

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



DESARROLLO DE UN ESQUEMA DE PURIFICACION
PARA LA HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA
PRODUCIDA POR *Pichia pastoris*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

PRESENTA:

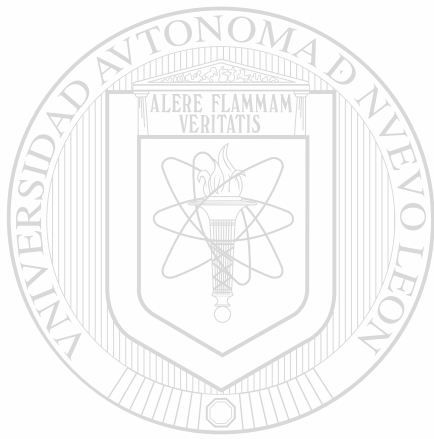
L.Q.I. JUAN FRANCISCO VILLARREAL CHIU

Monterrey, N. L.

Junio de 2006



0 1 2 3 4 5
6 7 8 9 10
cm



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DESARROLLO DE UN ESQUEMA DE PURIFICACIÓN PARA LA
HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA PRODUCIDA POR**

Pichia pastoris



UANL

TESIS

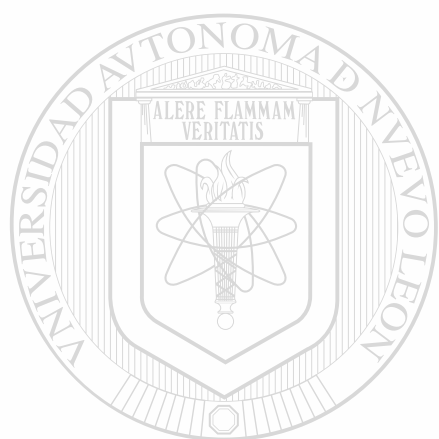
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

PRESENTA:

L.Q.I. JUAN FRANCISCO VILLARREAL CHIU

Monterrey, N. L.

Junio de 2006



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

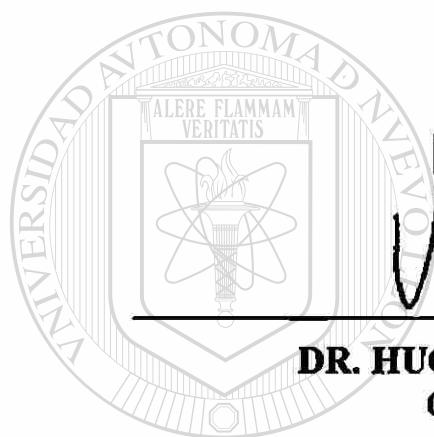


**DESARROLLO DE UN ESQUEMA DE PURIFICACIÓN
PARA LA HORMONA DEL CRECIMIENTO BOVINA
PRODUCIDA POR *PICHLIA PASTORIS***

Aprobación de la Tesis:



DR. GERARDO PADILLA RIVAS
Director de Tesis



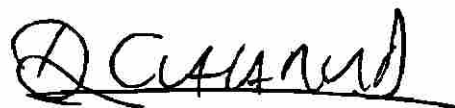
DR. HUGO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

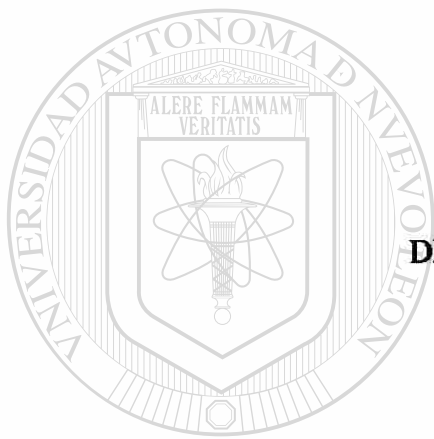
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DR. KARIM ACUÑA ASKAR
Co-Director de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Postgrado



DRACO DORMIENS NUNQUAM TITILLANDUS

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

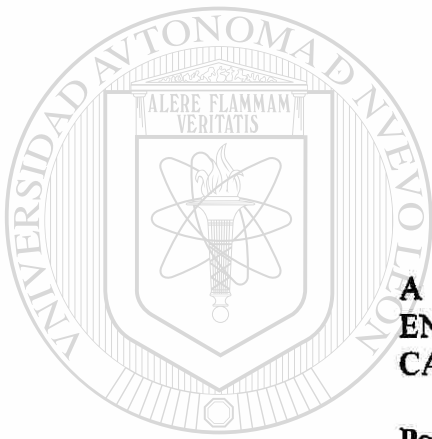
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A MI FAMILIA:

**DR. JUAN FCO. VILLARREAL ARREDONDO
BIOL. MA. GUADALUPE CHIU DE VILLARREAL
ANNIE CHANTALE VILLARREAL CHIU**

**Hay mil mentiras que pueden hacerme caer...
Y un sólo un camino que lleve a la felicidad...
Mis miedos a fracasar han muerto hace tiempo gracias a ustedes.**



**A AQUELLOS QUE DEPOSITARON SU CONFIANZA
EN MI, EMPRENDIENDO JUNTOS EL DIFÍCIL
CAMINO DE LA VIDA**

**Porque compartir los sueños con un amigo es empezar a
convertirlos en realidad.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



AGADRECIAMIENTOS

TODO MI AGRADECIMIENTO

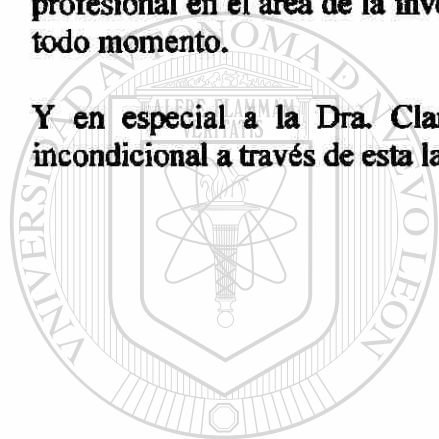
A mi director de tesis Dr. Gerardo Padilla Rivas por su calidez, sugerencias y confianza.

A los doctores Hugo Barrera Saldaña, Augusto Rojas Martínez, Rocío Ortiz López, Agnés Revolt de Mendoza, Juan Francisco Velásquez, Ana María Rivas y Herminia Martínez por su guía profesional y orientación para realizar este estudio.

A mis compañeros y amigos de los distintos departamentos de esta facultad con quienes compartí tantas aventuras.

Con profundo cariño y admiración al Dr. Karim Acuña Askar, por permitirme ser un profesional en el área de la investigación y ser una fuente de inspiración y confianza en todo momento.

Y en especial a la Dra. Clara Díaz y Mauricio Salinas por su amistad y ayuda incondicional a través de esta larga jornada.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

<i>Contenido</i>	<i>Página:</i>
Lista de Tablas	i
Lista de Cuadros	ii
Lista de Figuras	iii
Nomenclatura	v
Resumen	vi

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1. Introducción	1
1.2. Antecedentes	2
1.2.1. Cromatografía de intercambio aniónico	4
1.2.2. Cromatografía de interacciones hidrofóbicas	6
1.2.3. Cromatografía de exclusión molecular	8
1.2.4. Cromatografía líquida de alta resolución	10
1.3. Justificación	11
1.4. Hipótesis	12

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

2.1. General	13
2.2. Particulares	13

CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Esquema general del trabajo	14
3.2. Material	16
3.2.1. Equipo	16
3.2.2. Material	17
3.2.3. Reactivos	19
3.3. Métodos	22
3.3.1. Purificación de la bGH	22
3.3.2. Cromatografía de intercambio aniónico	22
3.3.3. Cromatografía de interacciones hidrofóbicas	23
3.3.4. Cromatografía de exclusión molecular	24
3.3.5. Cromatografía líquida de alta resolución	24
3.3.6. Western blot	25

<i>Contenido</i>	<i>Página:</i>
3.4. Análisis de proteínas	27
3.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida	27
3.4.1.1. Preparación de soluciones stock	27
3.4.1.2. Procedimiento	27
3.4.2. Cuantificación de proteínas totales	29

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Implementación de metodologías	30
4.2. Esquema de purificación	34

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

42

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

43

APÉNDICES

Apéndice A. Datos obtenidos de la absorbancia de los estándares preparados para la curva de calibración empleada para la cuantificación de proteínas totales

Apéndice B. Curva de calibración para cuantificación de proteínas totales

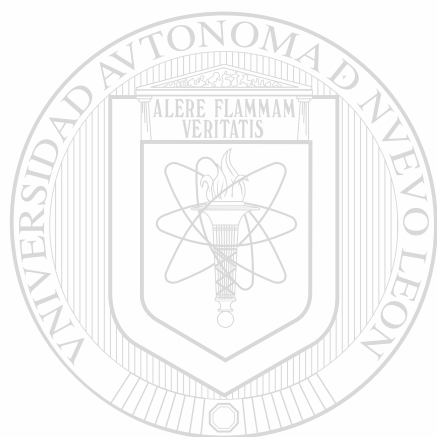
Apéndice C. Promedio de las absorbancias obtenidas en las 6 réplicas del esquema de purificación.

Apéndice D. Promedio de los microgramos de las muestras analizadas en las 6 réplicas del esquema de purificación basados en la curva de calibración y las absorbancias obtenidas.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro:</u>	<u>Página:</u>
1. Técnicas de separación de proteínas	2
2. Ventajas de las técnicas principales para la separación de proteínas	3
3. Preparación de estándares para la curva de calibración del ensayo de Bradford.	30
4. Resultados del esquema de purificación	39



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

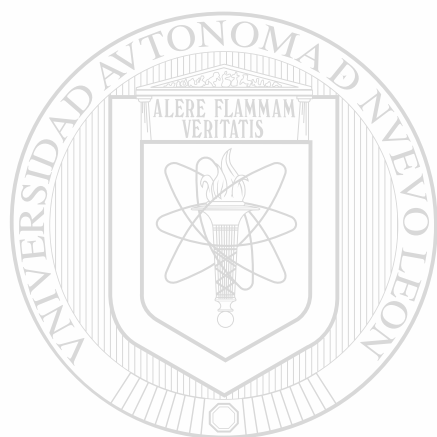


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura:</u>	<u>Página:</u>
1. Gel representativo del comportamiento de la bGH estándar frente a la cromatografía de intercambio aniónico	31
2. Gel representativo del comportamiento de la bGH comercial incubada con pPIC9 frente a la cromatografía de intercambio aniónico	32
3. Gel representativo del comportamiento de la bGH comercial frente a la cromatografía de interacciones hidrofóbicas	33
4. Gel representativo del comportamiento de la bGH estándar frente a la cromatografía de exclusión molecular	33
5. Cromatograma representativo de la bGH comercial estándar frente a las condiciones establecidas por Mukhopadhyay <i>et al.</i> , 2002 para CLAR-FR	34
6. Cromatograma representativo de la reinyección del pico colectado a los 19 minutos de la separación de bGH comercial estándar frente a las condiciones establecidas por Mukhopadhyay <i>et al.</i> , 2002 para CLAR-FR	34
7. Gel representativo del comportamiento de la muestra dializada del medio de fermentación de <i>Pichia pastoris</i> que expresa bGHr frente a la cromatografía de intercambio aniónico	36
8. Gel representativo de la cromatografía de interacciones hidrofóbicas de la muestra proveniente de la fracción 0M de intercambio aniónico	37
9. Gel representativo del comportamiento de la bGH recombinante proveniente de la cromatografía de hidrofobicidad frente a la cromatografía de exclusión molecular	38

10. Cromatograma representativo de la bGHr purificada frente a la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa	40
11. Cromatograma representativo de la reinyección del pico colectado a los 19 minutos de la separación de la bGHr purificada frente a CLAR-FR	40
12. Gel de muestras procesadas en Western blot	41
13. Western blot de muestras representativas del proceso de purificación	42



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOMENCLATURA

DNA	Ácido desoxirribonucleico
nm	Nanómetros
GH	Hormona del crecimiento
bGH	Hormona del crecimiento bovino
bGHr	Hormona del crecimiento bovino recombinante
hGHr	Hormona del crecimiento humano recombinante
pI	Punto isoelectrico
pH	Potencial de hidrógeno
CLAR-FR	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
kDa	Kilodaltones
NaCl	Cloruro de sodio
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amonio
mM	Milimolar
EGPA-SDS	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
mL	Mililitros
μL	Microlitros
μg	Microgramos
μm	Micrómetros
g	Gramos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
BSA	Albúmina sérica bovina
rpm	Revoluciones por minuto
uA	Unidades de absorbancia

RESUMEN

L.Q.I. Juan Francisco Villarreal Chiu

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Junio 2006

Área de Estudio: Biología Molecular

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

Numero de páginas: 52

Título del estudio. “Desarrollo de un esquema de purificación para la hormona del crecimiento bovina producida por *Pichia pastoris*”.

Introducción. La purificación de proteínas se realiza a través del empleo de técnicas cromatográficas que se basan en sus características intrínsecas. Entre las técnicas cromatográficas más empleadas se encuentran la de intercambio iónico, la de interacciones hidrofóbicas y la de exclusión molecular. Estas técnicas suelen ser combinadas para producir un esquema de purificación más eficiente al basarse en varias de las características de la proteína de interés.

Objetivo. Desarrollar un proceso de purificación para la bGH producida por *Pichia pastoris*.

Material y Métodos. La muestra inicial de trabajo fue el medio de cultivo sin biomasa de una fermentación inducida de la cepa de *Pichia pastoris* pPIC9-bGH, dializado contra buffer Tris-HCl 20 mM y EDTA 0.2mM. Como fase inicial de purificación se utilizó la cromatografía de intercambio aniónico (CIA), empleando una resina tipo Q-Sepharose. La elución se realizó a través de un gradiente de 0, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 M de NaCl y se recuperaron fracciones de 10 mL. Como paso intermedio se utilizó la cromatografía de interacciones hidrofóbicas (CIH), donde se empleó una resina Phenyl-Sepharose. La fracción con bGH obtenida en CIA se acondicionó con 1 M de sulfato de amonio (SA). La elución se realizó mediante un gradiente de 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 y 0 M de SA. Se colectaron fracciones de 10 mL. Como paso final se utilizó la cromatografía de exclusión molecular (CEM) con resina Sephacryl S-100. La fracción con bGH obtenida de la CIH fue cargada en la columna empleando buffer Tris-HCL 20 mM para realizar la elución. En este caso se colectaron fracciones de 1 mL. La cantidad de proteínas en cada una de las fracciones fue determinada por el método de Bradford y su composición fue analizada en geles discontinuos de poliacrilamida al 4-15% en condiciones reductoras.

Resultados. La muestra inicial contenía 912 ± 183 µg de proteína total, de los cuales el 15% representaron la bGHr. En la fase inicial mediante la CIA, la muestra se semi-purificó en un 92% obteniéndose un porcentaje de recuperación del 85.8% de bGHr en la fracción de elución 0 M de NaCl. En la fase intermedia de CIH se recuperó el 62.7% de la bGHr con una pureza del 98.5%. La bGHr se recuperó en la fracción 0M de SA. En la CEM como fase final se obtuvo un 97.4% de recuperación con una pureza del 99.5%. El proceso presentó un 52.4% de recuperación total de la bGHr.

Conclusiones. La purificación con CIA-CIH-CEM es eficiente al purificar en un 99.5% y recuperar el 52% de la bGHr producida por *P. pastoris*. Además, el proceso presenta la ventaja de proporcionar distintos grados de pureza para satisfacer las necesidades del laboratorio.

Dr. Gerardo Padilla Rivas
Director de Tesis

Dr. Hugo Barrera Saldaña
Co-director de Tesis

Dr. Karim Acuña Askar
Co-director de tesis

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1. INTRODUCCIÓN

La introducción de la tecnología del ADN recombinante ha permitido la explotación industrial de proteínas con propiedades terapéuticas que permanecían limitadas para su comercialización. Gracias a esto, las proteínas recombinantes juegan un papel muy importante en la medicina moderna. Vacunas, anticuerpos, hormonas y agentes anticancerígenos son sólo algunos ejemplos de la gran variedad de proteínas recombinantes que se pueden obtener al emplear esta tecnología (Barrera-Saldaña, 1992).

A la par del uso de proteínas recombinantes, se ha favorecido el desarrollo de mejores métodos para su producción y purificación. Diversos microorganismos han sido desarrollados como las mejores opciones para expresar proteínas, destacando entre ellos la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, la cual cuenta con mecanismos de expresión condicionada de proteínas recombinantes y la capacidad para favorecer su secreción al medio de cultivo (Barrera-Saldaña y cols., 2004).

La presente investigación se enfoca en la purificación de la hormona de crecimiento bovina recombinante expresada por la levadura *P. pastoris*, empleando para esto técnicas cromatográficas que se basan en las características intrínsecas de la proteína de interés para lograr su acondicionamiento hacia el ambiente más adecuado para su posterior utilización en análisis especializados de bioactividad.

1.2. ANTECEDENTES

La purificación de una proteína es esencial para el estudio de sus propiedades e investigar sus aplicaciones en la medicina. Para esto, existen técnicas de separación que hacen uso de las propiedades fisicoquímicas propias de las moléculas, como las que se describen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Técnicas de separación de proteínas.

