCP utilizando oligonucleótidos que incluían los sitios de restricción *Xho* I y *Avr* II. El amplicón del ADNc de hPL3 se clonó por medio de la técnica de vector "1" en pBS, originando a pBS-hPL3.

Posteriormente se digirió tanto al intermediario pBS-hPL3, como el vector pPIC9, con las enzimas de restricción *Xho* I y *Avr* II, y se sometió al fragmento liberado del primero con la versión abierta del segundo a una reacción de ligación, resultando en la construcción de la clona pPIC9-hPL3 (figura 14).

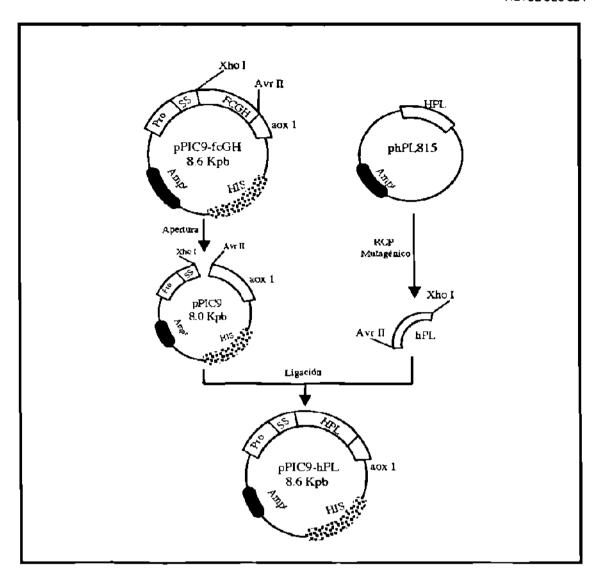


Figura 14. Construcción del vector de expresión pPIC9-hPL. Se amplificó por la RCP el ADNc del hPL3 a partir del plásmido pHPL815, se pasó a pBS por la técnica de vector "T". Luego el ADNc se recuperó por medio de los sitios Xho I y Avr II y se puso a ligar con el vector pPIC9 digerido con las mismas enzimas. Pro= Promotor de la alcohol oxidasa 1. SS= Secuencia señal del factor α de apareamiento de Saccharomyces cerevisiae. aox1= parte del gen de la alcohol oxidasa. HIS= Gen de la histidinol deshidrogenasa y Ampr= gen de resistencia a ampicilina.

a) Selección de colonias portadoras de plásmidos recombinantes.

Para determinar cuales de las colonias obtenidas por tamizaje en el medio de selección (agar LB/Amp) eran portadoras de plásmidos recombinantes, cada una de ellas se transfirió a medio líquido LB/Amp (4 mL) y se incubó a 37 °C/250 r.p.m. durante 16 horas. Posteriormente se llevó a cabo la extracción de los ADNcs plasmídicos por miniprep. A continuación se realizó una electroforesis en agarosa al 0.7% y por comparación con la migración del plásmido pPIC9, se determinó cuales de las clonas candidatas contenían plásmidos recombinantes, que al tener un peso molecular más alto, por contener un fragmento adicional de ADN, migraban de manera retrasada a través del gel.

b) Caracterización por la RCP de los plásmidos recombinantes pPIC9-xGH.

Se utilizaron los iniciadores de aox1 para realizar la RCP sobre las clonas que resultaron de la transformación con la ligación del vector pPIC9 y cada inserto correspondiente al ADNc de la hormona respectiva, esperándose un amplicón de 1050 pb para las clonas candidatas y de 500 pb para las clonas que no integraron el ADNc correspondiente. Esto como paso previo a la caracterización más exhaustiva por corte enzimático. Donde los plásmidos recombinantes seleccionados de acuerdo al criterio anterior, se caracterizaron con las enzimas *Xho* I y *Avr* II para verificar que el inserto que contenían correspondía al tamaño de cada ADNc.

5.4 Construcción de las nuevas cepas de *Pichia pastoris* portadoras del "casete" de expresión para cada hormona.

La cepa GS115 tiene una mutación en el gen de la histidinol deshidrogenasa (his4) que le impide sintetizar histidina. La clase de plásmidos que se usan para transformarla que contienen este gen (his4) complementan esta mutación, de modo que las transformantes se seleccionan por su habilidad, así restaurada, de crecer en un medio carente de histidina. Los vectores plasmídicos de la serie pPIC y los aquí construidos para expresar las GHs, son de esta clase.

5.4.1 Integración de cada vector pPIC9-xGH al genoma de Pichia pastoris.

Cada uno de los vectores pPIC-xGH fue linearizado con la enzima Sac I para que dejaran expuestas las regiones homólogas necesarias para la recombinación. La digestión se llevó a cabo con 2 μg del vector, en un volumen de reacción de 50 μL .

Las levaduras se hicieron Litio competentes para poder introducir el "casete" linearizado del ADN de cada hormona, por medio de la técnica de Cloruro de Litio, técnica modificada a la de Acetato de Litio (Gietz y Schiestl, 1991; Gietz y cols., 1995; Mount y cols., 1996; Gietz y Woods, 2001; Gietz y Woods, 2002). Las levaduras se trataron con LiCl 100 mM. El ADN se incubó con las células competentes y se plaqueó en medio carente de histidina para recuperar transformantes HIS⁺. Esta técnica se empleó para

las construcciones de las cepas portadoras de los ADNcs de ECGH, CFGH-PGH, FCGH, HPL y del "casete" vacío de pPIC9.

La cepa GS115 se sembró en 50 mL de YPD (peptona 2%, extracto de levadura 1% y dextrosa 2%) con agitación vigorosa a 250 r.p.m. y 30°C, hasta que se alcanzó una D O_{600} de 0.8 a 1.0. Luego se cosecharon por centrifugación a 4,500 r.p.m. por 10 min., se lavaron con 25 mL de agua destilada estéril. Se volvió a centrifugar, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en un mL de una solución de LiCl 100 mM, después se pasaron a un microtubo de 2 mL. Se volvieron a empastillar y se resuspendieron en 400 μ L de LiCl 100 mM. Por último se distribuyeron en alícuotas de 50 μ L.

Para realizar la transfección se utilizaron las alícuotas de 50 μ L de células Li⁺² competentes anteriormente preparadas, las células se empastillaron por centrifugación a 13,000 r.p.m. por 15 seg, se descartó el sobrenadante y se añadieron los siguientes reactivos en secuencia: 240 μ L de PEG al 40%, 36 μ L de LiCl 1M, 25 μ L de ADN acarreador (esperma de salmón) de cadena sencilla a 2 mg/mL (previamente se hirvió en baño de maría por 5 min. para desnaturalizarlo.

