

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



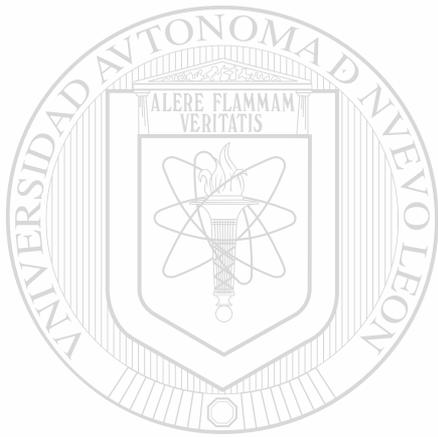
PRODUCCION EN BIORREACTOR, PURIFICACION  
Y BIOENSAYO DE HORMONAS RECOMBINANTES  
DEL CRECIMIENTO

Por

M.C. JORGE ANGEL I. ASCACIO MARTINEZ

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

Marzo, 2004



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

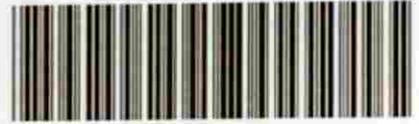
M.C. JORGE ANGEL I. ASCACIO MARTINEZ

ANL

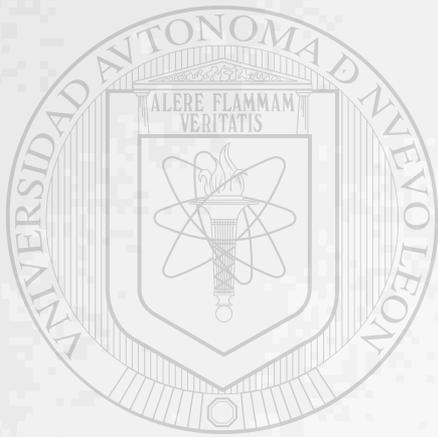
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
BIBLIOTECAS



TD  
QP572  
.S6  
A7  
2004  
c.1



1080123883



# UANL

---

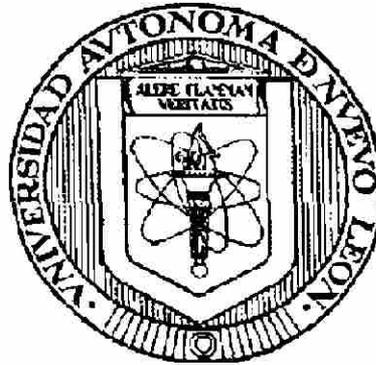
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



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

Por

**M.C. JORGE ANGEL I. ASCACIO MARTINEZ**

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

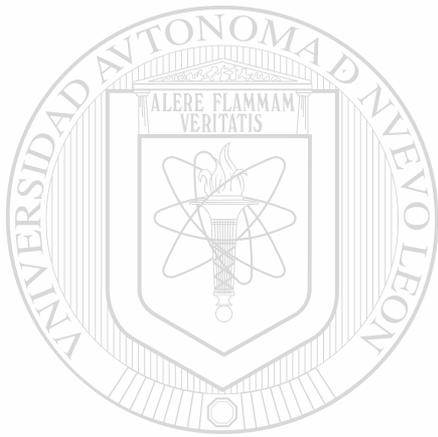
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
Como requisito parcial para obtener el Grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

**Marzo, 2004**

TD  
QP572  
.S6  
A7  
2004



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

**Aprobación de la Tesis:**



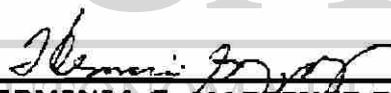
**DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA**  
Director de la tesis



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



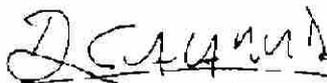
**DR. MARCO A. RITO PALOMARES**  
Comisión de tesis



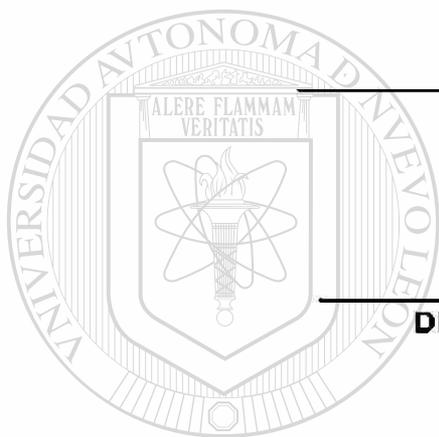
**DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRIGUEZ**  
Comisión de tesis



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



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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®



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

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
A mis hermanos, amigos y conocidos que se interesaron por mis estudios.

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

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

## DEDICATORIA

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

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

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## INDICE

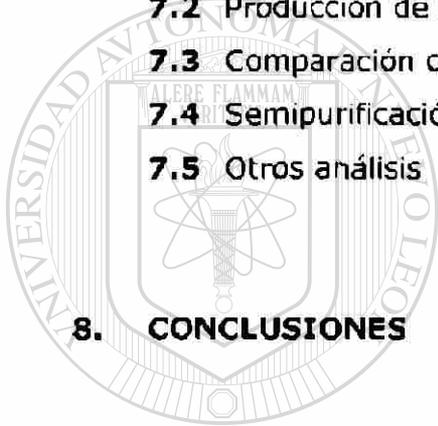
<b>1. INTRODUCCION</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b> El reto creciente de mejorar la productividad y salud animal .....	<b>1</b>
<b>1.2</b> La Biotecnología .....	<b>3</b>
<b>1.3</b> La familia de la hormona de crecimiento .....	<b>3</b>
<b>1.4</b> Hormonas del crecimiento animal .....	<b>5</b>
<b>1.4.1</b> Hormona del crecimiento bovino (BGH) .....	<b>5</b>
<b>1.4.2</b> Hormona del crecimiento caprino (CHGH) .....	<b>8</b>
<b>1.4.3</b> Hormona del crecimiento equino (ECGH) .....	<b>11</b>
<b>1.4.4</b> Hormona del crecimiento canino (CFGH) .....	<b>12</b>
<b>1.4.5</b> Hormona del crecimiento felino (FCGH) .....	<b>14</b>
<b>1.4.6</b> Hormona del crecimiento humano (HGH) .....	<b>15</b>
<b>1.4.7</b> Lactógeno placentario humano (HPL) .....	<b>18</b>
<b>1.5</b> Potencial biotecnológico de las GHs .....	<b>20</b>
<b>1.6</b> Sistemas de expresión para las hormonas del crecimiento .....	<b>22</b>
<b>1.6.1</b> <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión .....	<b>23</b>
<b>2. JUSTIFICACION</b> .....	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1</b> Objetivo general .....	<b>30</b>
<b>3.2</b> Objetivos particulares .....	<b>30</b>