<i>Técnicas</i>	<i>Propiedad empleada</i>	<i>Aplicación recomendada</i>
<i>No cromatográficas</i>		
Filtración por Membrana	Tamaño molecular	Al inicio de un proceso de purificación, especialmente con grandes volúmenes de medio.
Centrifugación	Densidad, tamaño molecular	Fraccionamiento de componentes celulares
<i>Cromatográficas</i>		
Exclusión Molecular	Tamaño molecular	Paso final de esquema de purificación
Intercambio iónico	Carga	Paso inicial de esquema de purificación
Hidrofobicidad	Hidrofobicidad	Después de una precipitación con sulfato de amonio
Fase reversa	Hidrofobicidad	Cuando la actividad biológica de la proteína no es relevante
Afinidad	Unión a ligando	Al inicio de un esquema de purificación
Covalencia	Grupos tiol	Separación de proteínas que contienen grupos tiol
Cromatofoco	Carga, pI	Separación de isoformas.

Tomado de: Ahmed, 2005.

Las técnicas de separación pueden ser combinadas para producir un esquema de purificación más eficiente al basarse en varias de las características de la proteína de interés. El Cuadro 2 muestra las ventajas de las principales técnicas cromatográficas empleadas en la purificación de proteínas y su conveniencia a través de las distintas fases de un esquema de purificación (Skoog y cols., 1995).

Cuadro 2. Ventajas de las técnicas principales para la separación de proteínas

Técnica	Ventajas	Fase Captura	Fase Intermedia	Fase Pulido	Condición inicial de la muestra	Condición final de la muestra
Cromatografía de intercambio iónico	Alta resolución Alta capacidad Alta velocidad	Muy conveniente	Muy conveniente	Poco conveniente	Baja fuerza iónica Sin límite en volumen	Posible cambio pH Alta fuerza iónica Muestra concentrada
Cromatografía de interacciones hidrofóbicas	Buena resolución Buena capacidad Alta velocidad	conveniente	Muy conveniente	Poco conveniente	Alta fuerza iónica Sin límite en volumen	Baja fuerza iónica Muestra concentrada
Cromatografía de exclusión molecular	Alta resolución	No conveniente	Poco conveniente	Muy conveniente	Volumen de muestra limitado Límite en velocidad de flujo	Posible cambio de buffer Muestra diluida
Cromatografía líquida de alta resolución	Alta resolución	Poco conveniente	Poco conveniente	Muy conveniente	Volumen de muestra limitado	Perdida de actividad biológica
Cromatografía de Afinidad	Alta resolución Alta capacidad Alta velocidad	Muy conveniente	Muy conveniente	conveniente	Condiciones específicas de ligación Sin límite en volumen	Condiciones específicas de elución Muestra concentrada

Tomado de: Amersham Biosciences, 2001

1.2.1. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO

La cromatografía de intercambio iónico empleada para la separación de biomoléculas fue introducida en 1960 y actualmente juega un papel muy importante en la separación y purificación de proteínas recombinantes (Vydac, 2000).

Esta cromatografía basa su principio de separación en la relación que existe entre la carga neta de las proteínas y el pH de la fase móvil, ya que esta relación es única para cada proteína. La interacción entre las moléculas cargadas y la matriz es controlada para favorecer la unión o elución de moléculas específicas y lograr así la separación de la molécula de interés (Skoog y cols., 1995).

La cromatografía de intercambio aniónico ha sido empleada como fase inicial en distintos esquemas para purificar hormonas de crecimiento y otras proteínas de interés médico e industrial. Olson y cols., (1981) fueron los primeros en reportar la purificación de GH humana recombinante (hGHr) producida por *Escherichia coli*. Para ello emplearon la cromatografía de intercambio aniónico débil (DEAE-Sepharose) como fase inicial en combinación de cinco pasos de separación, los cuales incluyen una lisis celular, seguida de una precipitación con sulfato de amonio, la cromatografía de intercambio aniónico débil, una cromatografía de intercambio catiónico débil (CM-Sepharose) y finalizando con una cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S-200), reportando con esto un 98% de pureza final sin anexar información de la recuperación o pureza obtenidos por cada técnica individual. En 2003, Ouyang y cols., emplearon como único paso de purificación la cromatografía de intercambio aniónico fuerte (Q-Sepharose) para purificar GH porcina recombinante expresada por *Pichia pastoris* previa precipitación con sulfato de amonio, recuperando cerca del 70% de la GH recombinante con una pureza relativa del 95%.

Zhang y cols., (2004) purificaron inulinasa de *Aspergillus niger* expresada en *P. pastoris*, la cual es una enzima degradadora de inulina con la cual se produce jarabe rico en fructosa. Ellos reportaron el empleo de la cromatografía de intercambio aniónico fuerte (HiTrapQ) como único paso cromatográfico obteniendo 11% de recuperación de la proteína con un 95% de pureza. Además reportaron que las proteínas de *P. pastoris* fueron eluidas a fuerzas iónicas mayores, destacando así el carácter aniónico de las

proteínas del sistema de expresión en condiciones de pH neutro, concluyendo que esta característica puede ser empleada como estrategia principal para eliminar este tipo de proteínas contaminantes en la cromatografía de intercambio iónico.

Lo anterior fue comprobado por Chen *y cols.*, (2004), quienes produjeron y purificaron fosfatasa alcalina de placenta humana en *P. pastoris*. Como purificación, emplearon una columna empacada con una matriz de intercambio aniónico débil (DEAE-Sepharose), con la cual obtuvieron cerca del 100% de recuperación y una pureza superior al 99%.

La cromatografía de intercambio aniónico en sus modalidades fuerte (resina denominada Q) y débil (resina denominada DEAE) ha sido empleada para purificar otras proteínas de interés llevando a porcentajes de pureza superiores al 95% cuando ha sido empleada como fase inicial del proceso de purificación. Entre esas proteínas se encuentran la ovalbumina de huevo (Ito y Matsudomi, 2005), la ovotransferrina (Mizutani *y cols.*, 2004), penicilina G acilasa de *Providencia rettgeri* (Senerovic *y cols.*, 2005), pepsinogeno porcina (Yoshimasu *y cols.*, 2002), galactosa- β -1,3-glucuronosiltransferasa I (Lattard *y cols.*, 2005), enzima fibrinolítica PM₂₄₆ (Hu *y cols.*, 2005) y la tanasa de *Aspergillus oryzae* (Zhong *y cols.*, 2004).

1.2.2. CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIONES HIDROFÓBICAS

Como fase intermedia de purificación, la cromatografía de interacciones hidrofóbicas es una excelente herramienta para separar proteínas que presentan cierto carácter hidrofóbico. Esta cromatografía está basada en el principio establecido por Tiselius en 1948, donde menciona que las proteínas y otras sustancias que son precipitadas a altas concentraciones de sales neutras (proceso conocido como “Salting Out”) son adsorbidas fuertemente en adsorbentes, que en soluciones libres de sales no muestran afinidad por las proteínas y que a altas concentraciones se convierten en excelentes adsorbentes. (Skoog y cols., 1995).

En 1986, Lefort y Ferrara obtuvieron a partir de *Escherichia coli* una hGHR 100% pura aplicando la cromatografía de interacciones hidrofóbicas (Phenyl-Sepharose) como fase intermedia, en combinación con una cromatografía de intercambio aniónico débil como fase inicial (DEAE-Sepharose) y una de exclusión molecular como fase de pulido (Ultragel AcA44), reportando que el uso de la resina Phenyl-Sepharose llevó a un 28% de recuperación del producto final, siendo este el paso más ineficiente del proceso.

Este resultado fue comprobado por De Oliveira y cols. (1999) quienes reportaron la reducción de contaminantes provenientes de *E. coli* en un 99%, recuperando un 43% de hGHR planteando la utilización de una cromatografía de interacciones hidrofóbicas (Phenyl-Sepharose) como fase final en el esquema de purificación desarrollado por estos autores.

Hasta la fecha, la cromatografía de interacciones hidrofóbicas no ha sido empleada para purificar GH recombinantes expresadas en *Pichia pastoris*. Sin embargo, diversos autores han recurrido a esta cromatografía para purificar otras proteínas expresadas bajo este sistema. Damasceno y cols., (2004) purificaron a través de esta cromatografía un fragmento de anticuerpo humano, correspondiente al dominio variable de la cadena sencilla, para su uso en el tratamiento contra el cáncer de colon denominado A33scFv. Ellos emplearon la cromatografía de interacciones hidrofóbicas (Phenyl-Sepharose) como fase intermedia de purificación, con la cual obtuvieron un 25% de recuperación y 90% de pureza.

Gadkari *y cols.*, (2003) expresaron y purificaron las hormonas gonadotropina coriónica y luteinizante humanas en *Pichia pastoris* para investigar su función en el proceso de la reproducción humana. Los autores reportan el empleo de la cromatografía de interacciones hidrofóbicas (Phenyl-Sepharose) como paso inicial seguido de una cromatografía de intercambio catiónico fuerte (SP-Sepharose), obteniendo como resultado una preparación enriquecida de ambas proteínas con una pureza superior al 95%.

Nuevas proteínas recombinantes han sido purificadas a través de la cromatografía de interacciones hidrofóbicas, aumentando hasta en un 90% de pureza cuando esta cromatografía ha sido empleada como fase inicial y/o intermedia del proceso de purificación. Entre las proteínas purificadas se encuentran la aglutinina de *Galanthus nivalis* (Baumgartner *y cols.*, 2003), butolina (Weatherly *y cols.*, 2002), cinamoil esterasa de *Aspergillus niger* (Juge *y cols.*, 2001), enzima activadora de proteína C (Kunes *y cols.*, 2002), lipasa B de *Candida antarctica* (Rotticci-Mulder *y cols.*, 2001), bilirrubina oxidasa de *Myrothecium verrucaria* (Kataoka *y cols.*, 2005) y la equistatina (Outchkourov *y cols.*, 2002), entre otras.

1.2.3. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

La cromatografía de exclusión molecular ha demostrado ser una herramienta eficaz para finalizar los esquemas de purificación (denominándose usualmente a esta fase de finalización como fase de pulido), permitiendo el acondicionamiento de la proteína de interés, bajo las condiciones más adecuadas para su uso final. Esta técnica basa sus principios de separación, en la diferencia en tamaño que presentan las macromoléculas y la migración diferencial que presentan a través de los poros de distintos tamaños de la resina (Skoog *y cols.*, 1995).

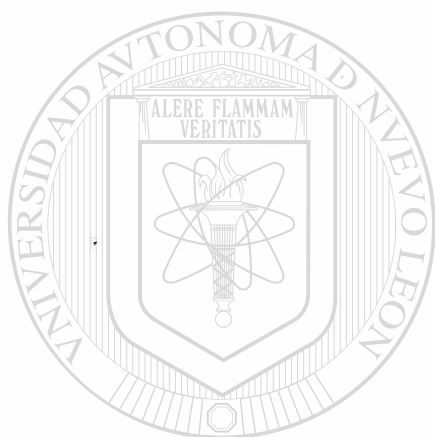
Autores antes mencionados (Olson *y cols.*, 1981; Lefort y Ferrara, 1986; de Oliveira *y cols.*, 1999; Rotticci-Mulder *y cols.*, 2001 y Kataoka *y cols.*, 2005) han empleado esta cromatografía como fase de pulido en sus esquemas de purificación, consiguiendo con esto elevar sus porcentajes de purificación por arriba del 95%.

Por otra parte, Flodh *y cols.*, (1986) reportaron que el uso de la cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S-200) logró aumentar la pureza de una preparación de hGHr expresada en *Escherichia coli*, obteniéndola a un grado superior al 99%.

Barbier *y cols.*, (2004) emplearon una resina de exclusión molecular tipo Sepharose 4B (Amersham Biosciences) para purificar la enzima nitrato reductasa eucariótica expresada en *Pichia pastoris*, como paso posterior a una cromatografía de afinidad por metales inmovilizados. Este grupo de reportó una eficiencia de recuperación del 98%, con una pureza superior al 98%. De manera similar, Fierens *y cols.*, (2004) usaron la cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S-100) como paso final en su esquema de purificación para obtener la proteína inhibidora de xilanasas I de *Triticum aestivum*, la cual es utilizada en la preparación de cereales y sus derivados. El empleo de esta cromatografía llevó a una pureza mayor al 95% con un rendimiento de recuperación cercano al 50%.

Existen otros ejemplos donde la cromatografía de exclusión molecular como fase de pulido, en el proceso de separación, ha logrado la purificación de proteínas recombinantes producidas por *Pichia pastoris*, elevando la pureza de las proteínas recombinantes hasta un 99%. Entre los esquemas de purificación que han reportado el

uso de esta cromatografía están los desarrollados por Damaso *y cols.*, (2003) que purificaron la xilanasa de *Thermomyces lanuginosis*; Ševo *y cols.*, (2002) que lograron aislar penicilina G amidasa de *Providencia rettgeri*; Rolland *y cols.*, (2001) que purificaron y caracterizaron un antígeno contra la proteína core del Hepatitis B; Paramasivam *y cols.*, (2002) que purificaron lactoferrina de caballo; Bisht *y cols.*, (2001) que produjeron y aislaron una proteína de la envoltura del virus del dengue tipo 2; Liu *y cols.*, (2001) que aislaron al interferón α -1 humano y Chantasingh *y cols.*, (2005) que prepararon y purificaron la xilanasa 10 de *Aspegillus aerreus*, entre otras.



UANL

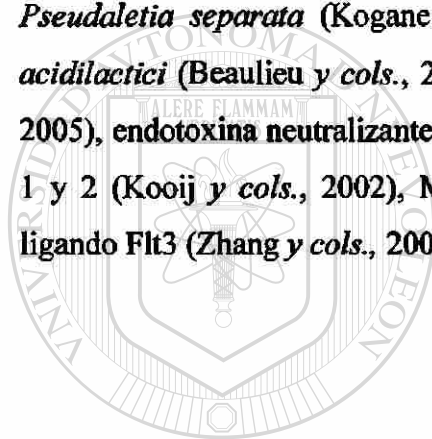
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.2.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía líquida de alta resolución en su modalidad de fase reversa (CLAR-FR) es una herramienta ampliamente utilizada para evaluar la pureza final del producto purificado, con la cual se comparan los espectros y tiempos de retención del producto purificado contra el tiempo de retención del compuesto estándar comercial. Mukhopadhyay y cols., (2002) establecieron las condiciones de separación óptimas para aislar y confirmar la identidad de diversas GHs recombinantes producidas por *Escherichia coli*. Actualmente, la identidad de las proteínas recombinantes expresadas en *Pichia pastoris* es evaluada mediante esta metodología, destacándose como ejemplos de estas proteínas recombinantes la citosina bloqueadora de crecimiento de *Pseudaletia separata* (Koganesawa y cols., 2002), pediocina PA-1 de *Pediococcus acidilactici* (Beaulieu y cols., 2005), alergen Ole 10 de polen de olivo (Barral y cols., 2005), endotoxina neutralizante (Paus y cols., 2002), glicoproteína D de Herpes Simple 1 y 2 (Kooij y cols., 2002), Monoamina oxidasa A humana (Li y cols., 2002) y el ligando Flt3 (Zhang y cols., 2005), entre otras.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

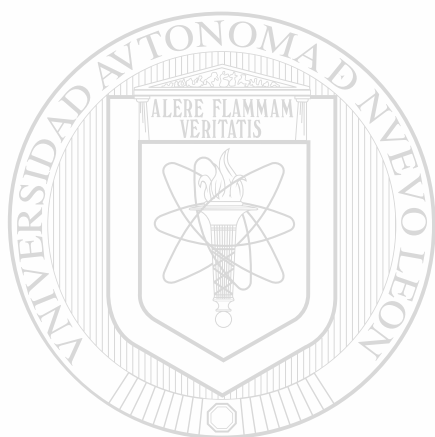


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.3. JUSTIFICACIÓN

El propósito de la producción en masa de proteínas recombinantes es el de purificarlas para usarlas en el beneficio de la salud. Debido a que las hormonas de crecimiento tienen un particular interés para la industria farmacéutica y pecuaria, es necesario el desarrollo de un esquema de purificación que permita aislar estas proteínas.

Este trabajo surge de la necesidad de purificar la hormona de crecimiento bovina recombinante producida en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Bioquímica por la levadura *Pichia pastoris* en un porcentaje superior al 95%.