Inmediatamente se colocó en hielo) más 2 μg del ADN plasmídico linearizado de pPIC9-xGH en un volumen de 50 μL. Se mezcló muy bien y se incubó por 30 min. cada muestra a 30 °C sin agitar. Se le dio un choque

térmico a 42 °C por 25 min. Se empastillaron las células con un pulso de 10 segundos en la centrífuga, se desechó el sobrenadante, se resuspendió cada pastilla en 1 mL de agua estéril y se sembró con 100 μL de esta solución en placas de medio de regeneración con dextrosa sin histidina (RDB) [sorbitol 1M, dextrosa 2%, YNB 1.34 %, biotina 4 X 10⁻⁵ %, aminoácidos 0.005%] y las placas se incubaron a 30°C durante 3 a 5 días hasta la aparición de colonias de levaduras transfectadas.

5.4.2 Verificación de la integración del "casete" de expresión por la RCP.

La versión linearizada del "casete" de expresión (pPIC9-xGH) para cada caso entra a la levadura, se integra al ADN del genoma mediante recombinación de las regiones homólogas aox1 o his4, presentes en los ADNs del genoma de la levadura y del plásmido portador del "casete" de expresión. Aunque sólo son capaces de crecer en medio sin histidina las clonas que han integrado el "casete" de expresión, de un 10 a 20% de las transformantes resulta en una conversión entre el gen his4 del vector y el gen mutante his4 de la levadura, y estas clonas aunque crecen en medios sin histidina, no llevan el gen de interés. Por ello, fue necesario no solo basarse en el fenotipo, sino verificar la presencia del "casete" de expresión integrado en el genoma de las cepas mediante la RCP. Esta se realizó utilizando colonias directamente de la placa de Petri (Ascacio-Martínez y Barrera-Saldaña, 2004), o también, extrayendo previamente el ADN genómico de la levadura como se describe más adelante.

5.4.2.1 Extracción de ADN genómico de las levaduras transfectadas.

Las colonias que crecieron en el medio selectivo fueron transferidas a placas de agar YPD e incubadas a 30 °C por 24-48 hrs. Posteriormente se realizó la extracción de ADN genómico por la técnica TSNT (Leal-Klevezas y cols., 1995; Leal-Klevezas y cols., 2000) de cada una de ellas para efectuar un análisis por RCP para determinar la presencia del "casete" de expresión en el genoma de la levadura y así comprobar la inserción del "casete" de expresión para cada ADNc.

Para la obtención del ADN genómico de las levaduras se realizó lo siguiente: cada colonia que creció en el medio selectivo fue transferida a placas de agar YPD y posteriormente inoculada en caldo YPD (2 mL), incubando a 30 °C a 250 r.p.m. por 24 horas. Posteriormente las células fueron cosechadas centrifugando a 14,000 r.p.m. por 10 segundos y la pastilla fue lavada con 500 μL de agua ultrapura estéril. Las levaduras se resuspendieron en 300 μL de amortiguador de lisis TSNT por agitación en vortex.

A continuación, se agregaron 650 μL de fenol y los tubos se mantuvieron en agitación suave durante 5 min. Posteriormente se realizó una extracción con 150 μL de Sevag (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1) y se incubó durante 5 min. a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 300 μL de amortiguador TE pH 8.0, se mezcló por inversión

durante 10 segundos y se centrifugó a 14,000 r.p.m./5 min. Luego se separó la fase acuosa y se agregaron 1.5 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el ADN genómico. Se centrifugó a 14,000 r.p.m./5 min., se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70%, después se secó al vacío durante 5 min., se resuspendió en 500 μ L de amortiguador TE pH 8.0 y almacenó a -20°C.

La integridad del ADN genómico fue verificada por electroforesis en gel de agarosa (0.8%) y la cantidad y pureza por espectrofotometría, leyendo la absorbancia a 260 y 280 nm (el valor del primero suele ser de casi el doble del segundo).

5.4.2.2 Detección del "casete" de expresión por RCP.

Se seleccionaron las transformantes His+ y se les extrajo el ADN con el que se realizó la RCP utilizando iniciadores que se alinean en la región 5' y terminador (TT) del gen aox1.

La RCP genera dos bandas de amplificación que corresponden al gen endógeno aox1 y al "casete" de expresión de la hormona en cuestión, integrado en el genoma de la levadura por recombinación homóloga (de 2105 y 1050 pb, respectivamente). Los detalles de la reacción de RCP y el programa utilizado para la amplificación se muestran en las tablas IX y X respectivamente.

TABLA IX

CONDICIONES DE LA RCP PARA EVIDENCIAR LA INSERCION DEL "CASETE" DE EXPRESION DE CADA HORMONA EN EL GENOMA DE Pichia pastoris

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACION FINAL
Agua ultrapura	14.0 µL	25 μL
Amortiguador 10 X	2.5 μΙ	1 X
Mg Cl₂ 25 mM	1.5 µL	1.5 mM
dNTPs 10 mM	0.75 μL	300 μΜ
Oligo 5΄ 5 μM	2.5 μL	0.5 μΜ
Oligo 3΄ 5 μM	2.5 μL	0.5 μΜ
ADN 200 ng/µL	1.0 µL	8.0 ng/µL
ADN Polimerasa Taq (5U/µL)	0.3 μL	0.06 U/µL

Se mezclaron bien los tubos y se adicionó una gota de aceite mineral estéril para evitar la evaporación y los tubos se colocaron en el termociclador.

TABLA X

PROGRAMA DE AMPLIFICACION PARA LOS INICIADORES aox1

CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
1	94	5 min.
2	94	59 seg
3	56	1 min.
4	72	2 min.
5 (Del 2 al 4)	28 ciclos	
6	72	7 min.
7	FIN	

Las reacciones de RCP se llevaron a cabo en un termociclador modelo PTC-100 (M. J. Research Inc.). Una vez terminada la reacción se congelaron las muestras, se retiró el aceite mineral y se tomaron 3 μ L para resolver los amplicones por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % .

5.5 Construcción del testigo negativo de expresión con el "casete" pPIC9.

Para tener una cepa de *Pichia pastoris* de referencia de las proteínas nativas que se secretan al medio de cultivo, fue necesario construir la cepa "mock" generada de la misma manera que sus versiones productoras de hormonas recombinantes, excepto que el "casete" que se introdujo en su genoma estaba vacío, de tal forma que se ensayara bajo las mismas

METODOLOGIA

condiciones de inducción con metanol pero sin producir la proteína recombinante sino únicamente las proteínas propias contaminantes.

Esta cepa, además de servirnos como testigo negativo de producción de proteínas recombinantes en los geles de poliacrilamida, se podrá utilizar como control negativo para los bioensayos y como testigo de proteínas de fondo en el desarrollo del esquema de semipurificación de las proteínas recombinantes.