<b>4. MATERIAL</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b> Reactivos químicos y medios de cultivo	<b>31</b>
<b>4.2</b> Biológicos	<b>32</b>
<b>4.3</b> Infraestructura	<b>33</b>
<b>5. METODOLOGIA</b>	<b>35</b>
<b>5.1</b> Estrategia general	<b>35</b>
<b>5.2</b> Construcción de los plásmidos pBS-xGH para cada hormona	<b>38</b>
<b>5.2.1</b> Diseño de los oligonucleótidos para amplificar el ADNc de cada hormona	<b>38</b>
<b>5.2.2</b> Amplificación por la RCP de los ADNcs de cada Hormona	<b>40</b>
<b>5.2.3</b> Clonación del ADNc de cada GH en el vector pBS por "Vector T"	<b>42</b>
<b>5.2.3.1</b> Minipreparación de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina	<b>43</b>
<b>5.2.3.2</b> Generación del Vector "T" en el plásmido pBS II (+)	<b>45</b>
<b>5.2.3.3</b> Ligación de cada ADNc de GH al vector pBS	<b>46</b>
<b>5.2.3.4</b> Transformación con células calcio competentes <i>Escherichia coli</i> XL1 Blue	<b>47</b>
<b>5.2.3.5</b> Selección de colonias portadoras de plásmidos recombinantes	<b>48</b>
<b>5.2.3.6</b> Caracterización por la RCP de los plásmidos pBS-xGH recombinantes	<b>49</b>
<b>5.2.3.7</b> Verificación de la clonación de los ADNcs de cada hormona por enzimas de restricción	<b>50</b>

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

<b>5.9.5</b>	Etapa de inducción de lote alimentado con metanol	74
<b>5.9.6</b>	Etapa de cosecha	74
<b>5.10</b>	Métodos y parámetros evaluados	75
<b>5.11</b>	Sempurificación de las hormonas recombinantes	76
<b>5.12</b>	Ensayo de la actividad biológica de las hormonas	80
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b>	83
<b>6.1</b>	Iniciadores del ADNc de cada hormona	83
<b>6.2</b>	Amplificación por la RCP de los ADNcs de cada hormona	84
<b>6.3</b>	Construcción de los plásmidos pBS-xGH	85
<b>6.4</b>	Construcción de los vectores pPIC9-xGH	88
<b>6.5</b>	Construcción de las nuevas cepas de <i>Pichia pastoris</i>	92
<b>6.5.1</b>	Verificación por RCP de la integración de los "casetes" de expresión	92
<b>6.6</b>	Construcción de la cepa testigo negativo de expresión	94
<b>6.7</b>	Identificación del fenotipo Mut de cada cepa	96
<b>6.8</b>	Producción y análisis a nivel matraz de las hormonas	97
<b>6.9</b>	Escalamiento a biorreactor de la producción de las hormonas	101
<b>6.9.1</b>	Proceso y desarrollo de la fermentación en biorreactor para la CFGH	102
<b>6.9.2</b>	Proceso y desarrollo de la fermentación en biorreactor para el HPL	105
<b>6.9.3</b>	Proceso y desarrollo de la fermentación en biorreactor para la HGH	107
<b>6.9.4</b>	Proceso y desarrollo de la fermentación en biorreactor para la ECGH	109
<b>6.9.5</b>	Proceso y desarrollo de la fermentación en biorreactor para la FCGH	111
<b>6.9.6</b>	Proceso y desarrollo de la fermentación en biorreactor para la BGH	113

<b>6.10</b>	Sempurificación de las hormonas recombinantes .....	<b>115</b>
<b>6.11</b>	Inmunodetección de HGH recombinante del medio de cultivo de biorreactor .....	<b>119</b>
<b>6.12</b>	Ensayo de la actividad biológica en la línea celular Nb2 .....	<b>123</b>
<b>6.13</b>	Resumiendo .....	<b>126</b>
<b>7.</b>	<b>DISCUSION</b> .....	<b>127</b>
<b>7.1</b>	Construcción de las cepas .....	<b>127</b>
<b>7.2</b>	Producción de las hormonas recombinantes .....	<b>131</b>
<b>7.3</b>	Comparación con otros sistemas productores de GH .....	<b>135</b>
<b>7.4</b>	Sempurificación de las hormonas recombinantes .....	<b>143</b>
<b>7.5</b>	Otros análisis .....	<b>146</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>149</b>
<b>9.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>151</b>
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>152</b>



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estructura tridimensional consenso de las hormonas del crecimiento .....	5
<b>Figura 2.</b>	Industria caprina lechera .....	10
<b>Figura 3.</b>	Usos de la GH equina .....	12
<b>Figura 4.</b>	Efectos de la PGHr sobre cerdos de engorda .....	13
<b>Figura 5.</b>	El complejo multigénico hGH-hPL .....	19
<b>Figura 6.</b>	Uso del lactógeno placentario bovino en peces .....	21
<b>Figura 7.</b>	Producción de biomasa por <i>Pichia pastoris</i> .....	25
<hr/>		
<b>Figura 8.</b>	Vector de expresión pPIC9 para <i>Pichia pastoris</i> .....	26
<b>Figura 9.</b>	Estrategia general para la construcción de las cepas ...	36
<b>Figura 10.</b>	Estrategia general para producir y caracterizar a las hormonas recombinantes .....	37
<b>Figura 11.</b>	Esquema de la construcción de los pBS-xGH .....	43
<b>Figura 12.</b>	Construcciones de los vectores de expresión pPIC9-cfGH y pPIC9-ecGH .....	53
<b>Figura 13.</b>	Construcción del vector de expresión pPIC9-fcGH .....	55