UANL

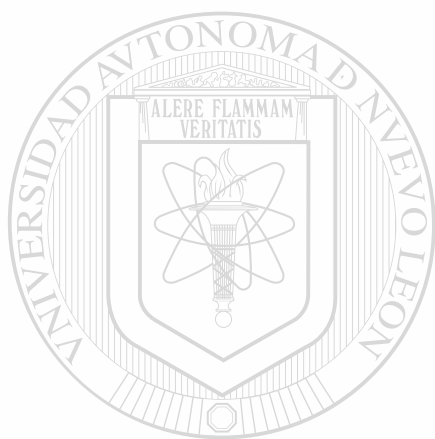
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



1.4. HIPÓTESIS

La estrategia de purificación por Cromatografía de Intercambio Aniónico – Cromatografía de Interacciones Hidrofóbicas – Cromatografía de Exclusión Molecular es adecuada para establecer un porcentaje de pureza superior al 95% para la hormona de crecimiento bovina producida por *Pichia pastoris*.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

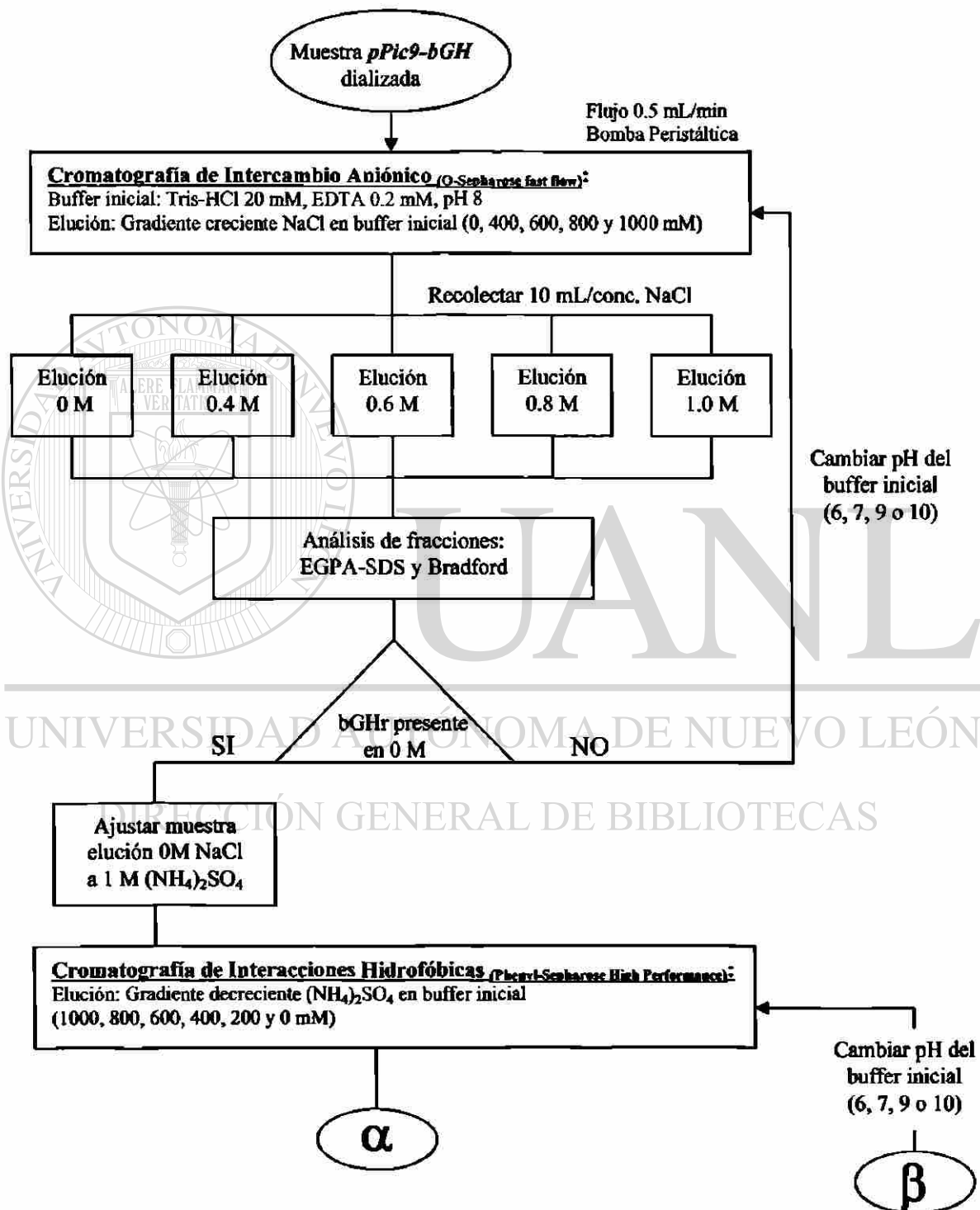
Desarrollar un esquema de purificación para la hormona de crecimiento bovina producida en *Pichia pastoris*.

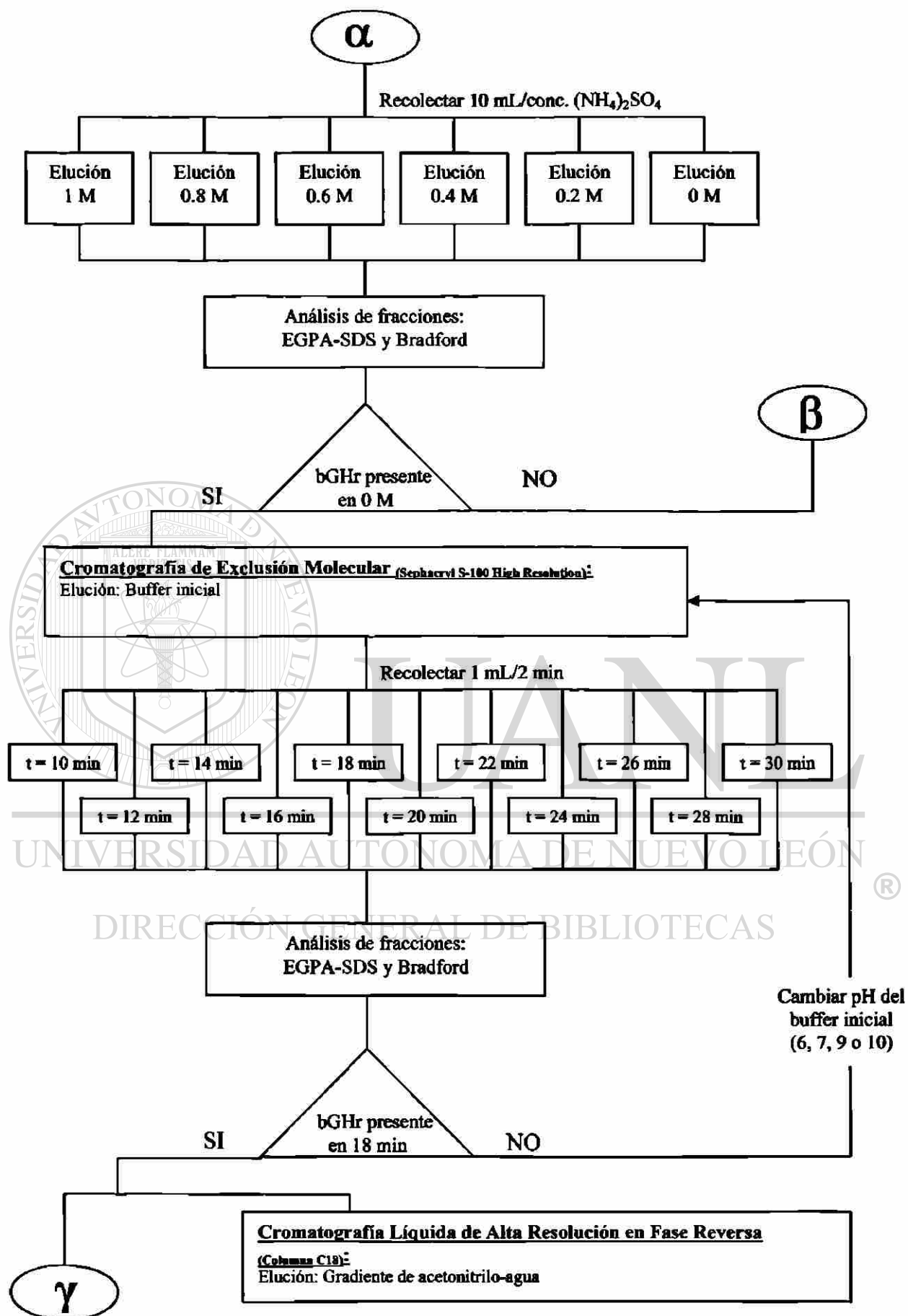
2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

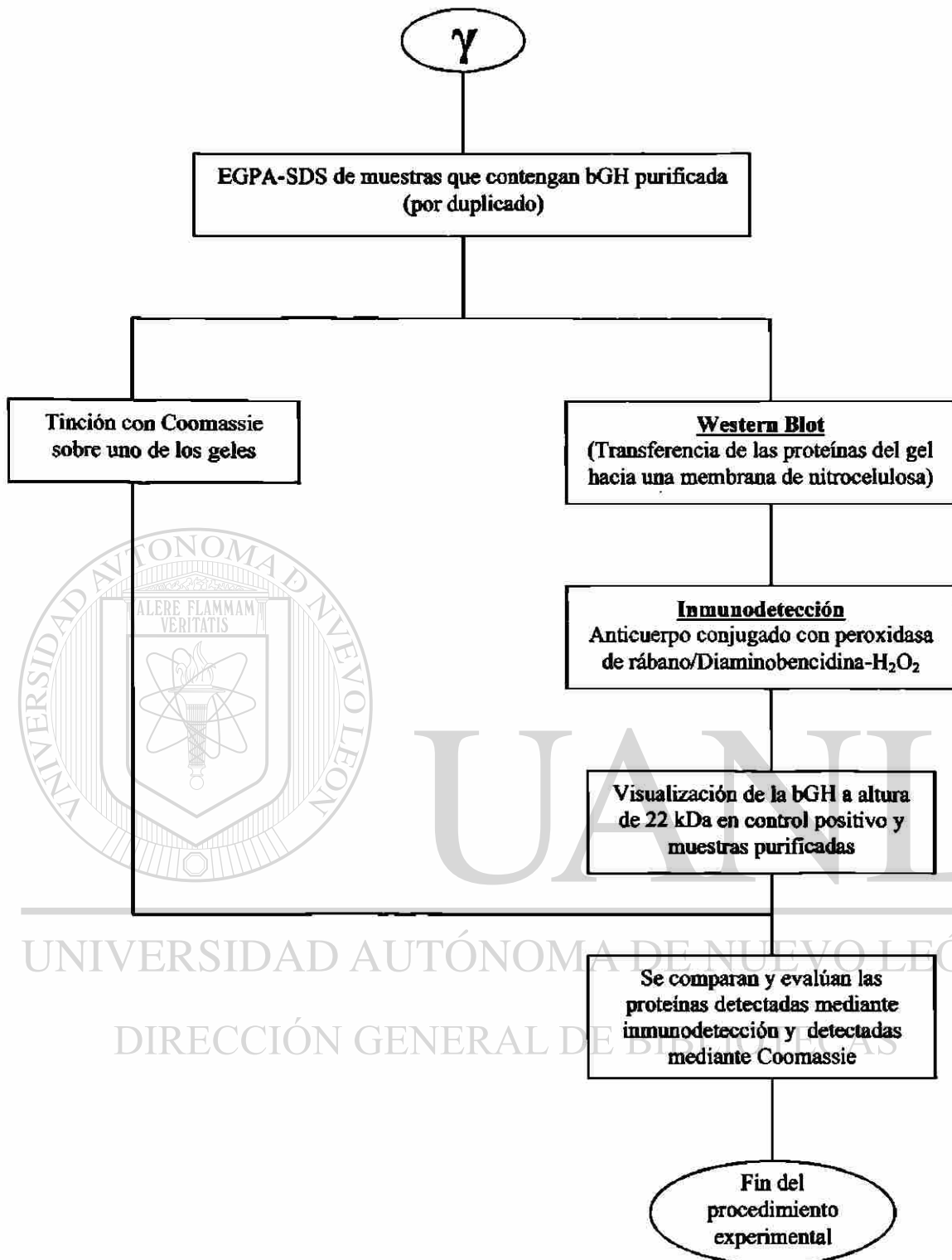
- 1. Evaluar la eficiencia de purificación de la técnica de cromatografía de intercambio aniónico como fase inicial del proceso de purificación.**
 - 2. Evaluar la eficiencia de purificación de la técnica de cromatografía de interacciones hidrofóbicas como fase intermedia del proceso de purificación.**
 - 3. Evaluar la eficiencia de purificación de la técnica de cromatografía de exclusión molecular como fase final del proceso de purificación.**
-
- 4. Evaluar la pureza final de la hormona de crecimiento bovino por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.**
 - 5. Comprobar la identidad de la hormona de crecimiento bovino obtenida del esquema de purificación mediante Western Blot.**

CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ESQUEMA GENERAL DEL TRABAJO







3.2. MATERIALES

3.2.1. EQUIPO

A continuación se presenta la lista del equipo que se empleó para la realización de este trabajo:

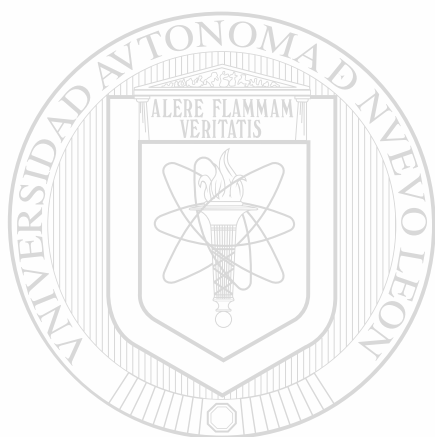
- Bomba peristáltica Dynamax® RP-1.
(Rainin Instrument Co., Emeryville, CA, EUA)
- Cámara de electroforesis Mini-PROTEAN® 3.
(Bio-Rad Laboratorios, Inc., Hercules, CA, EUA)
- Centrifuga 5415C.
(Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania)
- Espectrofotómetro Biophotometer.
(Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania)
- Fuente de poder BRL modelo 500.
(Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA)
- Agitador mecánico Orbit modelo 3540.
(Barnstead International, Dubuque, IO, EUA)
- Incubadora de agitación oscilatoria R76.
(New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA)
- Centrifugadora Beckman Allegra J2-M1.
(Beckman-Coulter, Inc., Fullert, CA, EUA)
- Campana de flujo laminar, Protector Laboratory Hood.
(Labconco Corp., Kansas City, MI, EUA)
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución: 600 Controller,
717 Autosampler, 996 Photodiode Array Detector.
(Waters Corp., Milford, MA, EUA)
- Termoagitador Cinarec 2 Thermolyne.
(Barnstead Internacional, Dubuque, IO, EUA)

3.2.2. MATERIAL

Dentro de los materiales utilizados, se encuentran:

- Columna Poly-Prep® de 9 cm.
(Bio-Rad Laboratorios, Inc., Hercules, CA, EUA)
- Columna Econo-Column® de 20 cm.
(Bio-Rad Laboratorios, Inc., Hercules, CA, EUA)
- Pipetas Research® modelos:
0.5-10µL, 2-20µL, 10-100µL, 100-1000µL
(Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania)
- Tubos de polipropileno para centrifugar con capacidad de 50 mL.
(Corning Incorporated, Acton, MA, EUA)
- Tubos de polipropileno para centrifugar con capacidad de 15 mL.
(Corning Incorporated, Acton, MA, EUA)
- Microtubos de polipropileno para centrifugar con capacidad de
0.6, 1.5, 2 mL.
(Cel Associates Inc., Pearland, TX, EUA)
- Pipetas serológicas de vidrio de 5 y 10 mL.
(Corning Incorporated, Acton, MA, EUA)
- Celdas de plástico para biofotómetro UVette® de 2 mL.
(Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania)
- Reservorios de vidrio Pyrex® de 1 L, 500 mL y 250 mL.
(Corning Incorporated, Acton, MA, EUA)
- Pizeta de plástico.
(Corning Incorporated, Acton, MA, EUA)
- Sistema de microfiltración de vidrio Fisherbrand®.
(Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EUA)
- Matraces Erlen-Meyer Pyrex® de 250, 500 y 1000 mL.
(Corning Incorporated, Acton, MA, EUA)
- Asa bacteriológica.
(Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EUA)
- Jeringas de plástico Plastipak de 3 y 10 mL.
(Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA)

- Acrodiscos de 0.22 y 0.45 μm .
(Waters Corp., Milford, MA, EUA)
- Microfiltros Whatman de 0.22 y 0.45 μm .
(Waters Corp. Milford, MA, EUA)
- Membrana de diálisis con corte de 12 kDa
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
- Membrana de nitrocelulosa para Western blot
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.2.3. REACTIVOS

Lista de reactivos que se utilizaron para desarrollar la parte experimental:

- Metanol absoluto grado ACS [67-56-1]. CH₃OH
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
- Ácido acético glacial grado ACS [64-19-7]. CH₃CH₂COOH
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
- Ácido clorhídrico grado ACS [7617-01-0]. HCl
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
- Cloroformo grado ACS [67-66-3]. CHCl₃
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
- Glicerol grado ACS [56-81-5]. C₃H₅(OH)₃
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
- Fosfato de potasio dibásico anhidro grado ACS [7758-11-4]. K₂HPO₄
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
- Fosfato de potasio monobásico anhidro grado ACS [7778-77-0]. KH₂PO₄
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
- Sulfato de amonio grado Biología Molecular [7783-20-2]. (NH₄)₂SO₄
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)

- Fosfato de sodio dibásico anhidro 99% [7558-79-4]. Na₂HPO₄
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
- Fosfato de sodio monobásico anhidro 99% [7558-80-7]. NaH₂PO₄
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
- Carbonato de sodio grado ACS [497-19-8]. Na₂CO₃
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
- Dicromato de potasio 99.5% [7778-50-9]. K₂Cr₂O₇
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
- Nitrato de plata grado ACS [7761-88-8]. AgNO₃
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
- N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) 99% [110-18-9]. C₆H₁₆N₂
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
- Persulfato de amonio grado Biología Molecular [7727-54-0]. (NH₄)₂S₂O₈
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)

- Azul de bromofenol grado Biología Molecular [62625-28-9]- $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
 - EDTA 99+% sal disódica dihidratada [6381-92-6]- $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
 - Cloruro de sodio grado Biología Molecular [7647-14-5]- NaCl
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
 - Glicina 99% [56-40-6]- $C_2H_5NO_2$
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
 - Biotina (Vitamina H) 99% [58-85-5]- $C_{10}H_{16}N_2O_3S$
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
 - Dodecil sulfato de sodio (SDS). $C_{12}H_{26}O_4S$
(Pierce Chemical Co., Rockford, Il, EUA)
 - Tris base ultrapura grado Biología Molecular [77-86-1]- $C_4H_{11}NO_3$
(US Biological, Swampscott, MA, EUA)
 - Coomasie Brilliant Blue R. $C_{26}H_{19}N_3O_{10}S_3$
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
 - β -Mercaptoetanol grado Biología Molecular [60-24-2]- C_2H_6OS
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
 - Peróxido de Hidrógeno 30% [7722-84-1] H_2O_2
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
-
- Acrilamida/Bisacilamida 30%. $C_3H_5NO/C_7H_{10}N_2O_2$
(Bio-Rad Laboratorios, Inc., Hercules, CA, EUA)
 - Albúmina bovina Fracción V 96% [9048-46-8].
(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)
 - Extracto de levadura.
(Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA)
 - Bacto peptona.
(Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA)
 - Yeast Nitrogen Base.
(Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA)
 - Resina de intercambio aniónico Q-Sepharose fase flow.
(Amersham Biosciences, Suecia)
 - Resina de interacciones hidrofóbicas
Phenyl-Sepharose high performance.