5.6 Análisis del fenotipo Mut* o Mut* de las construcciones.

Se crecieron las cepas de *Pichia pastoris* y se ajustó la biomasa a baja densidad celular (0.5 u a 600 nm), se pasaron a medio de cultivo inductor con metanol al 0.5 % final y se dejaron crecer por 100 horas adicionando metanol cada 24 horas, y se analizó el crecimiento de la biomasa bajo el metanol como única fuente de carbono. Las cepas con fenotipo Mut⁺ metabolizan más rápido el metanol, logrando densidades celulares considerablemente más altas que sus contrapartes Mut⁴, quienes metabolizan más lentamente, apreciándose apenas un incremento en la biomasa bajo las mismas condiciones de fermentación.

5.7 Producción y análisis de las hormonas recombinantes a nivel matraz.

Para ensayar la fermentación de las cepas, primeramente se generó biomasa en matraz, inoculándose una colonia de cada cepa en 25 mL del medio de cultivo BMGY (amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, YNB 1.34%, biotina 4 X 10⁻⁵ M, glicerol 1%, extracto de levadura 1%, peptona 2%), se incubó a 30°C a 250 r.p.m. por 24 a 48 horas para la primera etapa de crecimiento, hasta lograr una biomasa a una DO a 600 nm de 10.

Para la segunda etapa, que es la de inducción de la producción de la hormona recombinante, se cosecharon las levaduras por centrifugación y el paquete celular se lavó con 30 mL de agua estéril, luego se volvió a empastillar y se resuspendió en un nuevo medio con metanol BMMY (amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, YNB 1.34%, biotina 4 X 10⁻⁵ M, metanol 1%, extracto de levadura 1%, peptona 2%). La inducción se mantuvo añadiendo cada 24 hrs metanol a la concentración final de 1% para compensar su pérdida por evaporación. El experimento duró 96 hrs, en la figura 15 se muestra el proceso que se siguió.

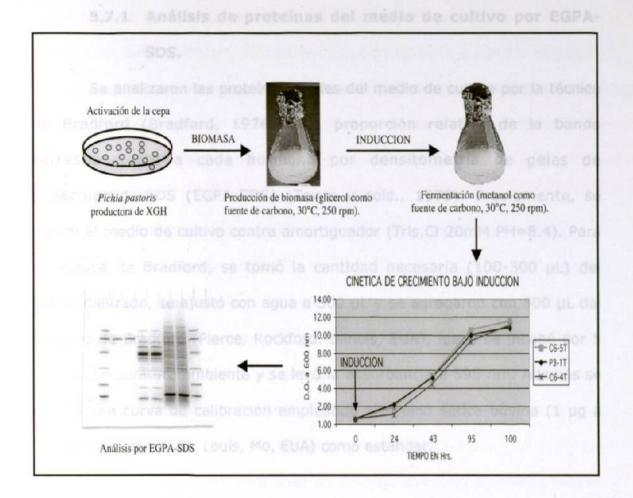


Figura 15. Esquema del proceso de fermentación. Se describe el procedimiento general para la producción de la hormona recombinante por fermentación de cada cepa. Se plaquean las cepas para activarlas, se genera biomasa en matraz, se cambia a medio inductor con metanol, se analiza el medio de cultivo por EGPA-SDS en búsqueda de las hormonas que deben de migrar alrededor de los 22 kDa.

5.7.1 Análisis de proteínas del medio de cultivo por EGPA-SDS.

Se analizaron las proteínas totales del medio de cultivo por la técnica de Bradford (Bradford, 1976) y la proporción relativa de la banda correspondiente a cada hormona por densitometría de geles de poliacrilamida-SDS (EGPA-SDS) (Towin y cols., 1979). Previamente, se dializó el medio de cultivo contra amortiguador (Tris.Cl 20mM PH=8.4). Para la técnica de Bradford, se tomó la cantidad necesaria (100-300 μL) del medio dializado, se ajustó con agua a 500 μL y se agregaron con 500 μL del reactivo de Bradford (Pierce, Rockford, Illinois, EUA), luego se incubó por 5 min. a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 595 nm. Además se realizó una curva de calibración empleando albúmina sérica bovina (1 μg a 25 μg/mL) (Sigma, St. Louis, Mo, EUA) como estándar.

Se precipitaron las proteínas a partir de alícuotas del medio de cultivo dializado, al agregar 4 volúmenes de acetona y se dejaron incubar por toda la noche a -20°C. Se centrifugaron a 7,000 g por 20 min., se decantaron y secaron las pastillas, las cuales se resuspendieron en 20 μ L de amortiguador de muestra (Tris pH 6.8, SDS 5%, glicerol 5%, azul de bromofenol 0.25% y β -mercaptoetanol 0.25%). Se sometieron a 95 °C por 5 min., y se aplicaron en un gel de poliacrilamida al 15% con SDS.

Las electroforesis se realizaron en las cámaras Mini Protean II y III de BIO-RAD, a 50 V hasta que entró la muestra, después de lo cual se subió

a 100 V hasta que se salió el frente del colorante. El gel se tiñó con azul de Coomassie, sumergiéndolo 30 min. en solución fijadora y dos horas por lo menos en solución de azul de Coomassie. Y posteriormente se destiñeron con solución decolorante. Al final los geles se analizaron en el sistema de fotodocumentación Gel Doc de BIO-RAD (Hercules, CA, EUA).

5.7.2 Diálisis y cuantificación de las proteínas totales del medio de cultivo.

Al finalizar el periodo de inducción de 96 horas con metanol, los cultivos se centrifugaron a 6,000 r.p.m. por 25 min. para separar la biomasa. El medio de cultivo se dializó a 4 °C contra amortiguador (Tris.Cl 20mM, pH=8 y EDTA 0.2 mM) con 4 cambios cada 4 horas.

Una vez concluida la diálisis, se determinaron las proteínas totales por el método de Bradford como se mencionó anteriormente.

5.8 Otras cepas de *Pichia pastoris* productoras de GHs que se ensayaron.

Cepas de *Pichia pastoris* productoras de la HGH normal de 22 kDa (Escamilla-Treviño, 2000; Sánchez-Domínguez, 1998), de la HGH isoforma de 20 kDa (Cab-Barrera, 2000), de la HGH-V (Palma-Nicolás, 2001), de la BGH (Gallardo-Blanco, 1999) y de la CHGH (Reyes-Ruiz, 2001), también fueron ensayadas de manera similar a como se hizo con las ya mencionadas.

5.9 Escalamiento de la producción en biorreactor.

Al pasar a biorreactor y aumentar la escala es posible obtener concentraciones de proteínas de 20 a 200 veces mayores que cuando se producen en matraces. En el fermentador *Pichia pastoris* alcanza altas densidades celulares de mas de 100 g/L de peso seco (Siegel y Brierley, 1989).

El modelo del fermentador fue un Bioflo 3000 de 1 litro de la compañía New Brunswick Scientific. El tipo de fermentación que se realizó fue en lote alimentado (fed-batch). Los parámetros que se controlaron fueron: adición programada de sustratos al fermentador, el pH, el porcentaje de oxígeno disuelto, la agitación, la temperatura y la aeración. El proceso comprendió tres pasos básicos: 1) Obtención de altas densidades de biomasa, 2) inducción de la expresión del "casete" de la cada hormona con metanol y 3) cosechado de la biomasa y medio de cultivo conteniendo la proteína recombinante.