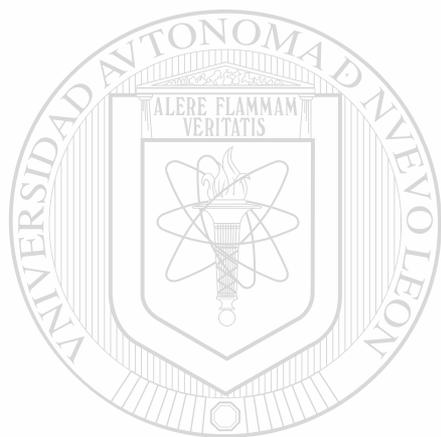
<b>Figura 14.</b> Construcción del vector de expresión pPIC9-hPL .....	57
<b>Figura 15.</b> Esquema del proceso de fermentación .....	68
<b>Figura 16.</b> Producción de hormonas recombinantes en biorreactor ....	72
<b>Figura 17.</b> Proceso de "Down Stream" para las hormonas recombinantes .....	76
<b>Figura 18.</b> Iniciadores para amplificar el ADNc de las hormonas ...	83
<b>Figura 19.</b> Amplificación de los ADNcs de las GHs y el hPL .....	84
<b>Figura 20.</b> Detección y caracterización de pBS-cfGH (ecGH y hPL)	87
<b>Figura 21.</b> Detección por RCP de las clonas con pPIC9-xGH .....	89
<b>Figura 22.</b> Caracterización de pPIC9-cfGH, pPIC9-ecGH, pPIC9-fcGH y pPIC9-hPL .....	91
<hr/>	
<b>Figura 23.</b> Detección del "casete" de cfGH, ecGH, fcGH y hPL en el genoma de <i>Pichia pastoris</i> .....	93
<b>Figura 24.</b> Identificación de las clonas "mock" (testigo negativo de expresión) de <i>Pichia pastoris</i> .....	95
<b>Figura 25.</b> Caracterización del fenotipo Mut en las cepas de <i>Pichia pastoris</i> .....	97
<b>Figura 26.</b> Producción en <i>Pichia pastoris</i> de las GHs (CFGH, HGH, HGH-V y ECGH) recombinantes .....	98

<b>Figura 27.</b> Producción en matraz de todas las cepas productoras de las hormonas recombinantes .....	99
<b>Figura 28.</b> Desarrollo de la fermentación en biorreactor de la CFGH	104
<b>Figura 29.</b> Desarrollo de la fermentación en biorreactor del HPL	106
<b>Figura 30.</b> Desarrollo de la fermentación en biorreactor de la HGH	108
<b>Figura 31.</b> Desarrollo de la fermentación en biorreactor de la ECGH	110
<b>Figura 32.</b> Desarrollo de la fermentación en biorreactor de la FCGH	112
<b>Figura 33.</b> Desarrollo de la fermentación en biorreactor de la BGH	114
<b>Figura 34.</b> Semipurificación de la CFGH .....	116
<b>Figura 35.</b> Semipurificación de la BGH .....	117
<hr/>	
<b>Figura 36.</b> Semipurificación de las GHs animales y PL humano .....	118
<b>Figura 37.</b> Detección por anticuerpos de la HGH recombinante .....	121
<b>Figura 38.</b> Inmunodetección de las GHs y HPL .....	122
<b>Figura 39.</b> Bioensayo en células Nb2 de la HGH y el HPL recombinantes .....	124
<b>Figura 40.</b> Bioensayo en células Nb2 de las GHs animales .....	125

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla I.</b>	<b>Consideraciones económicas y de bioseguridad de la BGHR</b> .....	<b>7</b>
<b>Tabla II.</b>	<b>Nuevas funciones atribuidas a la HGH 22 kDa</b> .....	<b>16</b>
<b>Tabla III.</b>	<b>Longitud característica de las GHs de mamíferos</b> .....	<b>39</b>
<b>Tabla IV.</b>	<b>Condiciones de la reacción de la RCP en la amplificación del ADNc</b> .....	<b>40</b>
<b>Tabla V.</b>	<b>Características de los ciclos del termociclador usados en la RCP de los ADNcs de las hormonas</b> .....	<b>41</b>
<b>Tabla VI.</b>	<b>Condiciones de reacción para la adición de timinas al vector pBS linerizado con Eco RV</b> .....	<b>45</b>
<b>Tabla VII.</b>	<b>Condiciones de reacción para la ligación del ADNc de cada hormona al vector de clonación pBS</b> .....	<b>46</b>
<b>Tabla VIII.</b>	<b>Condiciones para la reacción de ligación del ADNc de cada hormona con pPIC9</b> .....	<b>51</b>
<b>Tabla IX.</b>	<b>Condiciones de la RCP para evidenciar la inserción del "casete" de expresión para cada hormona en el genoma de <i>Pichia pastoris</i></b> .....	<b>64</b>
<b>Tabla X.</b>	<b>Programa de amplificación para los iniciadores aox1</b> .....	<b>65</b>

<b>Tabla XI.</b> Estimación del porcentaje de cada hormona en el medio de cultivo .....	100
<b>Tabla XII.</b> Rendimiento y pureza de las hormonas recombinantes .....	119
<b>Tabla XIII.</b> Resumen de las cepas y hormonas analizadas en este trabajo .....	126



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

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

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

## RESUMEN

Jorge A. Ascacio Martínez

Fecha de Graduación: Marzo, 2004

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

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

Número de páginas: 200

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

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

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

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

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

FIRMA DEL DIRECTOR:

  
Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

## 1. INTRODUCCION

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

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

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

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

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

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

## 1.2 La Biotecnología.

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

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

## 1.3 La familia de la hormona de crecimiento.

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

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

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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



**Figura 1. Estructura tridimensional consenso de las hormonas del crecimiento.** Las GHs poseen en general 190 residuos aminoacídicos,

cuatro hélices alfa y dos puentes disulfuro.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