(Amersham Biosciences, Sweden)

- Resina de exclusión molecular Sephacryl S-100 high resolution.

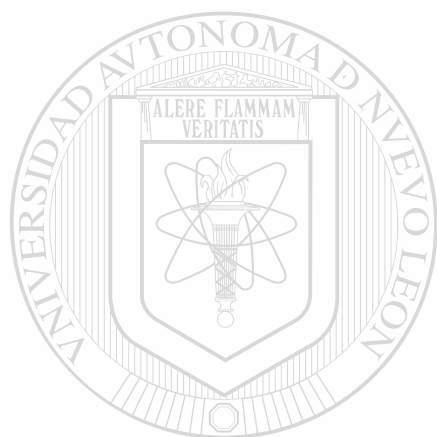
(Amersham Biosciences, Suecia)

- Coomassie® Plus protein assay reagent.

(Pierce Chemical Co., Rockford, Il, EUA)

- Diaminobencidina.

(Research Organics Inc., Cleveland, OH, EUA)



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.3. MÉTODOS

3.3.1. PURIFICACIÓN DE LA bGH

El esquema de purificación se desarrolló partiendo de una muestra de fermentación a escala matraz de una cepa de *Pichia pastoris* productora de bGH construida previamente en el laboratorio (Gallardo, 1999), la cual fue dializada en membranas de celulosa de 12 kDa de corte (N° Catalogo D9402, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA.) frente a buffer de trabajo, el cual contenía Tris-HCl 20 mM, EDTA 0.2mM a pH 8. La alimentación de la columna con buffer y muestras se realizó a través de una bomba peristáltica (Rainin, Modelo RP-1) a flujo continuo de 0.5 ml/min.

El esquema de purificación empleado se describe a continuación:

3.3.2. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO

Se tomaron 912.8 ± 183 μg de proteína total como muestra inicial y se inyectaron a una columna Poly-Prep[®] marca Bio-Rad[®] de 9 cm empacada con una resina de intercambio aniónico fuerte (Q-Sepharose fast flow; Amersham Biosciences, Suecia). Posteriormente, se realizó la elución de proteínas empleando distintas soluciones que consistían en buffer de trabajo más diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0, 400, 600, 800 y 1000 mM NaCl). Se recolectaron 10 mL de cada concentración de NaCl.

Para el análisis de la eficiencia del proceso se tomaron 500 μL de cada fracción recolectada y las proteínas se precipitaron con metanol-cloroformo, añadiendo 600 μL de metanol y 450 μL de cloroformo a 500 μL de la muestra. Se agitó suavemente por un minuto y la mezcla se centrifugó a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) por 5 minutos, en seguida se removió la fase superior cuidando de no perturbar la interfase, después se añadieron 450 μL más de metanol y la mezcla se agitó y centrifugó nuevamente. Se eliminó todo el líquido y la pastilla se secó en un equipo Savant de centrifugación al vacío por 15 minutos; posteriormente, la pastilla seca se resuspendió en 16 μL de buffer de muestra y se calentó a 95°C por 5 minutos. La muestra se analizó por electroforesis

en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (EGPA-SDS; Ausubel y cols., 1999). 100 μL de las muestras obtenidas de la cromatografía se emplearon para cuantificar proteínas totales por el método de Bradford (Bradford, 1976).

A través de la cromatografía de intercambio aniónico se recolectaron 116.3 ± 16 μg de bGHR en la fracción 0 mM de NaCl y para acondicionar la muestra para la siguiente cromatografía, a ésta se le adicionó una alta concentración (1000 mM) de sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$.

3.3.3. CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIONES HIDROFÓBICAS

La fracción 0 mM de NaCl que contenía 116.3 ± 16 μg de bGHR obtenida de la cromatografía de intercambio aniónico previamente acondicionada se inyectó a una columna empacada con resina tipo Phenyl-Sepharose high performance (Amersham Biosciences) de 1 mL de volumen de trabajo. Al terminar de pasar la muestra se inició la elución de la misma con un gradiente decreciente de sulfato de amonio disuelto en buffer de trabajo [1000, 800, 600, 400, 200 y 0 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]. Se recolectaron 10 mL de cada concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y las muestras se dializaron frente a Tris-HCl 20 mM por 24 horas, cambiando el buffer cada 6 horas. Al terminar la diálisis, se tomaron 400 μL de cada fracción y las proteínas se precipitaron con el método de metanol-cloroformo y se analizaron por EGPA-SDS (Ausubel y cols., 1999). También en este caso se tomaron 100 μL más de cada fracción recolectada para cuantificar proteínas totales por el método de Bradford (Bradford, 1976).

3.3.4. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECLAR

A partir de la cromatografía de interacciones hidrofóbicas se obtuvieron $64.8 \pm 18 \mu\text{g}$ de bGHR recolectados en la fracción 0 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, de los cuales, por limitaciones de la técnica fueron inyectados $14 \pm 3 \mu\text{g}$ en una columna Econo-Column[®] marca Bio-Rad[®] de 20 cm empacada con una resina de exclusión molecular (Sephacryl S-100 high resolution de Amersham Biosciences). La muestra inyectada entró a la resina por gravedad, después se adicionaron 200 μL de buffer de trabajo con una pipeta automática. Al tener un nivel adecuado de buffer por encima de la resina, se encendió la bomba peristáltica para iniciar la elución de las proteínas. La recolección de fracciones se realizó de manera manual, recolectando 1 mL por fracción, completando así 20 mL de elución con el buffer de trabajo.

Nuevamente al terminar el proceso se tomaron 400 μL de cada fracción y las proteínas se precipitaron con el método de metanol-cloroformo y se analizaron por EGPA-SDS (Ausubel y cols., 1999). Además se tomaron 100 μL para cuantificar proteínas totales por el método de Bradford (Bradford, 1976).

3.3.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

EN FASE REVERSA

La determinación de la pureza final del producto obtenido del esquema de purificación se realizó a través de un análisis de Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (CLAR-FR), en la cual se empleó un gradiente de acetonitrilo-agua reportado previamente por Mukhopadhyay y cols. (2002) como se describe a continuación:

Se estableció en el equipo un flujo de 1 mL/min y se dejó equilibrar durante 30 min. Las muestras a analizar se filtraron mediante un microfiltro de 0.22 μm de poro (Acrodisc[®] GHP, N^o Catalogo WAT200516, Waters Corp., Milford, MA, EUA) y se colocaron en el automuestreador del cromatógrafo, el cual se programó para realizar inyecciones de manera continua. La separación de la muestra se realizó empleando una columna C_{18} como fase estacionaria y una fase móvil de acetonitrilo grado CLAR, y

agua con ácido trifluoro acético al 0.1%, los cuales se filtraron a través de una membrana de 0.22 μm de poro.

El gradiente utilizado fue el siguiente:

Fase 1.- La separación inició con una mezcla 55:45% de acetonitrilo (ACN):agua y se llevó hasta una relación 75:25% en un periodo de 5 minutos.

Fase 2.- La mezcla 75:25% de ACN:agua, se llevó a un 100% de ACN en un periodo de 5 minutos.

Fase 3.- En un periodo de 20 minutos se llevo del 100 al 0% de ACN.

Fase 4.- Se restauró la mezcla inicial de 55:45% ACN:agua en un periodo de 5 minutos.

Lo anterior se realizó a temperatura ambiente y empleando una velocidad de flujo de 1 mL/min. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada muestra. Al término de las inyecciones se extrajeron los cromatogramas para ser analizados en el software Millennium[®] 32 (Waters).

3.3.6. WESTERN BLOT

(ENSAYO DE INMUNODETECCIÓN)

Se realizó una EGPA-SDS (Ausubel y cols., 1999) por duplicado de las muestras a analizar. Al terminar, uno de los geles se reveló de la manera descrita en la sección 3.4.1.2., mientras que el segundo gel se sumergió en buffer de transferencia (3.03 g de Tris-base, 14.4 g de glicina en 800 mL de agua destilada y 200 mL de metanol absoluto), al igual que la membrana de nitrocelulosa, los papeles filtro y las esponjas a utilizar durante 15 minutos. Posterior a esto, el casete de transferencia se colocó en la mesa teniendo cuidado de colocar el cátodo hacia arriba. Después se colocó una esponja de fibra en el casete, seguida de una hoja de papel filtro y la membrana de nitrocelulosa. El gel equilibrado se colocó sobre la membrana teniendo mucho cuidado de identificar los carriles en la membrana y de no dejar burbujas entre el gel y la membrana. En seguida se terminó de armar el casete al colocar el papel filtro y la esponja de fibra faltantes sobre el gel. El casete se cerró firmemente y se colocó en la cámara de transferencia y se

rellenó con buffer de transferencia. Se encendió la fuente a 250 A y se dejó correr durante 3 horas. Al terminar la transferencia, el gel se sometió a una tinción con Coomassie descrita en la sección 3.2.4.2., mientras que la membrana fue bloqueada con solución bloqueadora (0.9 g de leche descremada en 30 mL de solución de lavado: 500 mL de solución PBS con 500 μ L de Tween 20) durante dos horas a 37°C. Posteriormente, la membrana se limpió con solución de lavado durante 10 minutos por quintuplicado. Al término de los lavados, la membrana se incubó por 2 horas a temperatura ambiente con una dilución 1:1000 del suero hiperinmune anti-bGH con buffer diluyente (0.6 g de leche descremada en 60 mL de solución de lavado). Al transcurrir este tiempo, la membrana se limpió con la solución de lavado durante 10 minutos en cinco ocasiones. Después, la membrana se incubó durante dos horas a temperatura ambiente con una solución 1:10,000 del anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano en buffer diluyente. Al término de la incubación, la membrana se limpió 5 veces con solución de lavado durante 10 minutos cada uno. Para realizar el revelado, se mezclaron 30 mL de solución PBS, 15 mg de 3'3' diamino bencidina sobre la membrana y posteriormente se le añadieron 60 μ L de peróxido de hidrógeno al 30%. Para detener la reacción se empleó HCl 5N. La membrana revelada se guardó entre papel de celofán para ser digitalizadas en un escáner.

3.4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3.4.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (EGPA-SDS)

3.4.1.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK

A. Tris-HCl 1.5M, pH 8.8.

Se disolvieron 54.45 g de Tris base en 150 mL de agua destilada, luego se ajustó el pH con HCl, una vez ajustado el pH, se aforó a 300 mL.

B. Tris-HCl 0.5M, pH 6.8.

Se disolvieron 6 g de Tris base en 60 mL de agua destilada, luego se ajustó el pH con HCl, una vez ajustado el pH, se aforó a 100 mL.

C. SDS 10%.

Se disolvieron 10 g de dodecil sulfato de sodio en 100 mL de agua destilada.

D. Persulfato de amonio 10%.

100 mg de persulfato de amonio se disolvieron en 1 mL de agua destilada.

E. Buffer de muestra 2X.

Se mezclaron 1 mL de Tris-HCl 0.5M, 1.6 mL de glicerol, 1.6 mL de SDS 10%, 0.4 mL de β -mercaptoetanol y 0.4 mL de azul de bromofenol al 0.5%, además de 1 mL de agua destilada.

F. Buffer de corrida 5X.

Se disolvieron 15 g de Tris base, 72 g de glicina y 5 g de SDS en 1000 mL de agua destilada.

G. Solución de tinción.

Se disolvieron 0.25 g de Coomassie blue R en 90 mL de agua destilada, 90 mL de metanol y 20 mL de ácido acético glacial.

H. Solución de decoloración.

Se diluyeron 20 mL de metanol y 20 mL de ácido acético glacial en 160 mL de agua destilada.

3.4.1.2. PROCEDIMIENTO

Los vidrios previamente lavados con SDS al 1% y etanol fueron montados armando el sándwich en el preparador de geles. La preparación del gel separador (10 mL al 15%) se hizo mezclando 1.15 mL de agua destilada, 1.25 mL de Tris-HCl 1.5M, 2.5 mL de acrilamida al 30%, 50 μ L de SDS al 10%, 50 μ L de persulfato de amonio al 10% y 5 μ L de TEMED, agitando la mezcla y colocándola rápidamente dentro del

sándwich. A continuación se colocó 1 mL de isopropanol sobre el gel para evitar el contacto del gel con el aire y favorecer su polimerización. Al polimerizar, se preparó el gel concentrador (5 mL al 4%) mezclando 1.48 mL de agua destilada, 0.63 mL de Tris-HCl 0.5M, 0.33 mL de acrilamida al 30%, 25 μ L de SDS al 10%, 25 μ L de persulfato de amonio al 10% y 2.5 μ L de TEMED. Al terminar de mezclarlos, se colocó la solución en el sándwich hasta el tope para después colocar el peine y dejar polimerizando la solución. Al terminar la polimerización se retiró el peine y se montó el equipo Mini-protean[®] 3 (Bio-Rad Laboratorios, Inc., Hercules, CA, EUA.). Para preparar el buffer de corrida se diluyeron 100 mL de la solución 5X en 400 mL de agua destilada. La solución resultante se colocó en el equipo y a continuación se colocaron las muestras de interés en los posillos. La muestra se corrió a un voltaje inicial de 100 volts (v) durante su migración por el gel de concentración y luego a 190 v cuando cruzó al gel de separación. La fuente de poder se apagó justo después de que el colorante saliera del gel. De esta manera se prosiguió a desarmar el equipo y tefir el gel con la solución de tinción durante una hora. Al transcurrir este tiempo, se continuó con la decoloración del gel utilizando la solución de decoloración por dos horas, renovando la solución de decoloración cada media hora. Una vez desteñido el gel, éste se digitalizó empleando un escáner (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, EUA.) y se analizó por densitometría empleando el software Gel-Pro Analyzer 3.2 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, EUA.).

3.4.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES (ENSAYO DE BRADFORD)

Para la cuantificación de proteínas totales por medio del ensayo de Bradford (Bradford, 1976) se empleó un stock de Albúmina Sérica Bovina (BSA) a 200 µg/mL, con la cual se desarrolló una curva de calibración según el Cuadro 3, midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 600 nanómetros (nm). La gráfica obtenida responde a la ecuación tipo $y = m \ln(x) + b$, donde:

- y: Absorbancia de la muestra
- m: Pendiente de la gráfica
- x: Concentración de la muestra
- b: Intersección de la gráfica con el eje Y.

Cuadro 3. Preparación de estándares para la curva de calibración del ensayo de Bradford.

Stock BSA (µL)	Agua (µL)	Coomassie (µL)	Conc. Final BSA (µg)
0	100	100	0
0.5	99.5	100	0.1
3	97	100	0.6
15	85	100	3.0
30	70	100	6.0
45	55	100	9.0
60	40	100	12.0
75	25	100	15.0
90	10	100	18.0

Una vez establecida la curva de calibración, se prosiguió a cuantificar las muestras obtenidas del proceso de purificación mezclando 100 µL de muestra con 100 µL de reactivo de Coomassie e incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. El valor de la absorbancia obtenida se sustituye en la ecuación 3.1 para obtener el valor de la concentración de la muestra.

$$x = e [(y - b)/m] \quad (3.1)$$

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

1. IMPLEMENTACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS

La primera etapa consistió en determinar el comportamiento de la bGH comercial frente a las condiciones propuestas.

La Figura 1 muestra un gel representativo del comportamiento del estándar frente a la cromatografía de intercambio aniónico. En el carril 3 se aprecia que la hormona comercial no es retenida por la resina, al ser eluida bajo condiciones de nula concentración de NaCl (la cual es empleada para separar las proteínas unidas a la matriz), indicando con esto que la bGH muestra poca afinidad hacia la resina, debido a que no presenta una carga neta a pH 8, confirmando de esta manera su punto isoeléctrico teórico de 7.86 (ProtParam, <http://www.expasy.org/sprot/>).