Se puso a crecer la levadura *Pichia pastoris* que contiene el "casete" respectivo de expresión de cada hormona en 50 mL de medio YPD en un matraz de 250 mL por un tiempo de 24 hrs a la temperatura de 30° Celsius con agitación de 250 r.p.m. Esta se utilizó como semilla o inóculo para el fermentador. La fuente de carbono fue glicerol, dejando crecer en el biorreactor hasta obtener altas concentraciones de biomasa (superiores a 150 g/L en peso húmedo). A partir de este punto se pasó a inducir con

metanol para activar el promotor de aox1, lo que condujo a la expresión proteínica (Invitrogen, 2000). Después de 72-96 hrs de inducción, se cosechó el fermento separando por centrifugación el caldo donde se encuentra la proteína de interés, el cual se utilizará para procesos posteriores, la figura 16 muestra la etapas que se siguieron para la producción de cada hormona recombinante.



Figura 16. Producción de hormonas recombinantes en biorreactor. Se ilustran las etapas del proceso biotecnológico de producción, desde la preparación del fermentador y del medio, hasta el análisis de las proteínas en el medio de cultivo fermentado.

El proceso de producción en biorreactor consistió de las siguientes etapas:

5.9.1 Etapa de preparativos:

Se prepararon bombas peristálticas, mangueras, frascos de adición de medios de cultivo, de base y antiespumante para cada fermentación; medios de cultivo para el fermentador y soluciones para las botellas; materiales y reactivos para los ensayos analíticos y microbiológicos, así como cristalería a utilizar para el proceso de fermentación. La solución para mantener el pH fue hidróxido de amonio al 30%.

5.9.2 Etapa de Preinóculo:

Se descongelaron los viales de glicerol que contienen la levadura Pichia pastoris, se inocularon con éstos a matraces con deflectores con 50 mL de medio de cultivo YPD o YPG y se incubaron a 29 °C con agitación de 250 r.p.m. durante 18-24 hrs.

5.9.3 Etapa de inoculación:

Se acondicionó el fermentador, calibrando sus electrodos, sanitizándolo e instalando sus aditamentos. Se acondicionó el inóculo, se ajustó al 1-5% del volumen a trabajar en el fermentador y se inoculó en condiciones de esterilidad, el cual se supervisó las 24 horas del día y se procesaron 4 análisis de muestras cada 24 hrs.

5.9.4 Etapa de lote alimentado con glicerol:

Aproximadamente después de 20 hrs el oxígeno disuelto sube y se inicia la alimentación de glicerol por un tiempo de 22 hrs aproximadamente y siguiendo con el análisis rutinario de muestras. Se llevó a cabo una adición programada de glicerol al reactor de manera que el cultivo se mantuviera en constante crecimiento, controlando que no hubiera limitación de oxígeno y de otros nutrientes, para la obtención de altas densidades de biomasa final. Se supervisó al biorreactor las 24 horas y se analizaron las muestras tomadas aproximadamente cada 6 horas.

5.9.5 Etapa de inducción de lote alimentado con metanol:

Después de este tiempo se induce con metanol al 100% para expresar la proteína recombinante 76 a 96 hrs. Todo el proceso se cuida que el oxígeno disuelto no caiga por debajo del 20%. Se analizaron las muestras tomadas cada 3 horas.

5.9.6 Etapa de cosecha:

Se cosecha el caldo de cultivo y se hacen los análisis de muestras.

Por centrifugación se separa la biomasa del caldo en donde se encuentra la hormona recombinante. Este se procesa sometiéndolo a ultradiálisis y ultraconcentración, por último se liofiliza el ultraconcentrado.

METODOLOGIA

5.10 Métodos y parámetros evaluados:

Los análisis que se realizaron a cada muestra son los siguientes:

- a) Tinción de Gram para descartar presencia de microorganismos contaminantes.
- b) Peso húmedo a partir de un mL de medio empastillado.
- c) Densidad óptica a 600 nm.
- d) Diálisis.
- e) Cuantificación de proteínas totales por la técnica de Bradford.
- f) Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (EGPA-SDS).
- g) Densitometría.
- h) Determinación del porcentaje de la hormona recombinante en relación a las proteínas totales.

Se dedicó especial atención al control de los siguientes parámetros:

Control del fermentador.

- a) Potencial de iones hidrógeno (pH) que va de 4 a 5.
- b) El porcentaje de oxígeno disuelto debe oscilar por arriba del 20%.
- c) La agitación fue de 200 a 800 r.p.m. dependiendo del oxígeno.
- d)La temperatura de incubación se mantuvo a 29 °C.

Control de oxígeno disuelto en el biorreactor.

- a) Primera etapa: aire-agitación.
- **b)** Segunda etapa: aire-oxigeno.
- c) Tercera etapa: oxígeno-agitación.

Control microbiológico.

- Esterilidad de medios.
- b) Esterilidad de adiciones.
- c) Esterilidad de muestras.

5.11 Semipurificación de las hormonas recombinantes.

En la figura 17 se muestra el proceso de purificación o "down stream" que se siguió para cada hormona recombinante producida.

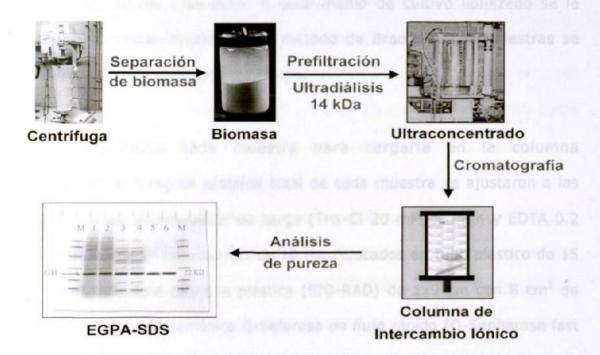


Figura 17. Proceso de "Down Stream" para las hormonas recombinantes. Se separó el medio de cultivo de la biomasa por centrifugación, se prefiltró en membrana de 0.45 μm, se ultradializó con membrana con corte de 10 kDa, se pasó por la columna de intercambio aniónico (QS-FF), se analizó la pureza en EGPA-SDS, se cuantificó y por último se liofilizó y almacenó para su uso posterior.

Cada medio de cultivo que contiene la hormona recombinante fue ultradializado en una unidad de ultraconcentración utilizando el amortiguador Tris-Cl 20 mM pH=8.4 y EDTA 0.2 mM, en baño de hielo con agitación, agregando de 3 a 4 volúmenes de amortiguador. La presión de la unidad ultraconcentradora se mantuvo constante a 40 PSI. El poro de membrana que se utilizó fue de 14 kDa. Al mismo tiempo que se ultradializó se ultraconcentró en un factor de 1:10. El ultraconcentrado obtenido se liofilizó para preservar las muestras, se recuperó todo el polvo en tubos plásticos de 50 mL y se pesó. A cada medio de cultivo liofilizado se le cuantificó proteínas totales por el método de Bradford. Las muestras se almacenaron a -20° Celsius hasta su uso.