#### **1.4 Hormonas del crecimiento animal.**

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

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

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

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

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

TABLA I

## CONSIDERACIONES ECONOMICAS Y DE BIOSEGURIDAD DE LA BGHr

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

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

### 1.4.2 Hormona del crecimiento caprino (CHGH).

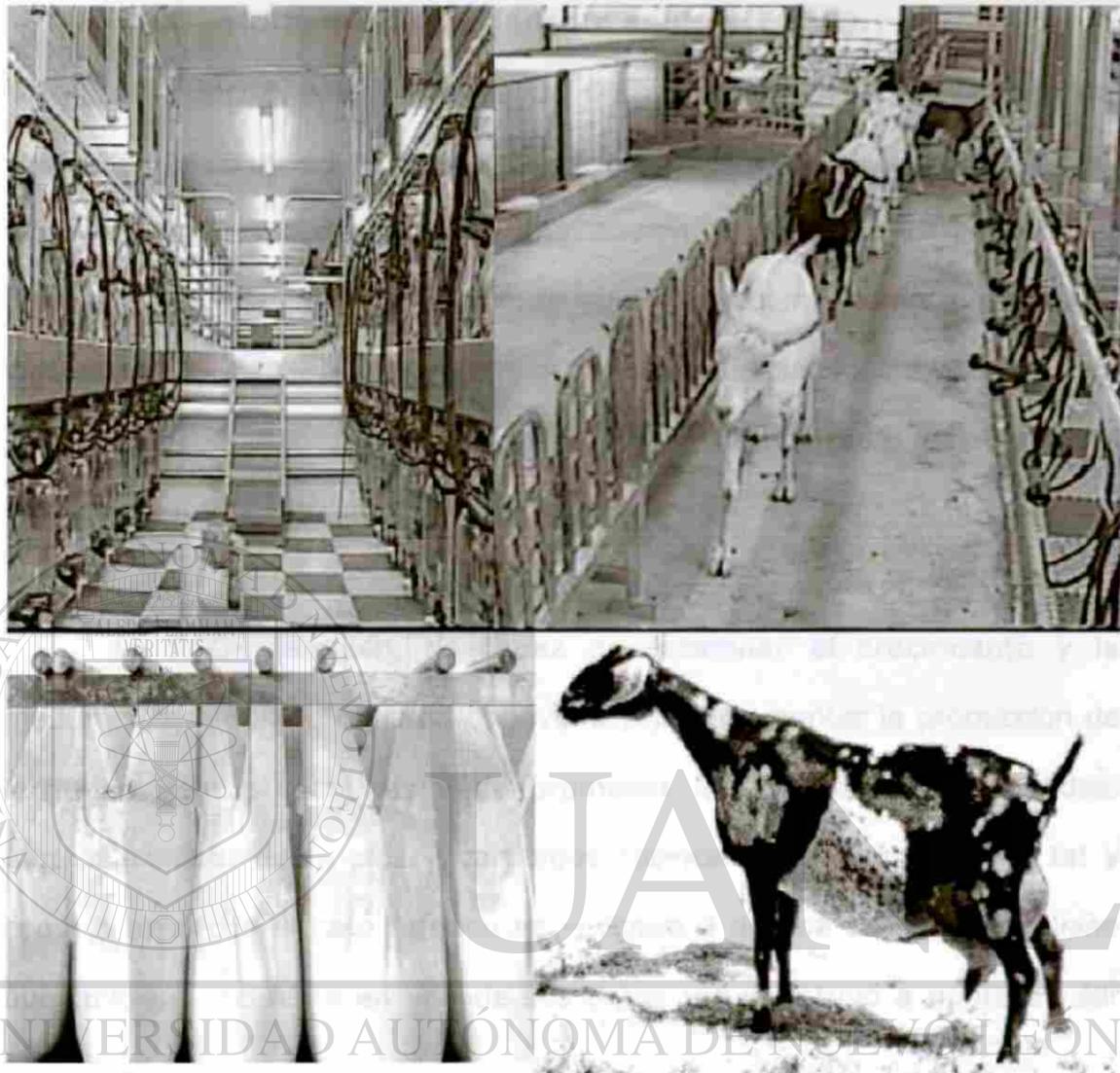
La investigación sobre producción lechera en ganado caprino, se ha venido incrementando debido a las consideraciones económicas que representa esta industria, lo que ha conducido a un mayor éxito comercial; tal como ha sucedido para la industria lechera del ganado bovino (Larson, 1978; Peel y Bauman,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

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

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

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

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



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

### 1.4.3 Hormona de crecimiento equino (ECGH).

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

La ECGH también, es capaz de estimular el crecimiento y la maduración temprana de caballos jóvenes, de incrementar la producción de leche en yeguas lactantes y de promover la cicatrización de heridas, particularmente de huesos y cartílagos (Stewart y Tuffnell, 1991), tal y como ocurrió con el caso referido en la figura 3 de un caballo australiano

que tuvo un accidente en una de sus patas y que estuvo a punto de ser sacrificado.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