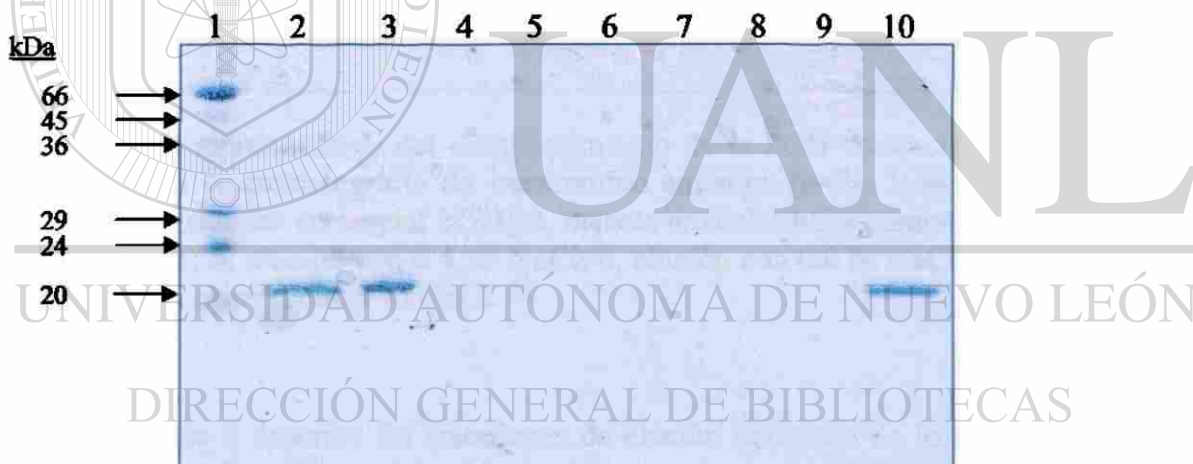


Figura 1. Gel representativo del comportamiento de la bGH estándar frente a la cromatografía de intercambio aniónico ($n=3$). 1, marcador de peso molecular; 2, bGH comercial antes de purificar; 3, elución con buffer de trabajo (BT); 4, elución con BT; 5, elución con 0.4 M NaCl; 6, elución con 0.6 M NaCl; 7, elución con 0.8 M NaCl; 8, elución con 1.0 M NaCl; 9, carril vacío; 10, estándar comercial bGH.

Un vez confirmado el comportamiento de la bGH comercial bajo las condiciones establecidas para este trabajo, se realizó una mezcla artificial de la bGH comercial y un extracto de fermentación de *Pichia pastoris* que no produce bGHr. La mezcla artificial se dejó incubando durante 24 horas tratando de simular las condiciones de fermentación. Al término de la incubación se le realizó a la mezcla una cromatografía de intercambio aniónico, dando como resultado el gel que se representa en la Figura 2. El carril 3

describe el mismo patrón en el comportamiento del estándar comercial de la bGH, el cual no es retenido por la resina frente a las condiciones de pH y concentración de buffer establecidas. Además se aprecia una co-elución de ciertas proteínas contaminantes de *Pichia pastoris*. Los carriles 5, 6, 7 y 8 muestran que las proteínas contaminantes son eluidas de la resina cuando se añaden distintas concentraciones de NaCl al buffer de trabajo, confirmando de esta manera que la cromatografía de intercambio aniónico como fase inicial de purificación resulta ser adecuada para eliminar el mayor porcentaje de contaminantes de la levadura *P. pastoris*.

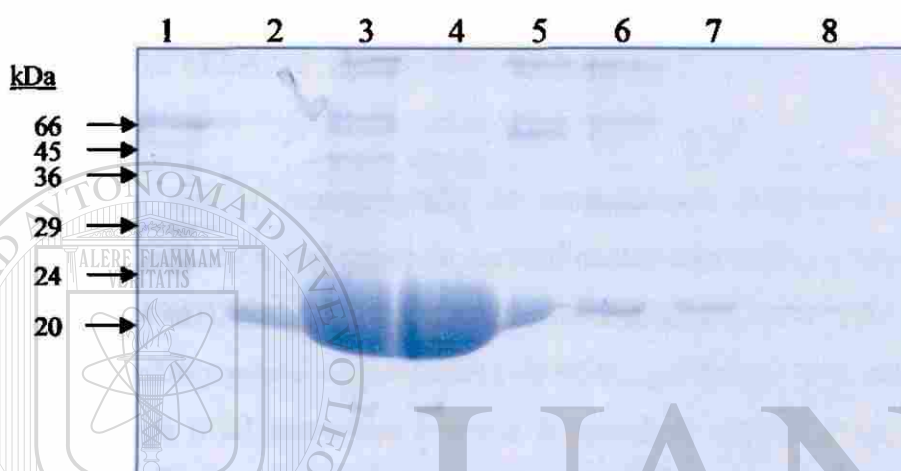


Figura 2. Gel representativo del comportamiento de la bGH comercial incubada con pPIC9 frente a la cromatografía de intercambio aniónico (n=3). 1, marcador de peso molecular; 2, estándar comercial bGH; 3, mezcla artificial bGH comercial + pPIC9; 4, elución con BT; 5, elución con 0.4 M NaCl; 6, elución con 0.6 M NaCl; 7, elución con 0.8 M NaCl; 8, elución con 1 M NaCl.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La Figura 3 describe las fracciones de elución obtenidas de la bGH comercial estándar cuando ésta es introducida a la cromatografía de interacciones hidrofóbicas. El carril 12 muestra que la bGH estándar es eluida al final del proceso cromatográfico bajo condiciones que favorecen la elución de proteínas con bajo carácter hidrofílico. Interesantemente, los carriles en los que fueron analizadas muestras provenientes de las cromatografías aparecieron bandas a una altura de 66 kDa correspondientes a falsos positivos.

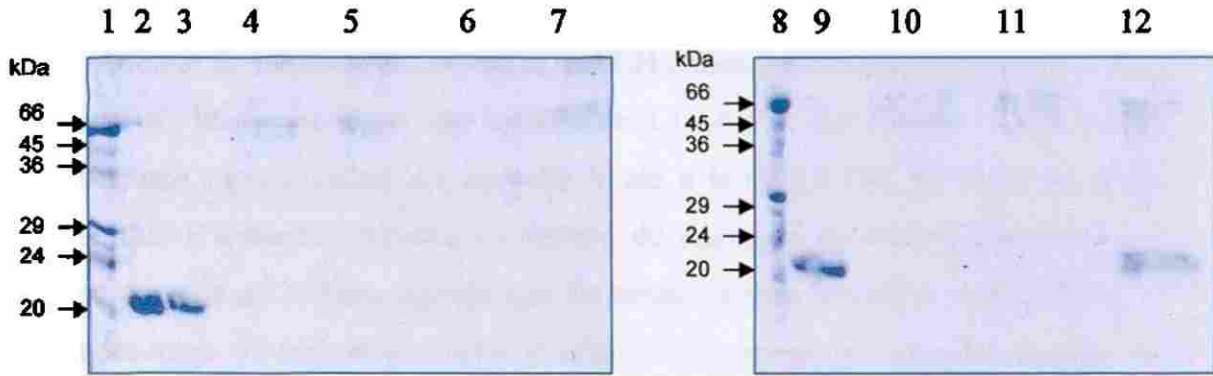


Figura 3. Gel representativo del comportamiento de la bGH comercial frente a la cromatografía de interacciones hidrofóbicas ($n=3$). 1, marcador de peso molecular; 2, estándar comercial bGH; 3, bGH comercial antes de purificar; 4, elución con BT; 5, elución con 1.0 M SA; 6, elución con 0.8 M SA; 7, elución con 0.6 M SA; 8, marcador de peso molecular; 9, estándar comercial bGH; 10, elución con 0.4 M SA; 11, elución con 0.2 M SA; 12, elución con 0 M SA.

Debido a que la cromatografía de interacciones hidrofóbicas es un paso intermedio de purificación y el grado de contaminantes esperados es muy pequeño (De Oliveria y cols., 1999), no se realizó la prueba de incubación de la bGH comercial con el extracto de *Pichia pastoris* no productora de bGH., por lo que se prosiguió a realizar el monitoreo de la bGH comercial frente a la resina de exclusión molecular. En la Figura 4, los carriles 6, 7 y 8 muestran que la bGH estándar presentó un rango en el tiempo de retención que va de los 16 a los 20 minutos.

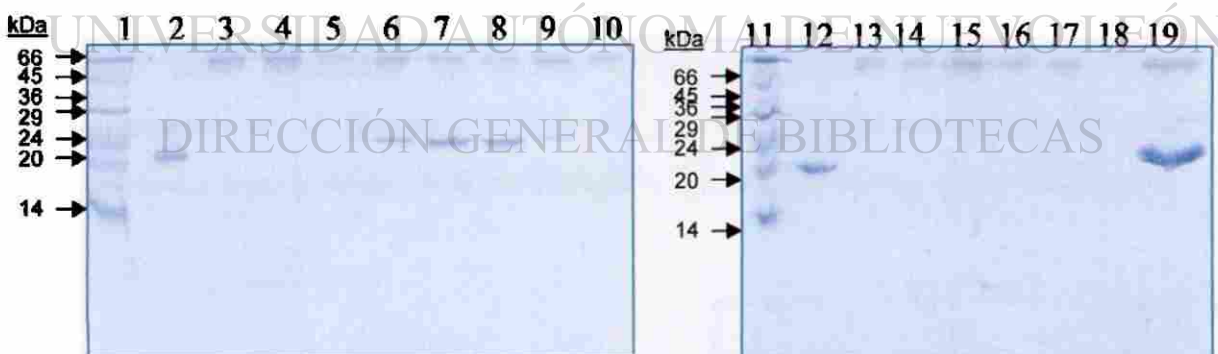


Figura 4. Gel representativo del comportamiento de la bGH estándar frente a la cromatografía de exclusión molecular ($n=3$). 1, marcador de peso molecular; 2, estándar comercial bGH; 3, elución a tiempo 10 min; 4, elución a tiempo 12 min; 5, elución a tiempo 14 min; 6, elución a tiempo 16 min; 7, elución a tiempo 18 min; 8, elución a tiempo 20 min; 9, elución a tiempo 22 min; 10, elución a tiempo 24 min; 11, marcador de peso molecular; 12, estándar comercial bGH; 13, elución a tiempo 26 min; 14, elución a tiempo 28 min; 15, elución a tiempo 30 min; 16, elución a tiempo 32 min; 17, elución a tiempo 34 min; 18, carril vacío; 19, bGH comercial antes de purificar.

Además de los ensayos anteriores, la bGH estándar correspondiente al carril 2 de la Figura 4, fue sometida a un análisis de CLAR-FR. La Figura 5 muestra un cromatograma representativo del estándar frente a la CLAR-FR, en donde se puede apreciar que el estándar presenta un tiempo de retención de 19.035 minutos a una longitud de onda de 280 nm, además que los contaminantes presentes se encuentran en cantidades traza. El cromatograma fue analizado en un rango de longitudes de onda que abarcó de 200 a 400 nm, encontrando que el pico obtenido a los 19.035 minutos correspondió a un solo compuesto por la inexistencia de traslape de picos correspondientes a otros compuestos, confirmando de esta manera la identidad del pico correspondiente a la bGH estándar.

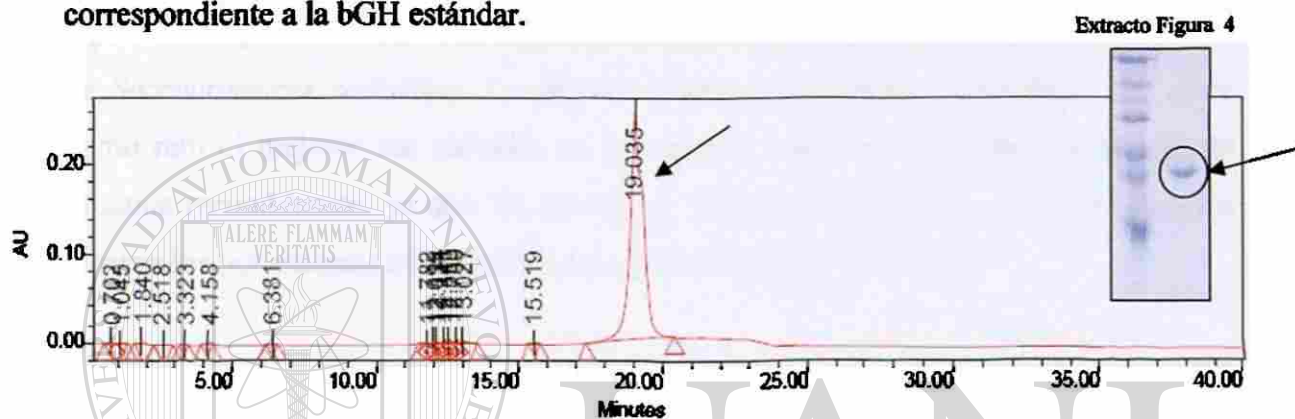


Figura 5. Cromatograma representativo del extracto de bGH comercial estándar frente a las condiciones establecidas por Mukhopadhyay y cols., 2002 para CLAR-FR (n=3).

La fracción correspondiente al analito de 19.035 minutos se recolectó y se reinyectó para corroborar su pureza, obteniendo como resultado un ligero desplazamiento en el tiempo de retención del analito principal y la elución de contaminantes traza al inicio de la cromatografía. Lo anterior se describe en la Figura 6.

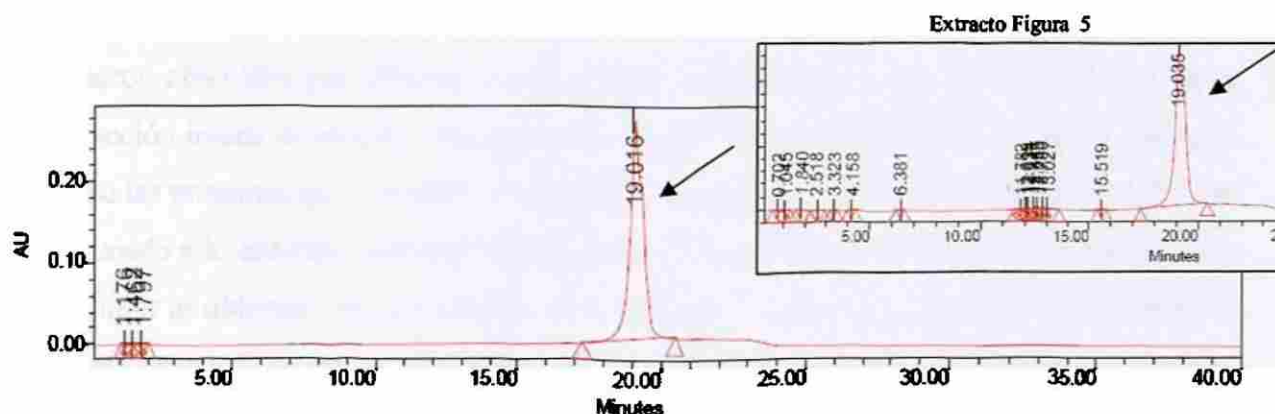


Figura 6. Cromatograma representativo de la reinyección del analito colectado a los 19.035 minutos de la separación del extracto de bGH comercial estándar frente a las condiciones establecidas por Mukhopadhyay y cols., 2002 para CLAR-FR (n=3).

2. ESQUEMA DE PURIFICACIÓN

La muestra inicial procedente de la diálisis del medio de fermentación de *Pichia pastoris* que expresa bGHR presentó una concentración de 130.4 ± 26.1 mg/L de proteínas totales, de los cuales 19.43 ± 2.7 mg/L correspondieron a bGHR, representando así el 15% de la muestra total. Ouyang y cols. (2004) reportaron una producción de 2000 mg/L de proteínas totales para la producción de GH porcina bajo las mismas condiciones de fermentación empleadas en este trabajo, añadiendo que la GHr porcina correspondió al 45% (900 mg/L) de la muestra total. Por otra parte, Jo y cols. (1996), reportaron la producción de 200 mg/L de GH porcina al emplear el sistema de expresión de *Saccharomyces cerevisiae*. Lo anterior muestra que nuestro laboratorio aun tiene como reto el mejorar sus métodos de producción para alcanzar mayores niveles de proteína recombinante, ya que los niveles de producción actuales, son menores a los alcanzados por sistemas de expresión eucarióticos de menor calidad.

La Figura 7 describe el comportamiento que presentó la muestra dializada (912.8 ± 182 μ g de proteínas totales; 135.5 ± 19 μ g de bGHR) frente a la cromatografía de intercambio aniónico. El carril 5 muestra que la bGHR fue eluida en la fase inicial del proceso, siendo similar al comportamiento de elución presentado por el estándar. Sin embargo, se observó que la bGHR mostró un patrón electroforético distinto al estándar, comportándose como una proteína cercana a los 25 kDa. Ciertas proteínas contaminantes fueron co-eluidas junto a la bGHR, presentando pesos moleculares aproximados de 18 y 27 kDa. Las demás proteínas de *P. pastoris* fueron eluidas de la resina cuando se elevó la concentración de NaCl iniciando su elución a partir de 400 mM de NaCl, como puede observarse en los carriles 7, 8 y 9. Resultados análogos fueron obtenidos por Ouyang y cols. (2004) quienes obtuvieron la GHr porcina en la fracción inicial de elución, correspondiente a una concentración 0 M de NaCl, mientras que las proteínas de *P. pastoris* eluyeron a concentraciones de NaCl superiores a 0.1 M. Aunado a lo anterior, reportaron haber obtenido una GHr de peso molecular de 25 kDa, similar al obtenido en este estudio. Sin embargo, a través de los análisis realizados de espectrometría de masas, isoelectroenfoque y digestión con enzimas de desglucosilación, no lograron explicar el motivo de la diferencia que presentó la GHr porcina en la migración electroforética.