Se preparó cada muestra para cargarla en la columna cromatográfica. 5 mg de proteína total de cada muestra se ajustaron a las condiciones del amortiguador de carga (Tris-Cl 20 mM pH=8.4 y EDTA 0.2 mM), dejándolas en un volumen de 10 mL colocados en tubo plástico de 15 mL. Se empacó una columna plástica (BIO-RAD) de 1x9 cm con 8 cm³ de resina de intercambio aniónico Q-Sefarosa de flujo rápido [Q-Sepharose fast flow (QS-FF)], el llenado de la columna con la resina, se hizo a flujo de gravedad.

Posteriormente, para compactar la resina, se utilizó una bomba peristáltica modelo RP-1 (DYNAMAX) con un flujo de 400 mL/hr por 5 min. También se empacó y ensayo con una columna con la resina DEAE-

Sephadex (intercambio aniónico) que dio resultados similares a la QS-FF, en cuanto al comportamiento de la muestra, pero con tiempos mayores y flujos más lentos, con el consiguiente aumento de presión y mayor dificultad para trabajarla, por lo que se decidió trabajar con la QS-FF.

Cada vez que se corrió un experimento la resina se equilibró con 3-5 volúmenes de amortiguador de carga (Tris-Cl 20 mM pH=8.4 y EDTA 0.2 mM) y cada muestra equilibrada en el mismo amortiguador se cargó por medio de la bomba peristáltica a un flujo de 30 mL/hr cuidando que la resina siempre tuviese amortiguador. Mientras se estaban pasando los 10 mL de muestra por la columna, se recuperaba en el otro lado de la columna la muestra que no se había retenido, a esta fracción se le designó como elusión cero (E0).

Después de haber pasado la muestra se hizo un lavado con 10 mL de amortiguador de carga a flujo de 48 mL/hr. Para recuperar las proteínas que se pegaron a la columna, se le pasaron 15 mL del amortiguador de elusión (amortiguador de carga más NaCl) con fuerza iónica incrementada secuencialmente de 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300, 400mM y 1M de NaCl. Se recuperaron 15 mL de cada una de las fracciones eluidas incluyendo la E0 y la de lavado mencionadas arriba para ver si en éstas se encontraba nuestra proteína de interés. A cada una de las fracciones recuperadas se les midió proteínas totales por Bradford para ver que porcentaje del total representaban.

Después de haber recuperado la última fracción de 1M de NaCl, a la columna se le pasaron 3 volúmenes de columna más de NaCl 1M para regenerarla. Y por último se equilibró con 3 volúmenes de NaCl 100 mM, bajo estas condiciones la columna se guardó a 4º Celsius. Cuando la columna no se va a utilizar por un largo periodo se guarda en etanol al 20%.

Nota: Al estar cargando o eluyendo la muestra en la columna, nunca permita que la resina se seque (siempre debe estar el nivel del amortiguador por arriba del de la resina).

Las fracciones colectadas se visualizaron en geles discontinuos de poliacrilamida a las concentraciones de 4-15% en condiciones desnaturalizantes (EGPA-SDS), teñidos con las técnicas de Coomassie y de plata (Merril, 1990). Se identificaron cuales fracciones contenían la hormona recombinante semipura para cada caso. Estas últimas se sometieron a liofilización (liofilizadora LABCONCO modelo 4.5), se recuperó el polvo, se pesaron y se les midieron proteínas totales por el método de Bradford.

Además, a partir del EGPA-SDS se les determinó el porcentaje de pureza del monómero con el software ImageJ versión 1.30P. Las muestras se almacenaron a -20° Celsius hasta su uso para análisis posteriores o para determinar la actividad biológica.

5.12 Ensayo de la actividad biológica de las hormonas.

La actividad biológica de las hormonas recombinantes producidas en *Pichia pastoris* se determinó por la capacidad que tienen de promover la proliferación en la línea celular Nb2, la cual proviene de linfoma de rata (Tanaka y cols., 1980; Lawson y cols., 1982).

Cabe mencionar que en días pasados un grupo de investigadores publicaron un artículo donde probaron la actividad biológica de la GH del cerdo (PGH) en este mismo sistema, y además, la PGH fue producida en *Pichia pastoris* y purificada de manera similar a como se realizó en este trabajo (Ouyang y cols., 2003). Anteriormente, ya se había purificado y caracterizado bioquímicamente la PGH natural, proveniente de hipófisis de cerdos; inclusive reportaron que la composición aminoacídica se semejaba a las GHs del perro y de la vaca (Chen y cols., 1970).

El medio de cultivo libre de células fue dializado y cada hormona cuantificada por densitometría en gel. Se ensayaron las diluciones desde 0.001 nM hasta 50 nM de cada una de las hormonas recombinantes en el medio de cultivo dializado. La medición de la proliferación celular fue determinada mediante el ensayo de reducción del MTT y se expresó como el promedio de tres repeticiones, comparada contra el testigo positivo (prolactina recombinante de rata) y el testigo negativo (medio de cultivo sin hormona).

Se sacó un vial de células Nb2 de ~70° Celsius, se sembraron para activarlas y se mantuvieron en crecimiento por 4-7 días para su propagación (cuidando que no llegaran a la concentración de 1.0 X 10^6 células/mL) en medio DMEM suplementado con 10% de suero de caballo (HS), 10% suero bovino fetal (SBF), β -mercaptoetanol (10^{-4} M), penicilina (50 U/mL) y estreptomicina (50 μ g/mL). 24 horas antes de la inducción, las células Nb2 fueron arrestadas incubándolas en medio estacionario, DMEM suplementado con el mismo medio de cultivo descrito anteriormente excepto el SFB que ahora se ajustó al 1%.

Para iniciar el ensayo, se cosecharon las células por centrifugación a 3000 r.p.m. por 5 min., y se pasaron a medio de ensayo, mismo medio mencionado pero sin SFB, dejándolas ajustadas de manera que no rebasen de 1.0 X 106 células/mL. Se hicieron los cálculos para colocar 15,000 células Nb2 por posillo de manera que junto con el volumen de las muestras a probar se ajustaran a un volumen final de 100 µL y se incubaron por 72 hrs. Las concentraciones que se probaron fueron 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 50 nM de las siguientes hormonas, CFGH, ECGH, FCGH, HGH, HPL y RPRL. Después de concluido el tiempo del ensayo, se procedió a medir el efecto de las hormonas sobre la proliferación celular por el ensayo de sales de tetrazolio (MTT).