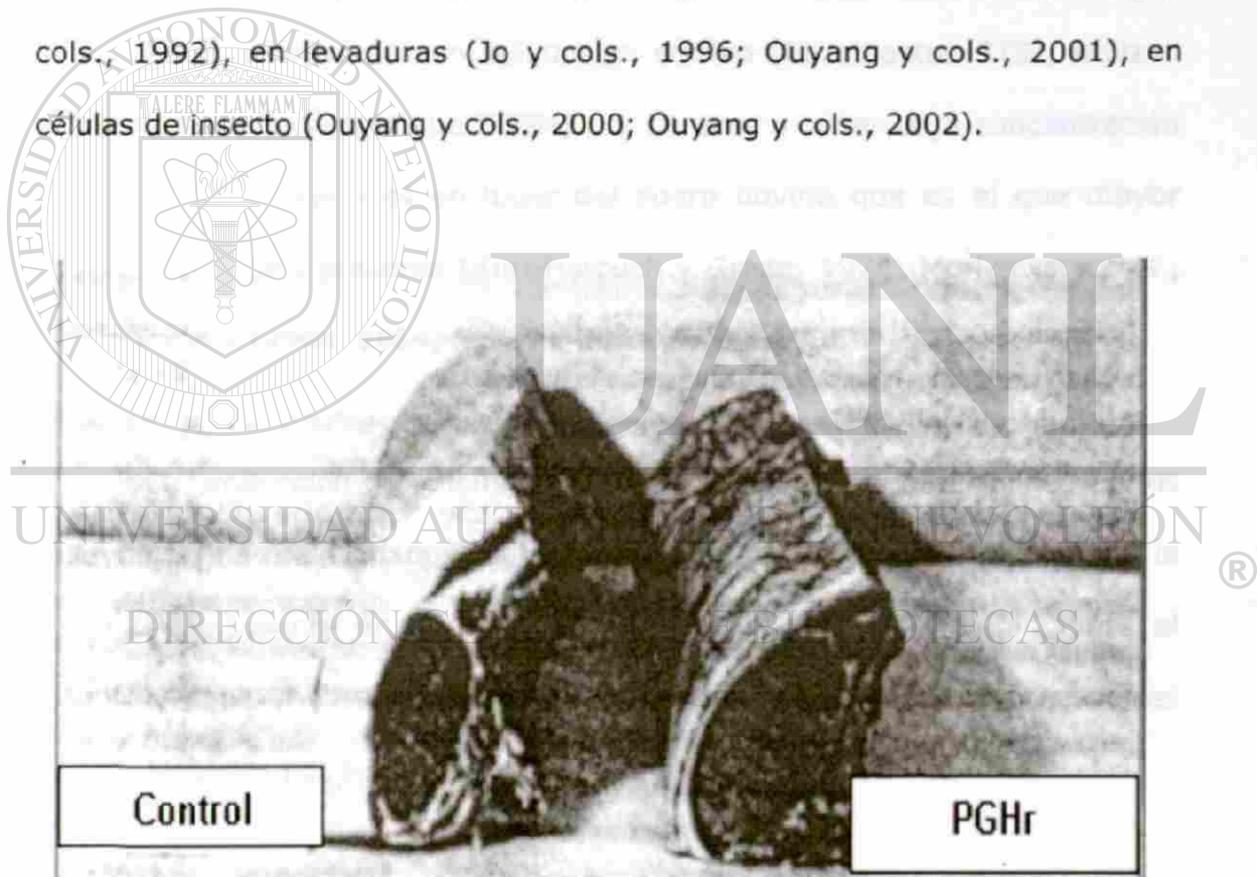
**Figura 3. Usos de la GH equina.** Se muestra a "Might and Power" un caballo de carreras (derecha) que resultó ganador de la copa de Melbourne Australia en 1997. En 1999 se lastimó severamente el tendón de una de sus patas, fue sometido a tratamiento con ECGH, se recuperó y en el 2000 pudo regresar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

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 1.4.4 Hormona de crecimiento canino (CFGH).

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

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



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

### **1.4.5 Hormona de crecimiento felino (FCGH).**

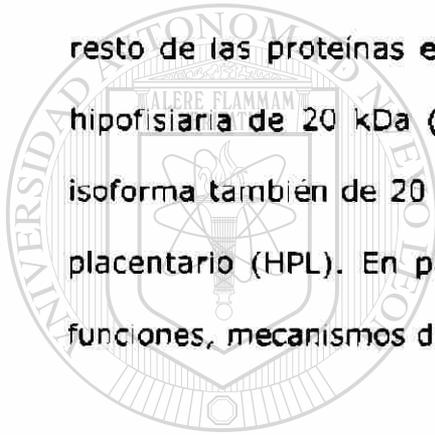
Aunque existe escasa literatura acerca de la GH del gato (FCGH), sin duda los beneficios identificados en las otras GHs se aplicarían sobre esta especie felina, ya que estos animales también presentan los síntomas arriba referidos para el perro, originados por la ausencia o baja concentración de la FCGH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

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

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

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

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



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA II

## NUEVAS FUNCIONES ATRIBUIDAS A LA HGH 22 kDa

**INMUNIDAD Y CICATRIZACION**

- Resistencia a enfermedades comunes.
- Capacidad de cicatrización.
- Cicatrización de lesiones antiguas.
- Cicatrización de otras lesiones.
- Tratamiento de úlceras.

**FACTORES SEXUALES**

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

**FUERZA Y TONO MUSCULAR**

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

**GRASAS**

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

**PIEL Y PELO**

- Elasticidad de la piel.
- Engrosamiento de la piel.
- Textura de la piel.
- Crecimiento de pelo nuevo.
- Desaparición de arrugas.
- Hidratación de la piel.

**FUNCION MENTAL**

- Estabilidad emocional.
- Memoria.
- Aspecto general y actitud.
- Energía mental y claridad de pensamiento.

**SISTEMA CIRCULATORIO**

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

**HUESO**

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

(Tomado de Elian y cols., 1999).

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

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

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

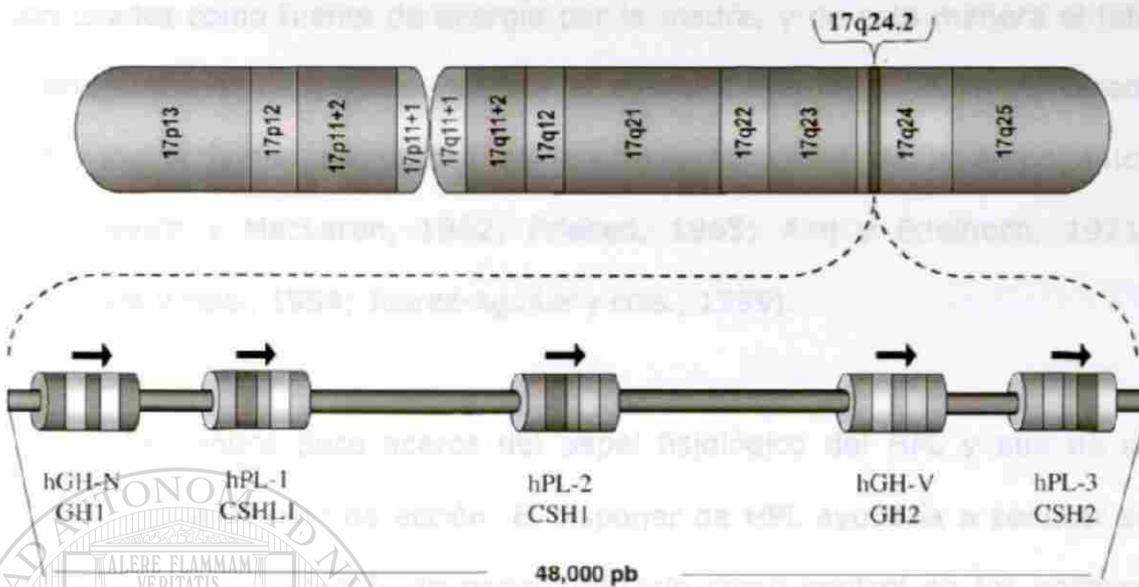
que la GH de la rana-toro presentó un 115% de actividad biológica (Farmer y cols., 1976; Farmer y cols., 1977).