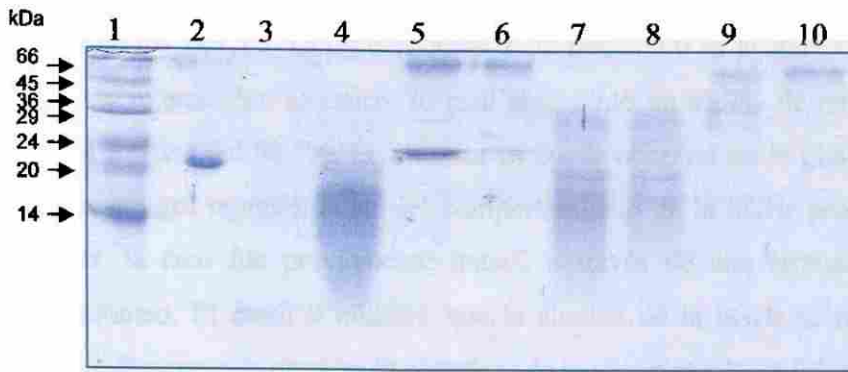


Figura 7. Gel representativo del comportamiento de la muestra dializada del medio de fermentación de *P. pastoris* que expresa bGHr frente a la cromatografía de intercambio aniónico (n=12). 1, marcador de peso molecular; 2, estándar comercial de bGH; 3, carril vacío; 4, muestra dializada de fermentación de bGH; 5, elución con BT; 6, Elución con BT; 7, Elución con 0.4 M de NaCl; 8, Elución con 0.6 M de NaCl; 9, Elución con 0.8 M de NaCl; 10, Elución con 1.0 M de NaCl.

La técnica de cromatografía de intercambio aniónico presentó un 85.8% de recuperación al recobrar $116.3 \pm 16 \mu\text{g}$ de los $135.5 \pm 19 \mu\text{g}$ de bGHr que fueron inyectados, registrando a su vez un porcentaje de pureza aproximado de la bGH del 91.6%. Ouyang *y cols.* (2004) reportaron un 71% de recuperación y un 95% de pureza de GH porcina empleando esta técnica. De igual manera, Becker y Hsiung citados por Ribela *y cols.* (2003) reportaron haber obtenido un porcentaje de pureza del 90% y un porcentaje de recuperación del 71% para la hGHr producida por *Escherichia coli*, empleando condiciones similares. Por otra parte, existen diversos reportes del empleo de la cromatografía de intercambio aniónico para la purificación de proteínas recombinantes expresadas por *Pichia pastoris*, que muestran como resultado un alto porcentaje de pureza, entre los cuales se encuentran Zhang *y cols.* (2004), quienes purificaron inulinasa en un 95% obteniendo un porcentaje de recuperación del 11%; Mizutani *y cols.* (2004) obtuvieron un 98% de pureza para la ovotransferrina, reportando un 58% de recuperación; Senerovic *y cols.* (2005) reportaron la obtención de un 96% de recuperación para la proteína penicilina G acilasa, con un porcentaje de pureza superior al 98%, todos ellos empleando a la cromatografía de intercambio aniónico como único paso cromatográfico. Con lo anterior, se confirma la gran utilidad que tiene la cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose) para semi-purificar de manera rápida, sencilla y con altos porcentajes de recuperación a la bGHr.

En la cromatografía de interacciones hidrofóbicas se lograron recuperar $64.8 \pm 18 \mu\text{g}$ de bGH de los $103.5 \pm 15 \mu\text{g}$ derivados de la fracción 0 M acondicionada de la cromatografía de intercambio aniónico, lo cual representó un 62.7% de recuperación, con una pureza relativa del 98.5%. Lo anterior se puede observar en la Figura 8, en la cual se muestra un gel representativo del comportamiento de la bGHR producida por *Pichia pastoris*, la cual fue previamente tratada a través de una cromatografía de intercambio aniónico. El carril 9 muestra que la elución de la bGHR se realizó bajo condiciones que favorecen la elución de proteínas de bajo carácter hidrofílico, similar al patrón obtenido por la bGH estándar mostrado anteriormente en la Figura 3.



Figura 8. Gel representativo de la cromatografía de interacciones hidrofóbicas de la muestra proveniente de la fracción 0M de intercambio aniónico ($n=12$). 1, marcador de peso molecular; 2, estándar comercial de bGH; 3, fracción 0M proveniente de intercambio aniónico; 4, elución con 1.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5, elución con 0.8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 6, elución con 0.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 7, elución con 0.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 8, elución con 0.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 9, elución con 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Resultados similares a los obtenidos en el presente estudio han sido reportados por otros grupos de investigación. Lefort y Ferrara (1986) reportaron que el empleo de la resina Phenyl-Sepharose, llevó a un porcentaje de recuperación del 28% de la hGHR producida en células de riñón de mono, con un porcentaje de pureza del 100%, cuando se combinaba con las cromatografías de intercambio aniónico como fase intermedia y de exclusión molecular como fase final en el esquema de purificación. De igual manera, De Oliveira y cols. (1999) reportaron que el empleo de la resina Phenyl-Sepharose como fase final en el esquema de purificación para la hGHR producida por *Escherichia coli* consiguió un 43% de recuperación y un 99% de pureza. Por otra parte, Damasceno y cols. (2004) obtuvieron un 25% de recuperación junto con un 90% de pureza para los anticuerpos A33scFv, empleando para la cromatografía de interacciones hidrofóbicas la

resina tipo Phenyl-Sepharose como fase intermedia de purificación. El alto grado de pureza alcanzado a través de esta cromatografía, junto con los reportes anteriormente mencionados, demuestran la utilidad que tiene la cromatografía de interacciones hidrofóbicas (Phenyl-Sepharose) para elevar en un alto nivel de pureza a la bGHr, presentando el inconveniente de obtener bajos porcentajes de recuperación.

Debido a las limitaciones en la capacidad de la columna empleada para la cromatografía de exclusión molecular, solamente fueron inyectados $14.0 \pm 3 \mu\text{g}$ de bGHr, de los cuales $13.7 \pm 5 \mu\text{g}$ (97.4%) fueron recuperados al final de la cromatografía con una pureza relativa de 99.5%. La Figura 9 presenta el comportamiento de la bGHr a través de la cromatografía de exclusión molecular, confirmando a través de los carriles 6, 7 y 8, el rango en el tiempo de retención presentado por la bGH comercial estándar (16 a 20 minutos).

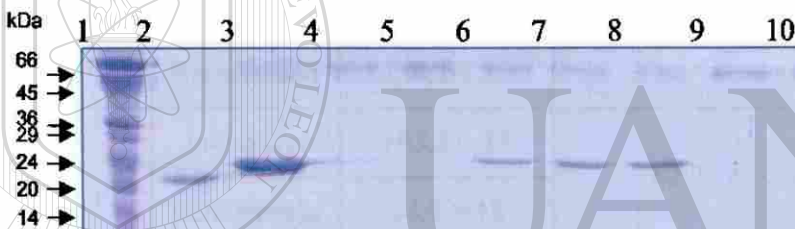


Figura 9. Gel representativo del comportamiento de la bGH recombinante proveniente de la cromatografía de hidrofobicidad frente a la cromatografía de exclusión molecular ($n=12$). 1, marcador de peso molecular; 2, estándar comercial de bGH; 3, fracción 0M proveniente de interacciones hidrofóbicas; 4, elución a 12 min; 5, elución a 14 min; 6, elución a 16 min; 7, elución a 18 min; 8, elución a 20 min; 9, elución a 22 min; 10, elución a 24 min.

Nuestros resultados son comparables a los obtenidos por Flodh y cols. (1986) quienes elevaron la pureza de la hGHr de un 85% a un 100%, a partir de una muestra semi-purificada a través de una resina de intercambio aniónico débil (DEAE-Sepharose). Ellos reportaron para este paso cromatográfico un porcentaje de recuperación del 89%. De igual manera, el grupo de investigación de Olson y cols. (1981) reportaron que el empleo de la cromatografía de exclusión molecular llevó a un 98% de pureza de hGHr a una muestra procedente de una semi-purificación a través de una combinación de

cromatografías de intercambio aniónico e intercambio catiónico. Además de esto, otras proteínas expresadas bajo el sistema de expresión de *Pichia pastoris* han sido purificadas con la cromatografía de exclusión molecular como fase de pulido en el proceso de purificación, ejemplo de esto son Fierens y cols. (2004), quienes purificaron la proteína inhibidora de xilanasas I en un 95% con un rendimiento de recuperación cercano al 50%. Liu y cols. (2001) purificaron en un 99% al interferón α -1 humano con un porcentaje de recuperación superior al 80%.

El Cuadro 4 muestra la pureza relativa y el porcentaje de recuperación total alcanzados al final del proceso de purificación.

Cuadro 4. Resultados del esquema de purificación.

Fase de purificación		μg de bGHr	% Recuperación	% Pureza
CIA	Inyección	135.5 ± 19	85.8	91.6
	Recolección	116.3 ± 16		
CIH	Inyección	103.5 ± 15	62.7	98.5
	Recolección	64.8 ± 18		
CEM	Inyección	14.0 ± 3	97.4	99.5
	Recolección	13.7 ± 5		
% Recuperación Total			52.4	

La Figura 10 muestra el cromatograma del análisis de la bGHr obtenida al final del proceso de purificación por CLAR-FR. La bGHr mostró un tiempo de retención similar al obtenido por la bGH estándar (19.056 minutos contra 19.035 minutos presentados por la bGH estándar), validando de esta manera la identidad de la proteína.

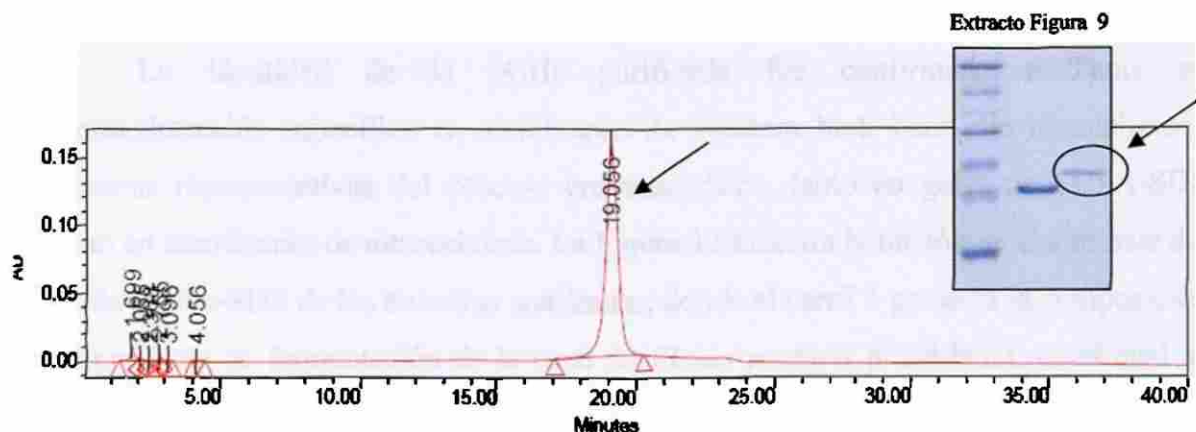


Figura 10. Cromatograma representativo de la bGHr obtenida al final del proceso de purificación frente a la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (n=3).

La fracción correspondiente al analito de 19.056 minutos se recolectó y se inyectó nuevamente para corroborar su pureza, resultando con esto el cromatograma presentado en la Figura 11, donde se aprecia una eliminación completa de las contaminantes trazas.

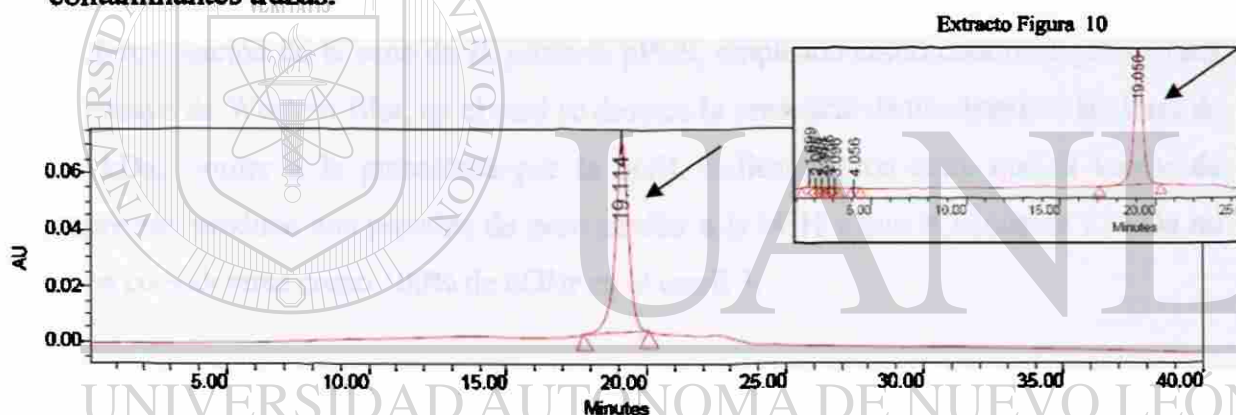


Figura 11. Cromatograma representativo de la reinyección del analito colectado a los 19.056 minutos de la separación de la bGHr obtenida al final del proceso de purificación frente a CLAR-FR (n=3).

Otros grupos de investigación han empleado esta metodología para confirmar el grado de pureza obtenido a través de sus procesos de purificación, entre los cuales se encuentran Koganesawa y cols. (2002), quienes aislaron y purificaron la citosina bloqueadora de crecimiento y Paus y cols. (2002) que expresaron y purificaron la endotoxina neutralizante producida por *Pichia pastoris*. Mukhopadhyay y cols. (2002) encontraron que CLAR-FR además de confirmar la pureza de distintas preparaciones de GHs, fue capaz de identificar el estado oxidativo que presentaron las GHs analizadas.

La identidad de la bGhr purificada fue confirmada mediante su inmunodetección específica en membranas de Western blot. Para ello se analizaron muestras representativas del proceso cromatográfico, tanto en geles de EGPA-SDS como en membranas de nitrocelulosa. La Figura 12 muestra la tinción de Coomassie del gel de EGPA-SDS de las muestras analizadas, donde el carril 3 presenta la composición del producto de fermentación de la cepa de *Pichia pastoris* pPic9-bGH, en el cual se aprecia una proteína de 22 kDa correspondiente a la bGH y más de 20 proteínas contaminantes. El carril 4 muestra el producto de la elución 0M de NaCl obtenido de la cromatografía de intercambio aniónico, en el cual se destaca la presencia de la bGhr con escasas proteínas contaminantes de alto peso molecular. En el carril 5 se observa la banda de la bGhr obtenida de la fracción 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de la cromatografía de interacciones hidrofóbicas. En el carril 6 se aprecia un aumento en la intensidad de banda de la bGhr debido a la al efecto de concentración de la muestra por parte de la cromatografía de exclusión molecular. El carril 8 presenta la composición del producto de fermentación de la cepa de *P. pastoris* pPic9, empleado como control negativo para el ensayo de Western Blot, en el cual se destaca la presencia de una banda a la altura de 22 kDa, similar a la presentada por la bGH, indicando con esto, que el vector de expresión produce una proteína de peso similar a la bGH y que la banda de 22 kDa no debe considerarse como 100% de bGhr en el carril 3.

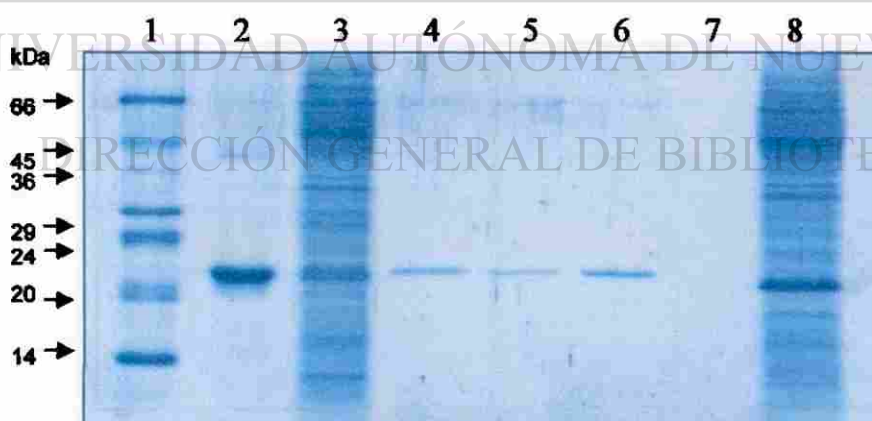


Figura 12. Gel de muestras procesadas en Western Blot: 1, marcador de peso molecular; 2, estándar comercial de bGH; 3, Muestra de fermentación de bGH sin purificar; 4, fracción 0M de NaCl obtenida de la cromatografía de intercambio aniónico; 5, fracción 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ obtenida de la cromatografía de interacciones hidrofóbicas; 6, elución a los 18 minutos obtenida de la cromatografía de exclusión molecular; 7, carril vacío; 8, fermentado de pPic9 como control negativo.