Las sales de tetrazolio son de particular interés en la cuantificación de células viables. Este método no radiactivo fue primeramente descrito por

METODOLOGIA

Mosmann y cols. en 1983 y mejorado por otros investigadores (Denizot y Lang, 1986; Gerlier y Thomasset, 1986; Hansen y cols., 1989). El ensayo de MTT es altamente sensible y similar al ensayo radiactivo.

La actividad fue evaluada por la generación de color basada en la reducción de la sal de tetrazolio (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolio] de color amarillo a cristales púrpuras de formazán, por el metabolismo de las células Nb2. Un incremento de células vivas se refleja en el aumento de la actividad metabólica. Este incremento correlaciona directamente con la formación de cristales de formazán monitoreados en la absorbancia, es decir a mayor número de células, mayor metabolismo celular, más formación de formazán y mayor actividad biológica.

El bioensayo se llevó a cabo por triplicado bajo condiciones de atmósfera húmeda con 5% de CO₂-95% aire a la temperatura de 37°C. Pasado el periodo de incubación de 3 días, se agregaron 10 μL de MTT (a la concentración final de 0.5 mg/mL) a cada pozo. Se incubaron las muestras por 4 hrs bajo las condiciones atmosféricas mencionadas. Pasado este tiempo, se le agregaron 100 μL de la solución solubilizante del formazán (10% SDS en 0.01 M HCl) a cada uno de los pozos. Y se dejaron incubando por toda la noche bajo las mismas condiciones atmosféricas. Se verificó que el precipitado de los cristales púrpuras de formazán se hubieran disuelto completamente y se midió la absorbancia a 590 nm utilizando un lector de placas de elisa (810-RAD).

6.1 Iniciadores del ADNc de cada hormona.

En la figura 18 se muestran los iniciadores utilizados para llevar a cabo la amplificación específica de los ADNcs de cada hormona de interés. Estos se diseñaron del consenso de las secuencias nucleotídicas de las GHs de interés. Además se les incorporaron sitios extras de restricción para Xho I y Avr II en los flancos, para facilitar y permitir dirigir la inserción de los amplicones a los vectores de expresión.

Figura 18. Iniciadores para amplificar el ADNc de las hormonas. Estos se diseñaron basándose en secuencias consenso de las GHs disponibles en el GenBank. Se les incluyeron los sitios extras de restricción (Xho I y Avr II) para clonación.

6.2 Amplificación por la RCP de los ADNcs de cada hormona.

Se logró la amplificación del ADNc de la GH del perro, caballo, gato y del PL humano. El amplicón consistió prácticamente en una sola banda a nivel de los 600 pb, lo que facilitó la clonación posterior al no haber competencia por otras secuencias que pudieran ser coamplificadas (figura 19).

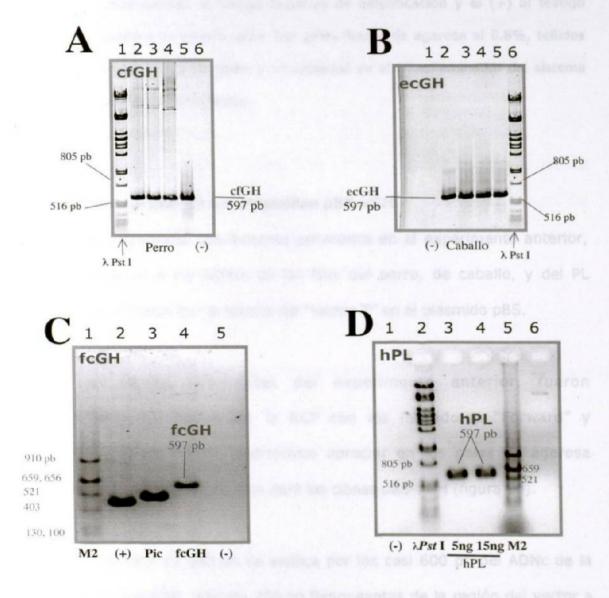


Figura 19. Amplificación de los ADNcs de las GHs y el HPL. Se muestran los productos de la RCP a nivel de 600 pb correspondientes a la

amplificación de los ADNcs para las hormonas señaladas. A) Amplificación del ADNc de la GH de perro, carriles 2 al 5; B) Amplificación del ADNc de la GH de caballo, carriles 2 al 5; C) Amplificación del ADNc de la GH de gato, carril 4 y D) Amplificación del ADNc del PL humano, carriles 3 y 4. Los marcadores de pares de bases son λ-Pst I ó M2 que es pBR322-Alu I, los carriles señalados como (-) corresponden al testigo negativo de amplificación y el (+) al testigo positivo de amplificación. Los geles fueron de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en el transiluminador del sistema de fotodocumentación.

6.3 Construcción de los plásmidos pBS-xGH.

Los amplicones previamente generados en el experimento anterior, correspondientes a los ADNcs de las GHs del perro, de caballo, y del PL humano, se clonaron por la técnica del "vector T" en el plásmido pBS.

Las clonas resultantes del experimento anterior, fueron primeramente tamizadas por la RCP con los iniciadores "Forward" y "Reverse" para el vector, pudiéndose apreciar en los geles de agarosa amplicones de 800 pb, esperados para las clonas pBS-xGH (figura 20).

El tamaño de 800 pb se explica por los casi 600 pb del ADNc de la hormona en cuestión, más los 200 pb flanqueantes de la región del vector a donde se asientan dichos iniciadores.

De igual manera, se observaron los amplicones de 200 pb correspondientes a clonas religadas de pBS que carecen del inserto de interés (figura 20).

Para corroborar estos hallazgos, a partir de clonas seleccionadas por resultar positivas para la banda de 800 pb, se obtuvo el ADN plasmídico por miniprep y se sometió a un tamizaje más exhaustivo, utilizando cortes dobles con las enzimas de restricción *Xho* I más *Avr* II, mismas que flanquean al inserto.

De la doble digestión resultaron las dos bandas esperadas: la de mayor tamaño correspondiente al vector pBS y la de 600 pb a su inserto. De esta manera se corroboró en principio la identidad de las clonas seleccionadas (refiérase otra vez a la figura 20).