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

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

Aparte de los dos genes hGH (normal y variante), tres hPLs complementan la familia multigénica hGH-hPL del genoma humano y se acomodan en el siguiente orden: hGH-N, hPL-1, hPL-2, hGH-V y hPL-3 (Chen y cols., 1989; Barrera-Saldaña, 1998) (figura 5). Mientras que el hPL-

1 es un pseudogen, el hPL-2 y hPL-3 son muy activos en placenta e interesantemente las versiones maduras de las hormonas que codifican son idénticas (Barrera-Saldaña y cols., 1983).



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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

HPL se detecta en suero materno a partir de la cuarta semana de

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

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

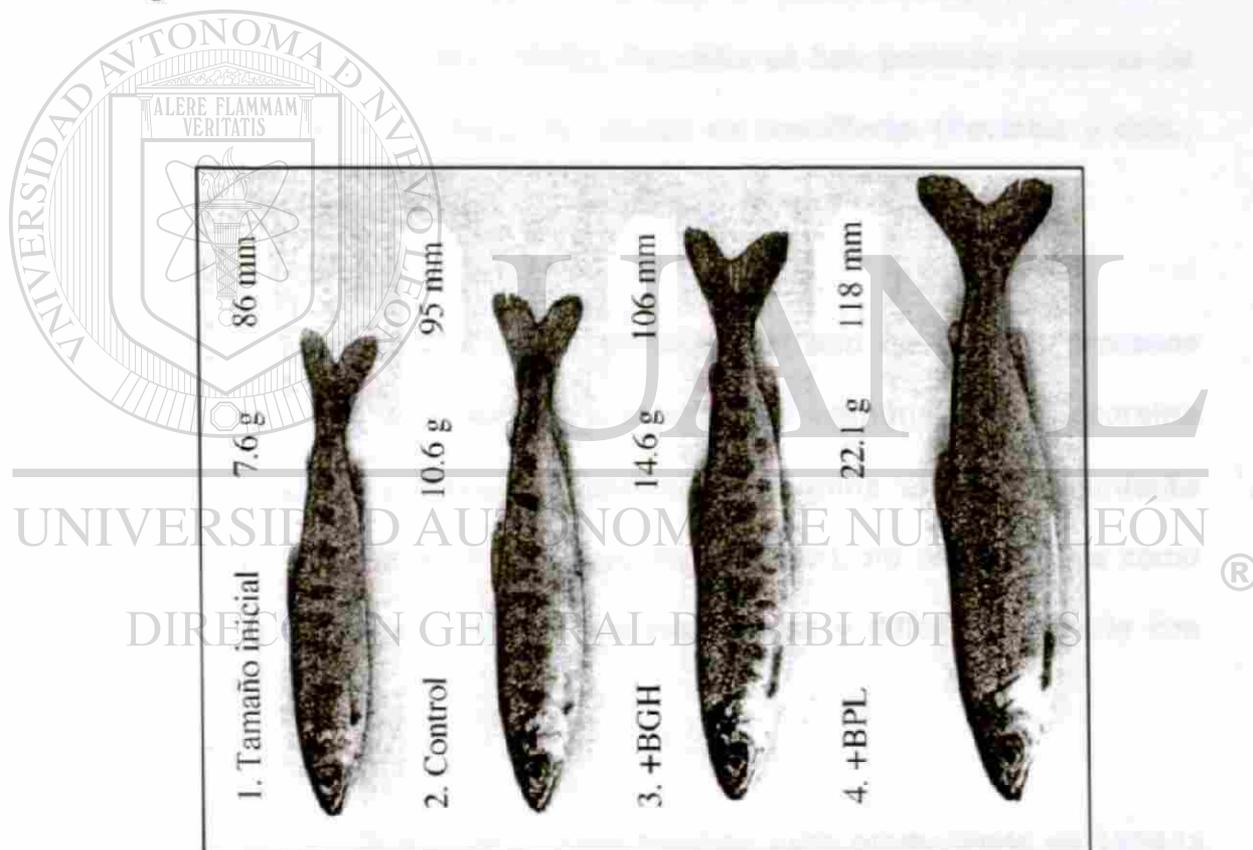
desarrollo; además, genera ácidos grasos libres por su efecto lipolítico, que son usados como fuente de energía por la madre, y de esta manera el feto puede disponer de glucosa durante el ayuno materno; finalmente, carece tanto de actividad promotora del crecimiento, como de la adipogénica (Josimovich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

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

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

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

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



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

## 1.6 Sistemas de expresión para las hormonas del crecimiento.

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

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

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

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

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

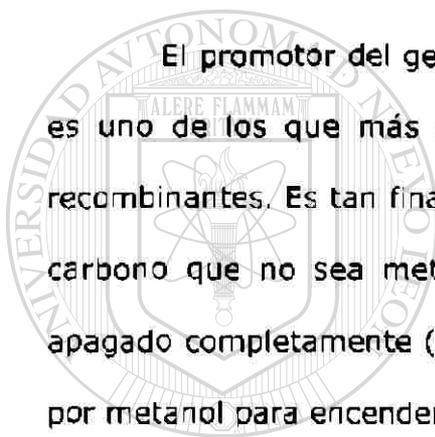
Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que específicamente la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* es un excelente sistema de expresión para hormonas del crecimiento (Escamilla y cols., 2000). Recientemente, un grupo de investigadores chinos logró construir una cepa de *Pichia pastoris*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