La Figura 13 presenta la inmunodetección de la bGHR con anticuerpos policlonales anti-bGH, en el cual, el carril 2 muestra la reactividad de los anticuerpos frente a la bGH comercial. En el carril 3 se observa la presencia de la bGHR a la altura de 22 kDa, además de la presencia de posibles dímeros, trímeros y algunas bandas intermedias debido probablemente a la interacción de la bGHR con algunas proteínas de *Pichia pastoris*. El carril 4 muestra la presencia de la bGHR obtenida a partir de la elución con 0M de NaCl de la cromatografía de intercambio aniónico, demostrando la pureza y la integridad del producto obtenido. En el carril 5 se observa la presencia de la banda correspondiente al monómero de bGHR obtenida de la fracción 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de la cromatografía de interacciones hidrofóbicas. El carril 6 confirma el aumento en la intensidad de banda correspondiente a la bGHR como parte del proceso de la cromatografía de exclusión molecular. El carril 8 fue empleado como control negativo, en el cual se demuestra que la proteína de peso similar a la bGHR propia del vector de expresión no presenta reactividad frente a los anticuerpos anti-bGH, con lo que se descarta la posibilidad de que en el vector de expresión se encuentre la inserción del casete del gen de la bGH. Sin embargo, se muestra reacción frente a proteínas de alto peso molecular observadas también en la muestra de fermentación sin purificar (carril 3). Esto pudiera ser debido a reacciones inespecíficas del anticuerpo policlonal.

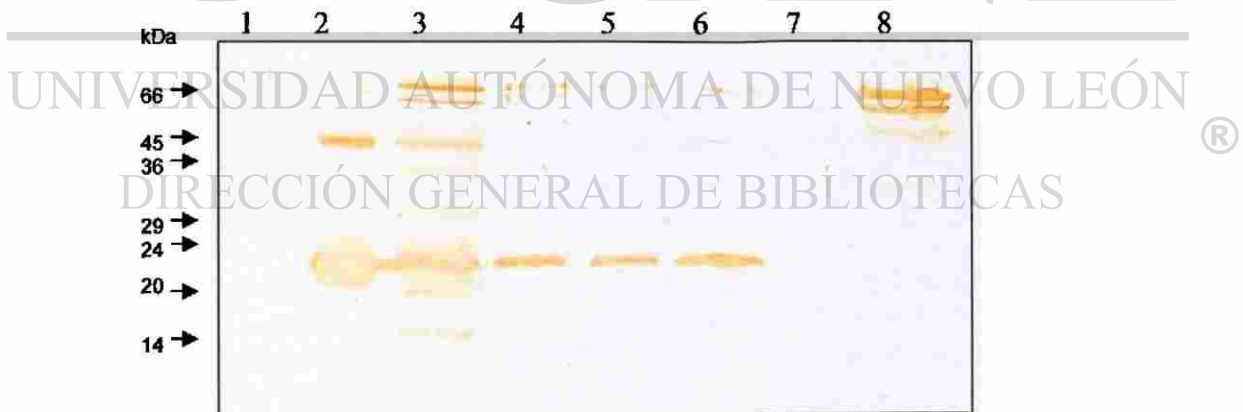


Figura 13. Western Blot de muestras representativas del proceso de purificación: 1, marcador de peso molecular; 2, estándar comercial de bGH; 3, Muestra de fermentación de bGH sin purificar; 4, fracción 0M de NaCl obtenida de la cromatografía de intercambio aniónico; 5, fracción 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ obtenida de la cromatografía de interacciones hidrofóbicas; 6, elución a los 18 minutos obtenida de la cromatografía de exclusión molecular; 7, carril vacío; 8, fermentado de pPic9 como control negativo.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

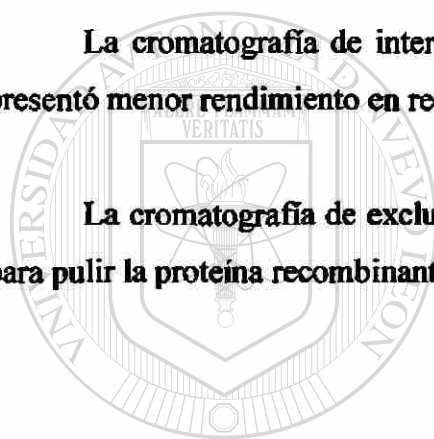
De los resultados encontrados en el presente trabajo se puede concluir lo siguiente:

El esquema de purificación desarrollado confirmó ser muy efectivo al registrar una pureza relativa del 99.5% para la bGhr producida por *Pichia pastoris*, presentando una eficiencia de recuperación del 52%.

La cromatografía de intercambio aniónico resultó ser una técnica inicial adecuada para semi-purificar de manera rápida y sencilla a la bGhr.

La cromatografía de interacciones hidrofóbicas fue la fase cromatográfica que presentó menor rendimiento en recuperación.

La cromatografía de exclusión molecular confirmó ser una cromatografía eficaz para pulir la proteína recombinante en el proceso de purificación.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed, H. (2005). *Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization*. CRC Press LCC. E.U.A.

Amersham Biosciences. (2001). *Protein purification handbook*. Snits & design AB. Uppsala, Suecia.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J.G., Smith, J. A., y Struhl, K. (1999). *Short Protocols in Molecular Biology*. Fourth ed., Wiley, Massachussets, USA.

Barbier, G. G., Joshi, R. C., Campbell, E. R. y Campbell, W. H. (2004). *Purification and biochemical characterization of simplified eukaryotic nitrate reductase expressed in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 37:61–71.

Barral, P., Batanero, E., Villalba, M. y Rodríguez, R. (2005). *Expression of the major olive pollen allergen Ole e 10 in the yeast Pichia pastoris: Evidence of post-translational modifications*. Prot. Express. Purif. 44:147–154.

Barrera-Saldaña, H. A. (1992). *Información genética: estructura, función y manipulación*. CONACYT, Colección Ciencia Básica. México.

Barrera-Saldaña, H. A., Rodríguez, I. P., Sánchez, C. N., Pérez, A. A., Ascasio, J. A. y Padilla, G. (2004). *La producción de hormonas del crecimiento por técnicas de ingeniería genética; su utilización en los sectores de la salud y pecuaria*. En "Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna" (Francisco Bolívar Zapata, Editor). CONACYT. Pp. 373-390.

Baumgartner, P., Harper, K., Raemaekers, R., Durieux, A., Gatehouse, A., Davies, H. y Taylor, M. A. (2003). *Large-scale production and purification of recombinant Galanthus nivalis agglutinin (GNA) expressed in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. Biotechnology Letters 25:1281–1285.

Beaulieu, L., Groleau, D., Miguez, C. B., Jetté, J. F., Aomari, H. y Subirade, M. (2005). *Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast Pichia pastoris reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material*. Prot. Express. Purif. 43:111–125.

Bisht, H., Chugh, D. A., Swaminathan, S. y Khanna, N. (2001). *Expression and purification of Dengue Virus type 2 envelope protein as a fusion with Hepatitis B surface antigen in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 23:84–96.

Bradford, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 72:248.

Chantasigh, D., Pootanakit, K., Champreda, V., Kanokratana, P. y Eurwilaichitr, L. (2005). *Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from Aspergillus terreus (BCC129) in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. (Aceptado para su publicación).

Chen, Y. H., Chang, T. C. y Chang, G. G. (2004). *Functional expression, purification, and characterization of the extra stable human placental alkaline phosphatase in the Pichia pastoris system*. Prot. Express. Purif. 36:90–99.

Damasceno, L. M., Pla, I., Chang, H. J., Cohen, L., Ritter, G., Old, L. J., y Batt, C. A. (2004). *An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 37:18–26.

Damaso, M. C., Almeida, M. S., Kurtenbach, E., Martins, O. B., Pereira, N., Andrade, C. y Albano, R. (2003). *Optimized expression of a thermostable xylanase from Thermomyces lanuginosus in Pichia pastoris*. Appl. Environ. Micro. 69(10):6064–6072.

De Oliveira, J. E., Soares, C. R. J., Peroni, C. N., Gimbo, E., Camargo, I. M. C., Morganti, L., Bellini, M. H., Affonso, R., Arkaten, R. R., Bartolini, P. y Ribela, M. T. (1999). *High-yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in Escherichia coli periplasmic space*. J. of Chromatography A. 852(2):441–450.

Fierens, K., Geudens, N., Brijs, K., Courtin, C. M., Gebruers, K., Robben, J., Campenhout, S., Volckaert, G. y Delcoura, J. A. (2004). *High-level expression, purification, and characterization of recombinant wheat xylanase inhibitor TAXI-I secreted by the yeast Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 37:39–46.

Flodh, H. (1986). *Human growth hormone produced with recombinant DNA technology: development and production*. Acta Paediatr. Scand. Suppl. 325:1-9.

Gadkari, R., Deshpande, R. y Dighe, R. R. (2003). *Hyperexpression and purification of biologically active human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin using the methylotropic yeast, Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 32:175–184.

Gallardo-Blanco, H. L. (1999). *Construcción de cepas de Pichia pastoris portadoras del DNAc de la hormona de crecimiento bovino*. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, U.A.N.L. Monterrey, N. L., México.

Hu, Y., Meng, X. L., Xu, J. P., Lu, W. y Wang, J. (2005). *Cloning and expression of earthworm fibrinolytic enzyme PM₂₄₆ in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 43:18–25.

Ito, K. y Matsudomi, N. (2005). *Structural characteristics of Hen egg ovalbumin expressed in yeast Pichia pastoris*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69(4):755–761.

Jo, J. M., Lee, T. H., Jeong, H. H., Lee, Y. B., Lee, T. G., Park, Y. W. y Han, K. B. (1996). *Method for the production of porcine growth hormone using a synthetic gene in yeast cells*. United States patent 5,541,086.

Juge, N., Williamson, G., Puigserver, A., Cummings, N. J., Connerton, I. F. y Faulds, C. B. (2001). *High-level production of recombinant Aspergillus niger cinnamoyl esterase (FAEA) in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. FEMS Yeast Research 1:127-132.

Kataoka, K., Tanaka, K., Sakai, Y. y Sakurai, T. (2005). *High-level expression of Myrothecium verrucaria bilirubin oxidase in Pichia pastoris, and its facile purification and characterization*. Prot. Express. Purif. 41:77-83.

Koganesawa, N., Aizawa, T., Shimojo, H., Miura, K., Ohnishi, A., Demura, M., Hayakawa, Y., Nitta, K. y Kawanob, K. (2002). *Expression and purification of a small cytokine growth-blocking peptide from armyworm Pseudaletia separate by an optimized fermentation method using the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 25:416-425.

Kooij, A., Middel, J., Jakab, F., Elfferich, P., Koedijk, D., Feijlbrief, M., Scheffer, A. J., Degener, J. E., The, T. H., Scheek, R. M., Welling, G. W. y Welling-Westera, S. (2002). *High level expression and secretion of truncated forms of herpes simplex virus type 1 and type 2 glycoprotein D by the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 25:400-408.

Kunes, Y. Z., Sanz, M. C., Tumanova, I., Birr, C. A., Shi, P. Q., Bruguera, P., Ruiz, J. A. y Sánchez-Martínez, D. (2002). *Expression and characterization of a synthetic protein C activator in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 26: 406-415.

Lattard, V., Fondeur-Gelinotte, M., Gulberti, S., Jacquinet, J. C., Boudrant, J., Netter, P., Magdalou, J., Ouzzine, M. y Fournel-Gigleux, S. (2005). *Purification and characterization of a soluble form of the recombinant human galactose- β 1,3-glucuronosyltransferase I expressed in the yeast Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. (Aceptado para su publicación).

Lefort, S. y Ferrara, P. (1986). *Hydrophobic adsorbants for the isolation and purification of biosynthetic human growth hormone from crude fermentation mixtures*. J. of Chromatography 361:209-216.

Li, M., Hubálek, F., Newton-Vinson, P. y Edmondson, D. E. (2002). *High-level expression of human liver monoamine oxidase A in Pichia pastoris: comparison with the enzyme expressed in Saccharomyces cerevisiae*. Prot. Express. Purif. 24:152-162.

Liu, P. T., Ta, T. V. y Villarete, L. H. (2001). *High-yield expression and purification of human interferon α -1 in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 22:381-387.

Mizutani, K., Okamoto, I., Fujita, K., Yamamoto, K. y Hirose, M. (2004). *Structural and functional characterization of ovotransferrin produced by Pichia pastoris*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68(2):376-383.

Mukhopadhyay, U. K. y Sahni, G. (2002). *Production of recombinant buffalo and goat growth hormones from genetically modified E. coli strains*. J. of Biotech. 97:199-212.

Olson, K. C., Fenno, J., Lin, M., Harkins, R. N., Snider, C., Kohr, W. H., Ross, M. J., Fudge, D., Prender, G. y Stebbing, N. (1981). *Purified human growth hormone from E. coli is biologically active*. Nature 293(5831):408-11.

Outchkourov, N. S., Stiekema, W. J. y Jongsma, M. A. (2002). *Optimization of the expression of equistatin in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 24: 18–24.

Ouyang, J., Wang, J., Deng, R., Long, Q. y Wang, X. (2003). *High-level expression, purification and characterization of porcine somatotropin in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 32:28-34.

Paramasivam, M., Saravanan, K., Uma, K., Sharma, S., Singh, T. P. y Srinivasan, A. (2002). *Expression, purification, and characterization of equine lactoferrin in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 26:28–34.

Paus, E. J., Willey, J., Ridge, R. J., Legg, C. R., Finkelman, M. A., Novitsky, T. J. y Ketchum, P. A. (2002). *Production of recombinant endotoxin neutralizing protein in Pichia pastoris and methods for its purification*. Prot. Express. Purif. 26:202–210.

Ribela, M. T., Gout, P. W. y Bartolini, P. (2003). *Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones*. J. of Chromatography B. 790:285-316.

Rolland, D., Gauthier, M., Dugua, J. M., Fournier, C., Delpech, L., Watelet, B., Letourneur, O., Arnaud, M. y Jolivet, M. (2001). *Purification of recombinant HBc antigen expressed in Escherichia coli and Pichia pastoris: comparison of size-exclusion chromatography and ultracentrifugation* J. of Chromatography B 753:51–65.

Rotticci-Mulder, J. C., Gustavsson, M., Holmquist, M., Hult, K. y Martinelle, M. (2001). *Expression in Pichia pastoris of Candida antarctica lipase B and Lipase B fused to a cellulose-binding domain*. Prot. Express. Purif. 21:386–392.

Senerovic, L., Stankovic, N., Spizzo, P., Basso, A., Gardossi, L., Vasiljevic, B., Ljubijankic, G., Tisminetzky, S. y Degrassi, G. (2005). *High-level production and covalent immobilization of Providencia rettgeri penicillin G acylase (PAC) from recombinant Pichia pastoris for the development of a novel and stable biocatalyst of industrial applicability*. Biotech. and Bioeng.(Aceptado para su publicación).

Ševo, M., Degrassi, G., Skoko, N., Ventura, V. y Ljubijankic, G. (2002). *Production of glycosylated thermostable Providencia rettgeri penicillin G amidase in Pichia pastoris*. FEMS Yeast Research 1:271-277.

Skoog, D. A., West, D. M. y Holler, F. J. (1995). *Química Analítica*. 6ª Edición. McGraw-Hill/Interamericana de México, S.A. de C. V. Estado de México, México.

Tiselius, A. (1948). *Adsorption separation by salting out*. Arkiv för Kemi, Mineralogi Geologi 26B 1-5.

Vydac. (2000). *Principles and applications of high-performance ion-exchange chromatography for bioseparations*. The Separation Group, Hesperia, CA. EUA.

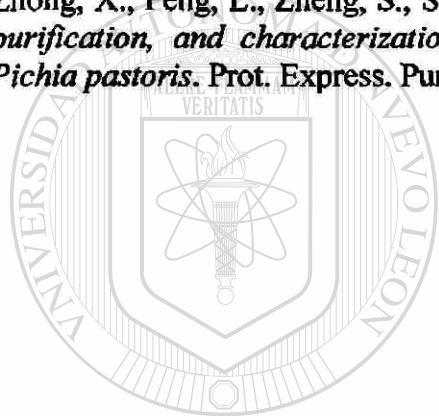
Weatherly, G. T., Bouvier, A., Lydiard, D. D., Chapline, J., Henderson, I., Schrimsher, J. L. y Shepard, S. R. (2002). *Initial purification of recombinant botulinum neurotoxin fragments for pharmaceutical production using hydrophobic charge induction chromatography*. J. of Chromatography A, 952:99–110.

Yoshimasu, M. A., Ahn, J. K., Tanaka, T. y Yada, R. (2002). *Soluble expression and purification of porcine pepsinogen from Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 25:229–236.

Zhang, L., Zhao, C., Zhu, D., Ohta, Y. y Wanga, Y. (2004). *Purification and characterization of inulinase from Aspergillus niger AF10 expressed in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 35:272–275.