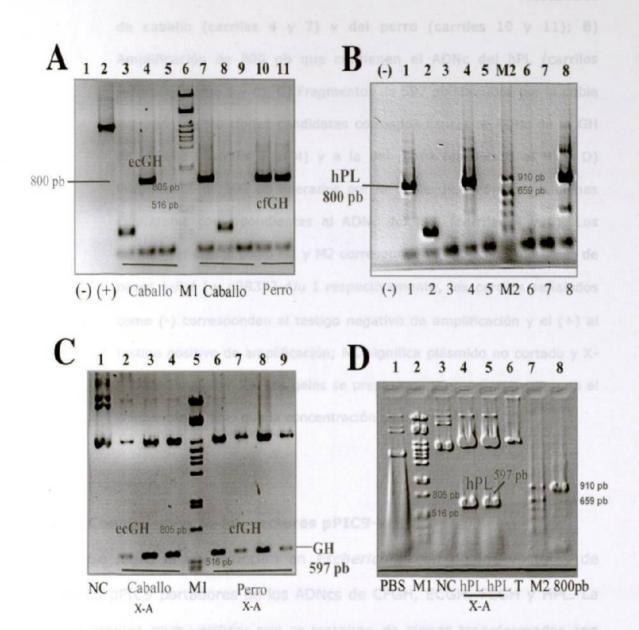


Figura 20. Detección y caracterización de pBS-cfGH (ecGH y hPL). En los geles superiores A) y B) se muestran los productos de la RCP a nivel de 800 pb que indican las clonas candidatas. En los geles inferiores C) y D) se corroboran las clonas candidatas cuando se someten a doble digestión con las enzimas Xho I más Avr II para la liberación del fragmento de 597 pb correspondiente a cada ADNc de la respectiva hormona. A) Amplificación de 800 pb que contienen el ADNc de la GH

de caballo (carriles 4 y 7) y del perro (carriles 10 y 11); B) Amplificación de 800 pb que contienen el ADNc del hPL (carriles señalados como 1 y 4); C) Fragmentos de 597 pb liberados por la doble digestión de las clonas candidatas correspondientes al ADNc de la GH de caballo (carriles 2 al 4) y a la del perro (carriles 6 al 9) y D) Fragmentos de 597 pb liberados por la doble digestión de las clonas candidatas correspondientes al ADNc del hPL (carriles 4 y 5). Los carriles señalados como M1 y M2 corresponden al marcador de pares de bases λ-Pst I y pBR322-Alu I respectivamente, los carriles señalados como (-) corresponden al testigo negativo de amplificación y el (+) al testigo positivo de amplificación; NC significa plásmido no cortado y X-A (Xho I más Avr II). Los geles se prepararon y procesaron como en el caso anterior, solo que la concentración de agarosa fue de 1%.

6.4 Construcción de los vectores pPIC9-xGH.

Se logró la construcción en *Escherichia coli* de los vectores de expresión pPIC9 portadores de los ADNcs de CFGH, ECGH, FCGH y HPL. La RCP se empleó para verificar que se trataban de clonas transformadas con cada pPIC9-xGH donde "x" corresponde a cada una de las secuencias de la hormona en cuestión. Las cionas candidatas produjeron por la RCP con los iniciadores de aox1 un amplicón de 1050 pb, pues ahora el "casete" de expresión para cada hormona está flanqueado por regiones más largas pero del gen aox1. Mientras que las que no integraron dicho "casete" originaron un amplicón de tan solo 500 pb. (figura 21).

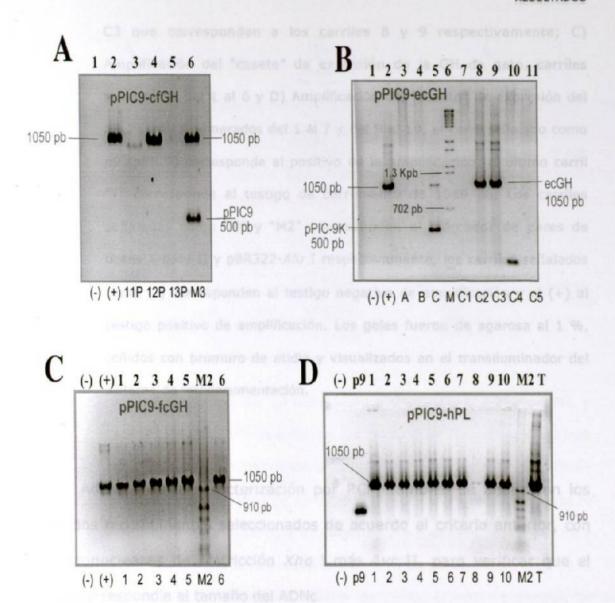


Figura 21. Detección por RCP de las clonas con pPIC9-xGH. Se aprecian en los cuatro geles algunos carriles que presentan los amplicones esperados de 1050 pb a partir de las clonas de pPIC9-xGH, correspondientes al ADNc (600 pb) en cuestión, integrado en el "casete" de expresión y flanqueado por regiones del gen aox1 a las que se unen los iniciadores. A) Amplificación del "casete" de expresión de la GH de perro, carril señalado como 12 en el carril 4; B) Amplificación del "casete" de expresión de la GH de caballo, carriles señalados como C2 y

C3 que corresponden a los carriles 8 y 9 respectivamente; C) Amplificación del "casete" de expresión de la GH de gato, carriles numerados del 1 al 6 y D) Amplificación del "casete" de expresión del hPL, carriles numerados del 1 al 7 y del 9 al 10, el carril señalado como p9 (pPIC9) corresponde al positivo de la amplificación, el último carril "T" corresponde al testigo de corrimiento de 1050 pb. Los carriles señalados como "M" y "M2" corresponden al marcador de pares de bases λ-Bste II y pBR322-Alu I respectivamente, los carriles señalados como (-) corresponden al testigo negativo de amplificación y el (+) al testigo positivo de amplificación. Los geles fueron de agarosa al 1 %, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en el transiluminador del sistema de fotodocumentación.

Además de la caracterización por RCP, también se analizaron los plásmidos recombinantes seleccionados de acuerdo al criterio anterior, con las endonucleasas de restricción *Xho* I más *Avr* II, para verificar que el inserto correspondía al tamaño del ADNc.

Las clonas que resultaron candidatas se les realizó una extracción de ADN plasmídico por la técnica de miniprep y se digirieron con las dos enzimas mencionadas. De la doble digestión observada en geles de agarosa resultaron dos bandas: una superior correspondiente al vector pPIC9 y una inferior de 597 pb correspondiente al ADNc de la hormona (figura 22).

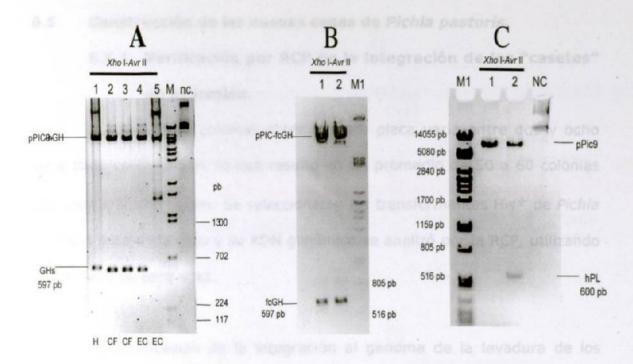


Figura 22. Caracterización de pPIC9-cfGH, pPIC9-ecGH, pPIC9-fcGH y pPIC9-hPL. Caracterización con las enzimas de restricción Xho I más Avr II de las construcciones en pPIC9 para los plásmidos portadores de los ADNcs de las GHs mencionadas. Nótese en todos los casos la liberación a partir de cada construcción pPIC9-xGH de un fragmento a nivel de los 597 pb correspondiente al ADNc de cada hormona. A) el carril H=GH de humano, CF=GH de perro, EC=GH de caballo. B) carriles 1 y 2 corresponden a la GH de gato y C) carril 1=pPIC9 linearizado, 2=lactógeno placentario humano. M=marcador de pares de bases λ-Pst I, y NC=plásmido no cortado. Los geles fueron de agarosa al 1 %, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en el transiluminador del sistema de fotodocumentación.