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

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

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

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



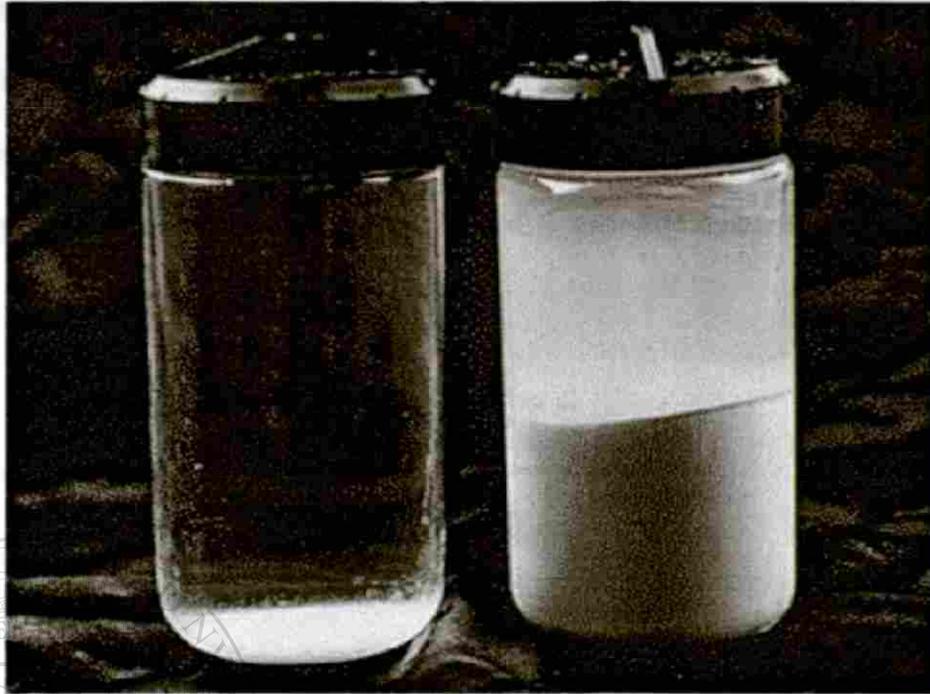
UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

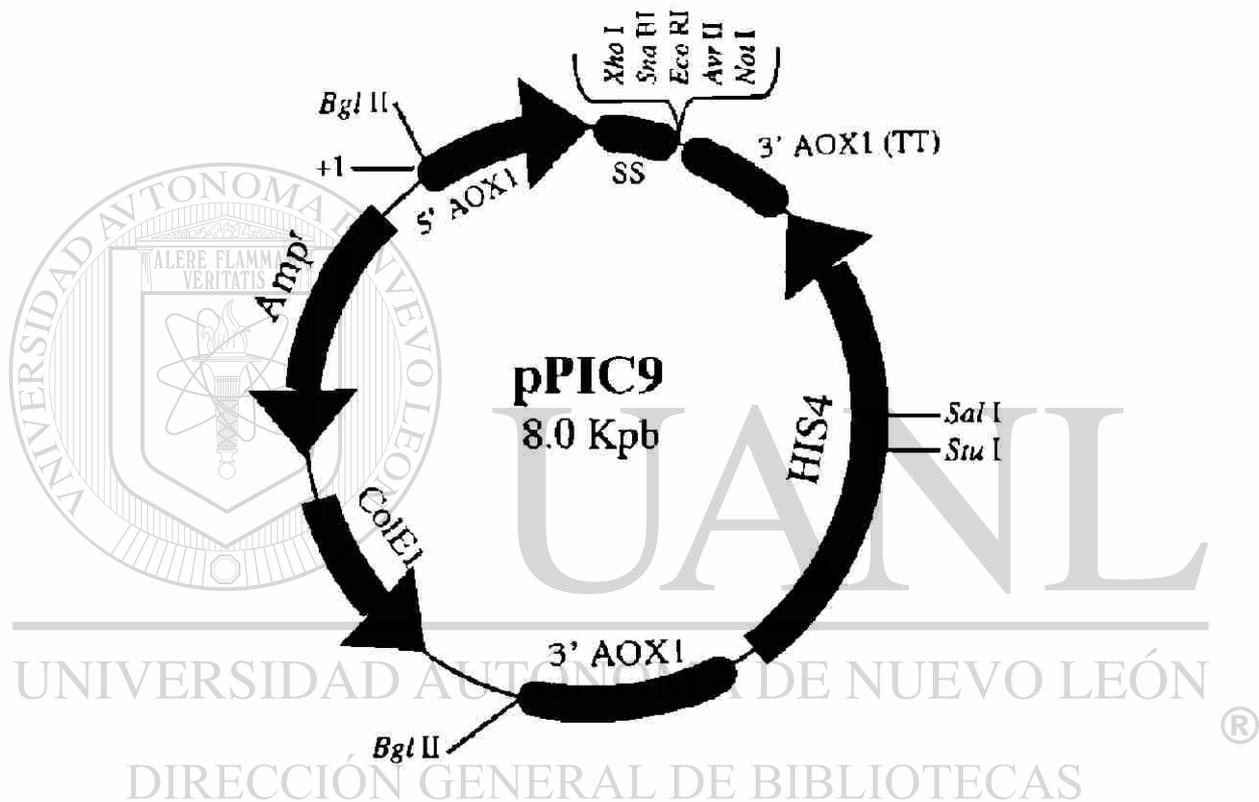


**Figura 7. Producción de biomasa por *Pichia pastoris*.** Esta levadura alcanza altas densidades celulares en biorreactores. Se muestran dos botellas que contienen medio de cultivo con biomasa a diferente densidad celular. El de la izquierda corresponde a uno crecido en matraz con deflectores

con una Densidad Óptica (DO) a 600 nm de 1.0. Mientras que el de la derecha corresponde a uno crecido en un biorreactor y tiene una DO a 600 nm de 500.