Zhang, Y. L., Chen, S. S., Yang, K. G., .Su, L., Deng, Y. C. y Liu, C. Z. (2005). *Functional expression, purification, and characterization of human Flt3 ligand in the Pichia pastoris system*. Prot. Express. Purif. 42:246–254.

Zhong, X., Peng, L., Zheng, S., Sun, Z., Ren, Y., Dong, M. y Xu, A. (2004). *Secretion, purification, and characterization of a recombinant Aspergillus oryzae tannase in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 36:165–169.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

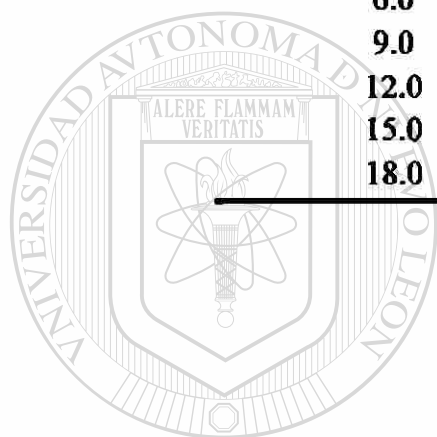
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



APÉNDICES

A. Datos obtenidos de la absorbancia de los estándares preparados para la curva de calibración empleada para la cuantificación de proteínas totales.

Concentración final del estándar de BSA (μg)	Absorbancia (μA)
0.1	0.081
0.6	0.263
3.0	0.621
6.0	0.736
9.0	0.816
12.0	0.844
15.0	0.872
18.0	0.880



UANL

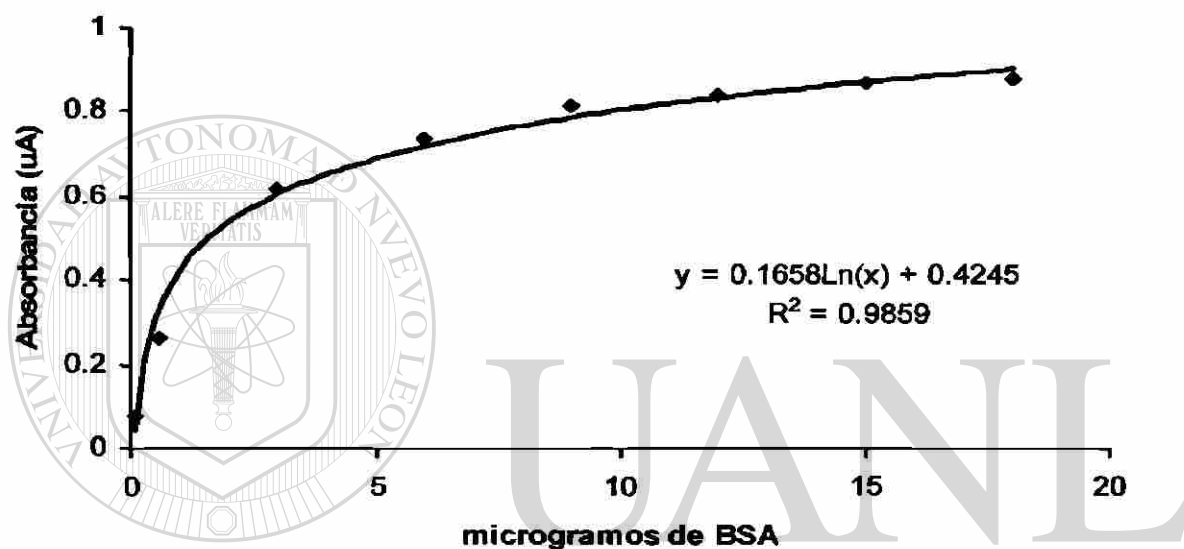
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

B. Curva de calibración para cuantificación de proteínas totales.

El análisis de la regresión logarítmica correspondiente a la absorbancia en relación con los microgramos teóricos de albúmina sérica bovina en los estándares fue obtenida a partir de los datos experimentales presentados en el Anexo A. Se empleó el programa computacional Microsoft® Office Excel 2003 para obtener la siguiente gráfica, junto con su ecuación de regresión logarítmica y coeficiente de correlación:



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 $y = 0.1658\ln(x) + 0.4245$
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS $r^2 = 0.9859$ ®

C. Promedio de las absorbancias obtenidas en las 6 réplicas del esquema de purificación.

I. Muestra Inicial.

0.847 ± 0.037

II. Cromatografía de intercambio aniónico.

<i>Elución 0M</i>	0.448 ± 0.023
<i>Elución 0M</i>	0.145 ± 0.051
<i>Elución 0.4M</i>	0.621 ± 0.048
<i>Elución 0.6M</i>	0.299 ± 0.069
<i>Elución 0.8M</i>	0.054 ± 0.010
<i>Elución 1.0M</i>	0.006 ± 0.006

III. Cromatografía de interacciones hidrofóbicas.

<i>Elución 1.0M</i>	0.010 ± 0.010
<i>Elución 0.8M</i>	0.027 ± 0.026
<i>Elución 0.6M</i>	0.026 ± 0.028
<i>Elución 0.4M</i>	0.032 ± 0.027
<i>Elución 0.2M</i>	0.078 ± 0.036
<i>Elución 0M</i>	0.417 ± 0.081

IV. Cromatografía de exclusión molecular.

<i>Elución 14 min</i>	0.002 ± 0.004
<i>Elución 16 min</i>	0.067 ± 0.113
<i>Elución 18 min</i>	0.267 ± 0.112
<i>Elución 20 min</i>	0.307 ± 0.082
<i>Elución 22 min</i>	0.125 ± 0.106
<i>Elución 24 min</i>	0.028 ± 0.017
<i>Elución 26 min</i>	0.016 ± 0.009
<i>Elución 28 min</i>	0.008 ± 0.005
<i>Elución 30 min</i>	0.012 ± 0.017
<i>Elución 32 min</i>	0.006 ± 0.004
<i>Elución 34 min</i>	0.013 ± 0.011
<i>Elución 36 min</i>	0.006 ± 0.009

D. Promedio de los microgramos de las muestras analizadas en la 6 réplicas del esquema de purificación basados en la curva de calibración y las absorbancias obtenidas.

I. Muestra Inicial.

912.81 ± 182.82

II. Cromatografía de intercambio aniónico.

<i>Elución 0M</i>	116.27 ± 16.22
<i>Elución 0M</i>	19.28 ± 6.27
<i>Elución 0.4M</i>	338.36 ± 87.67
<i>Elución 0.6M</i>	50.19 ± 18.45
<i>Elución 0.8M</i>	10.73 ± 0.69
<i>Elución 1.0M</i>	8.04 ± 0.31

III. Cromatografía de interacciones hidrofóbicas.

<i>Elución 1.0M</i>	0.82 ± 0.05
<i>Elución 0.8M</i>	0.92 ± 0.15
<i>Elución 0.6M</i>	0.92 ± 0.16
<i>Elución 0.4M</i>	0.95 ± 0.15
<i>Elución 0.2M</i>	1.26 ± 0.30
<i>Elución 0M</i>	64.84 ± 17.89

IV. Cromatografía de exclusión molecular.

<i>Elución 14 min</i>	0.00 ± 0.00
<i>Elución 16 min</i>	0.68 ± 1.33
<i>Elución 18 min</i>	3.93 ± 3.59
<i>Elución 20 min</i>	4.67 ± 2.86
<i>Elución 22 min</i>	1.21 ± 1.57
<i>Elución 24 min</i>	0.14 ± 0.08
<i>Elución 26 min</i>	0.07 ± 0.02
<i>Elución 28 min</i>	0.03 ± 0.01
<i>Elución 30 min</i>	0.05 ± 0.07
<i>Elución 32 min</i>	0.02 ± 0.00
<i>Elución 34 min</i>	0.06 ± 0.04
<i>Elución 36 min</i>	0.02 ± 0.03

Juan Francisco Villarreal Chiu, L.Q.I.

Plutarco E. Calles #345, Res. Periférico, Monterrey, México 66420

Teléfono: (0152) 8352-9447 • Fax: (0152) 8376-5753

E-mail: lqi_juan_chiu@yahoo.com

Educación

Maestro en Ciencias, Biología Molecular e Ingeniería Genética, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L.), Monterrey, México, 2006.

Licenciatura, Licenciado en Química Industrial, Facultad de Ciencias Químicas, U.A.N.L., 2002.

Experiencia Profesional

- **Tesista Investigador, M.C., “Desarrollo de un esquema de purificación para la hormona de crecimiento bovina producida por *Pichia pastoris*”. Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina, U.A.N.L. 2004-2006.**
- **Colaborador, “Determinación de la repetición CAG en el receptor de andrógenos en pacientes con cáncer de próstata”. Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina, U.A.N.L. 2004.**
- **Tesista Investigador, “Obtención de constantes cinéticas de biodegradación de BTEoX y EMTB por un consorcio mixto aclimatado a BTEX”. Laboratorio de Biorremediación Ambiental. Facultad de Medicina, U.A.N.L. 2003.**
- **Colaborador, “Producción, caracterización y determinación de enzimas lignolíticas”. Laboratorio de Enzimología, Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. 2001-2002.**
- **Analista Estadístico, “Programa Ganado Mejor 1999 de Alianza para el Campo en Nuevo León”. SAGAR (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural) y FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación). 1999.**
- **Analista Estadístico, “Programa Mejoramiento Genético 1998 de Alianza para el Campo en Nuevo León”. SAGAR (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural) y FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación). 1998.**
- **Analista Estadístico, “Programa Ganado Mejor 1998 de Alianza para el Campo en Nuevo León”. SAGAR (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural) y FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación). 1998.**

Publicaciones

Área de Biorremediación Ambiental

- Acuna-Askar, K., Gracia-Lozano, M.V., Villarreal-Chiu, J.F., Marmolejo, J.G., Garza-Gonzalez, M.T. y Chavez-Gomez, B.: "Effect of soil and a nonionic surfactant on BTEoX and MTBE biodegradation kinetics," *Water Science and Technology*. 2005: 52(8):107-115. IWA Publishing, Londres, Reino Unido. ISSN: 0273-1223.
- Acuna-Askar, K., Gracia-Lozano, M.V., Villarreal-Chiu, J.F., Garza-Gonzalez, M.T., Rodriguez-Sanchez, I.P., Barrera-Saldana, H.A. y Chavez-Gomez, B. (2005). *The effect of a nonionic surfactant on BTEOX and MTBE solubility in soil slurries*. En: CONSOIL 2005, Site Characterisation and Risk Assessment. O. Uhlmann, G.J. Annokkée and F. Arendt (Eds.). Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Publishers. Alemania. pp. 1268-1273. ISBN: 3-923704-50-X. Copyright 2005.
- Acuna-Askar, K., Villarreal-Chiu, J.F., Gracia-Lozano, M.V., Garza-Gonzalez, M.T., Chavez-Gomez, B., Rodriguez-Sanchez, I.P. y Barrera-Saldana, H.A.: "BTEoX biodegradation kinetics with MTBE through bioaugmentation," *Water Science and Technology*. 2004: 50(5):75-92. IWA Publishing, Londres, Reino Unido. ISSN: 0273-1223.

Desarrollo Profesional

Trabajos Expuestos en Congresos

- Villarreal-Chiu, J.F., Gracia-Lozano, M.V., Acuna-Askar, K., Garza-Gonzalez, M.T., Rodriguez-Sanchez, I.P. y Barrera-Saldana, H.A.: "Bioremediation of BTEoX and MTBE in soil slurries by a biomass grown in a BTEX-fed batch-reactor," 105th General Meeting of American Society for Microbiology. Atlanta, E.U.A.. Jun. 5-9, 2005.
- Acuna-Askar, K., Gracia-Lozano, M.V., Villarreal-Chiu, J.F., Garza-Gonzalez, M.T., Chavez-Gomez, B., Rodriguez-Sanchez, I.P. y Barrera-Saldana, H.A.: "The role of a nonionic surfactant on biodegradation efficiency kinetics models of BTEoX and MTBE," 4th World Water Congress and Exhibition. Marrakech, Marruecos. Sep. 19-24, 2004.
- Villarreal-Chiu, J.F., Gracia-Lozano, M.V., Garza-Gonzalez, M.T., Acuna-Askar, K., Rodriguez-Sanchez, I.P. and Barrera-Saldana, H.A.: "Aerobic bioremediation of BTEX with MTBE in soil samples," XXXVIII Congreso Mexicano de Química. Ixtapa, México. Sep. 21-25, 2003.
- Villarreal-Chiu, J.F., Gracia-Lozano, M.V., Garza-Gonzalez, M.T., Acuna-Askar, K., Rodriguez-Sanchez, I.P. y Barrera-Saldana, H.A.: "Aerobic bioremediation of BTEX with MTBE in soil samples," 4^o Congreso Regional Química Industrial. Mayo 27, 2003. Monterrey, México.

Participación en Trabajos Presentados en Congresos

- Acuna-Askar, K., Gracia-Lozano, M.V., Villarreal-Chiu, J.F., Garza-Gonzalez, M.T., Rodriguez-Sanchez, I.P., Barrera-Saldana, H.A. y Chavez-Gomez, B.: "The effect of a nonionic surfactant on BTEoX and MTBE solubility in soil slurries," 9th International FZK/TNO Conference on Soil-Water Systems (ConSoil 2005). Bordeaux, Francia. Oct. 3-7, 2005.
- Acuna-Askar, K., Gracia-Lozano, M.V., Villarreal-Chiu, J.F., Marmolejo, J.G., Garza-Gonzalez, M.T. y Chavez-Gomez, B. (2004). "Effect of soil and a nonionic surfactant on BTEoX and MTBE biodegradation kinetics". Proceedings of the 4th International Water Association World Water Congress. Marrakech, Marruecos. Septiembre 19-24, 2004. IWA Publishing, Londres, Reino Unido.
- Acuna-Askar, K., Gracia-Lozano, M.V., Villarreal-Chiu, J.F., Garza-Gonzalez, M.T., Chavez-Gomez, B., Rodriguez-Sanchez, I.P. y Barrera-Saldana, H.A. (2004). "The role of a nonionic surfactant on biodegradation efficiency kinetic models of BTE-oX and MTBE". Proceedings of the 4th International Water Association World Water Congress. Marrakech, Marruecos. Septiembre 19-24, 2004. IWA Publishing, Londres, Reino Unido.
- Acuna-Askar, K., Villarreal-Chiu, J.F., Gracia-Lozano, M.V., Garza-Gonzalez, M.T., Chavez-Gomez, B., Rodriguez-Sanchez, I.P. y Barrera-Saldana, H.A.: "BTEoX biodegradation kinetics with MTBE trough bioaugmentation," 4th Specialized International Water Association Conference on Assessment and Control of Hazardous Substances in Water (ECOHazard 2003). Aachen, Alemania. Sep. 14-17, 2003.

Asistencia a Talleres y Congresos Relevantes

- "Avances recientes en la biología molecular de *Pichia pastoris*", Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Abril 4-5, 2006.
- "Bioinformática estructural de las proteínas", Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Dic. 12-15, 2005.
- "Estabilidad estructural y espectroscopia de las proteínas", Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Dic. 9-12, 2005.
- "XVII Curso internacional: RNA de interferencia y PCR en tiempo real", Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, U.A.N.L. Nov. 8-13, 2004.
- "2nd Pan-American Symposium on Neurovirology and AIDS", Pan-American Society for Neurovirology y U.A.N.L. Facultad de Medicina. Mayo 5-7, 2004.
- "Workshop on Scientific Writing: Proposal Application", National Institutes of Health, Harvard Medical School y U.A.N.L. Facultad de Medicina. Mayo 5, 2004.
- "XXV Congreso Latinoamericano de Química", Federación Latinoamericana de Asociaciones Químicas y Sociedad Química de México. Cancún, México. Sep. 22-26, 2002.
- "XXXVI Congreso Mexicano de Química", Sociedad Química de México. Ixtapa, México. Sep. 9-13, 2001.
- "XXXIV Congreso Mexicano de Química", Sociedad Química de México. Monterrey, México. Oct. 17-21, 1999.

Seminarios Impartidos

- *Desarrollo de un esquema de purificación para la hormona de crecimiento bovina producida por Pichia pastoris*, XXIII Congreso Nacional de Investigación Bioquímica, Oct. 29, 2005.
- *Obtención de constantes cinéticas de biodegradación de BTEoX y EMTB por un consorcio mixto aclimatado a BTEX*, Escuela de Graduados, Facultad de Ciencias Químicas, U.A.N.L., Oct. 29, 2004.
- *Panel de Investigación*, 5º Congreso Regional de Química Industrial, Mayo 13, 2004.

Experiencia Académica

- **Colaborador del taller**, “Técnicas de Biorremediación”, Laboratorio de Biorremediación Ambiental y Facultad de Agronomía, U.A.N.L., 2003 – 2004.

Premios Recibidos

- **Licenciatura**, Premio a la mejor tesis de investigación en el área de Ciencias Naturales, U.A.N.L., Monterrey, México, 2004.
- **Premio Estatal de la Juventud en el área de Protección al Ambiente**, otorgado por el Instituto Estatal de la Juventud y el gobernador del Estado de Nuevo León. Monterrey, México, 2004.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