6.5 Construcción de las nuevas cepas de Pichia pastoris.

6.5.1 Verificación por RCP de la integración de los "casetes" de expresión.

El número de colonias obtenidas por placa varió entre dos y ocho para cada construcción, lo que resultó en un promedio de 50 a 60 colonias por cada transformación. Se seleccionaron las transformantes His+ de *Pichia pastoris* para cada caso y su ADN genómico se analizó por la RCP, utilizando los iniciadores para aox1.

La verificación de la integración al genoma de la levadura de los "casetes" de expresión de las hormonas se logró al constatar en geles de agarosa que la reacción de amplificación resultaba en una banda de 1050 pb, que corresponde al "casete" de expresión de la hormona en cuestión para cada caso, y otra de 2105 pb que corresponde al gen endógeno aoxí del genoma de *Pichia pastoris*.

En el caso de la cepa GS115 sin transformar, sólo aparece esta última (figura 23). Además, cada "casete" fue sometido a secuenciación nucleotídica para constatar que correspondieran a las hormonas del crecimiento.

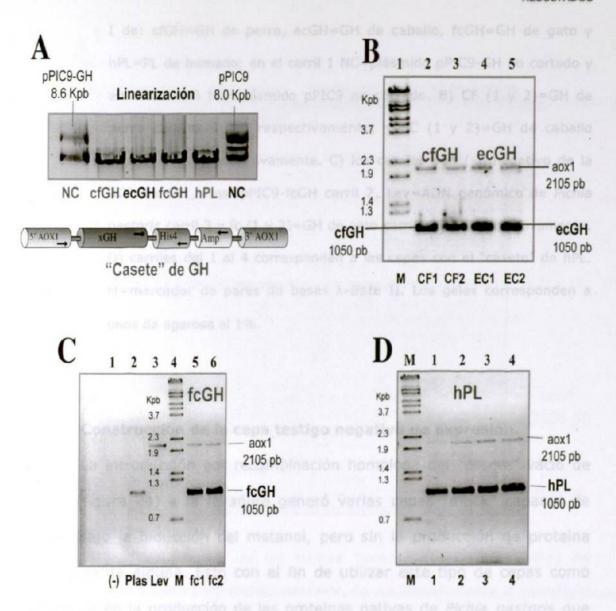
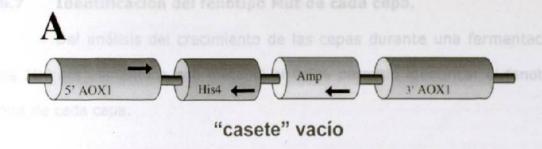


Figura 23. Detección del "casete" de cfGH, ecGH, fcGH y hPL en el genoma de Pichia pastoris. Análisis por RCP con los iniciadores de aox1 de las cepas de levadura transfectadas. En cada caso, el de 1050 pb corresponde al "casete" de expresión de la hormona recombinante en cuestión, mientras que el de 2105 pb al gen de aox1 propio de la levadura. A) Se muestra el diagrama del "casete" de xGH y en el gel se aprecian los productos linearizados (con los que se transfectó a Pichia pastoris para que se integrara el "casete" al genoma) con la enzima Sac

I de: cfGH=GH de perro, ecGH=GH de caballo, fcGH=GH de gato y hPL=PL de humano; en el carril 1 NC=plásmido pPIC9-GH no cortado y en el carril 6 NC=plásmido pPIC9 no cortado. B) CF (1 y 2)=GH de perro carriles 3 y 3 respectivamente; y EC (1 y 2)=GH de caballo carriles 4 y 5 respectivamente. C) los carriles son (-)=negativo de la RCP carril 1, Plas=pPIC9-fcGH carril 2, Lev=ADN genómico de *Pichia pastoris* carril 3 y fc (1 y 2)=GH de gato carriles 5 y 6 respectivamente. D) carriles del 1 al 4 corresponden a las cepas con el "casete" de hPL. M=marcador de pares de bases λ-Bste II. Los geles corresponden a unos de agarosa al 1%.

6.6 Construcción de la cepa testigo negativo de expresión.

La introducción por recombinación homóloga del "casete" vacío de pPIC9 (figura 24) a la levadura generó varias cepas "mock" capaces de crecer bajo la inducción del metanol, pero sin la producción de proteína recombinante alguna. Esto con el fin de utilizar este tipo de cepas como referencia en la producción de las proteínas nativas de *Pichia pastoris* que son las que contaminan el medlo de cultivo. Las construcciones se tamizaron por medio de la RCP a partir de colonias completas utilizando los iniciadores de aox1 que dieron origen a dos amplicones, según se pudo apreciar en el gel de agarosa: uno mayor alrededor de los 2100 pb que corresponde al gen nativo de *Pichia pastoris* (igual que el obtenido en las construcciones anteriores) y otro menor de 500 pb en vez del de 1050 pb obtenido en las clonas productoras debido a que su "casete" de pPIC9 esta vacío (figura 24).



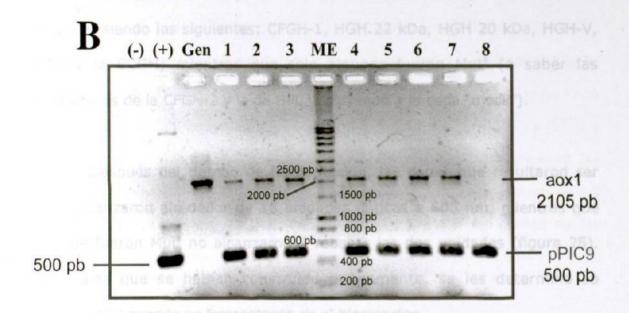


Figura 24. Identificación de las clonas "mock" (testigo negativo de expresión) de Pichia pastoris. A). La imagen ilustra la estructura del "casete" vacío (sin el ADNc de la hormona) de pPIC9 que se integró en el genoma de las cepas "mock". B). En los carriles numerados del 1 al 8 se muestran los productos de la RCP amplificados con los iniciadores aox1 a partir de ADN genómico, (-)= testigo negativo de la RCP, (+)=testigo positivo de RCP (pPIC9), Gen=ADN genómico de Pichia pastoris y ME=marcador de pares de bases (Escalera de 200 pb). La banda de 2015 pb corresponde al gen aox1 endógeno y la de 500 pb al "casete" vacío de pPIC9 (Gel de agarosa al 1%).