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

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



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

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

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

## 2. JUSTIFICACION

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

También resulta de interés el lactógeno placentario (PL), al que nuevas propiedades se le siguen descubriendo, como sucedió con el PL bovino cuyo estímulo al crecimiento del salmón resultó superior al de la BGH (Devlin y cols., 1994). Todas las GHs comerciales provienen de bacteria, siendo *Pichia pastoris* una excelente opción para producirlas de manera abundante, secretadas al medio de cultivo y biológicamente activas (Cregg y cols., 2000).

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

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

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

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general.

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

#### 3.2 Objetivos particulares.

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

## 4. MATERIAL

### 4.1 Reactivos químicos y medios de cultivo.

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

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

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

## 4.2 Biológicos.

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

El estuche de *Pichia pastoris* que se utilizó para la construcción de los sistemas de expresión se adquirió de la compañía Invitrogen Co. (Gaithersburg, MD. EUA). La línea celular de linfoma de rata Nb2 que se utilizó para los ensayos de la actividad biológica, fue proporcionada por la

Dra. Carmen Clapp y el Dr. Carlos Arámburo del Instituto de Neurobiología (INB) de la UNAM.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

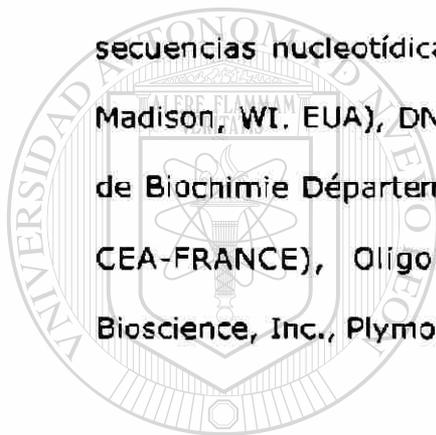
### 4.3 Infraestructura.

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

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

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

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



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Estrategia General.

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

a) Construcción de las nuevas cepas de *Pichia pastoris* productoras de las hormonas recombinantes.

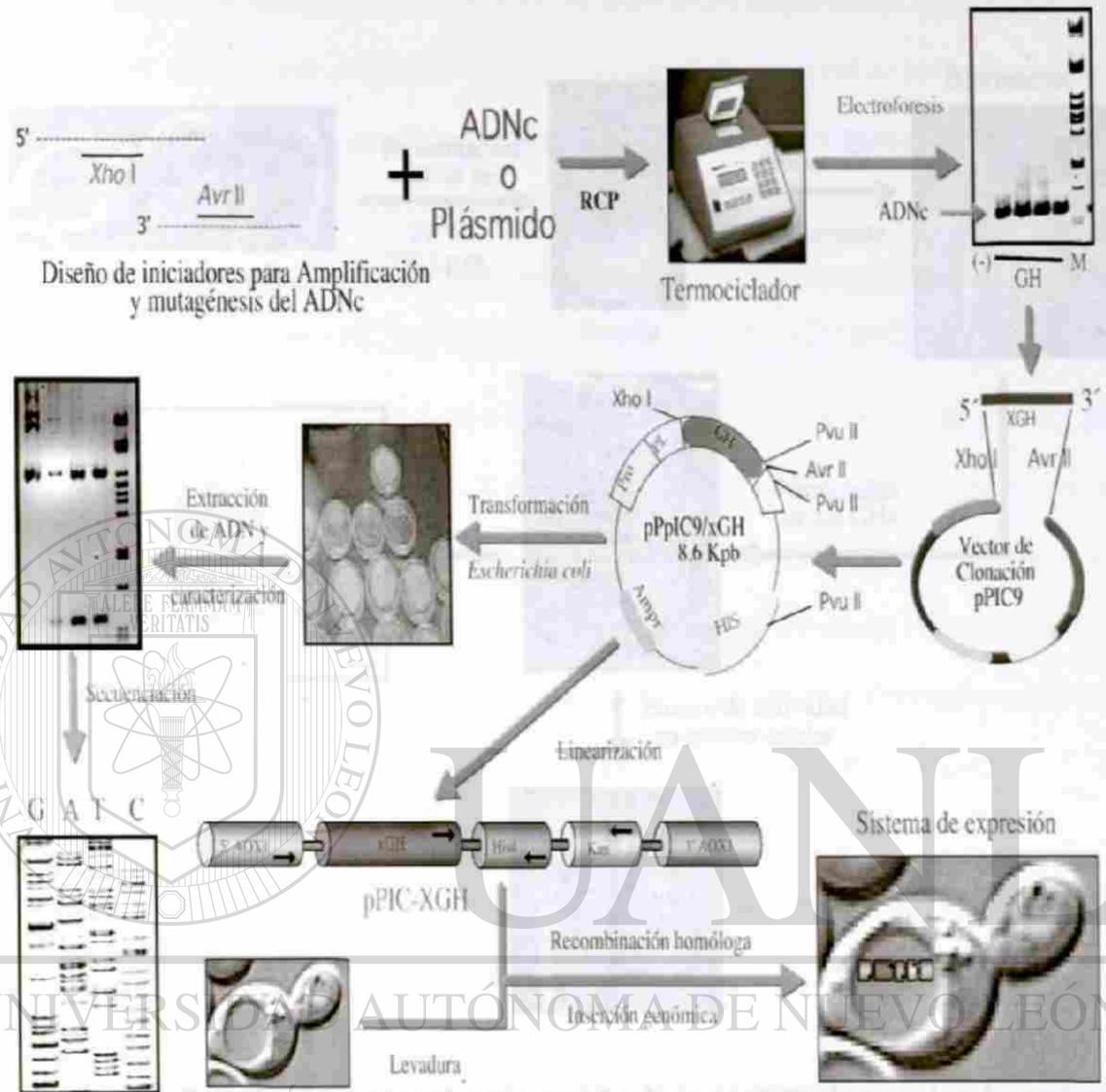
b) Producción en matraz de las hormonas.

c) Escalamiento a biorreactor.

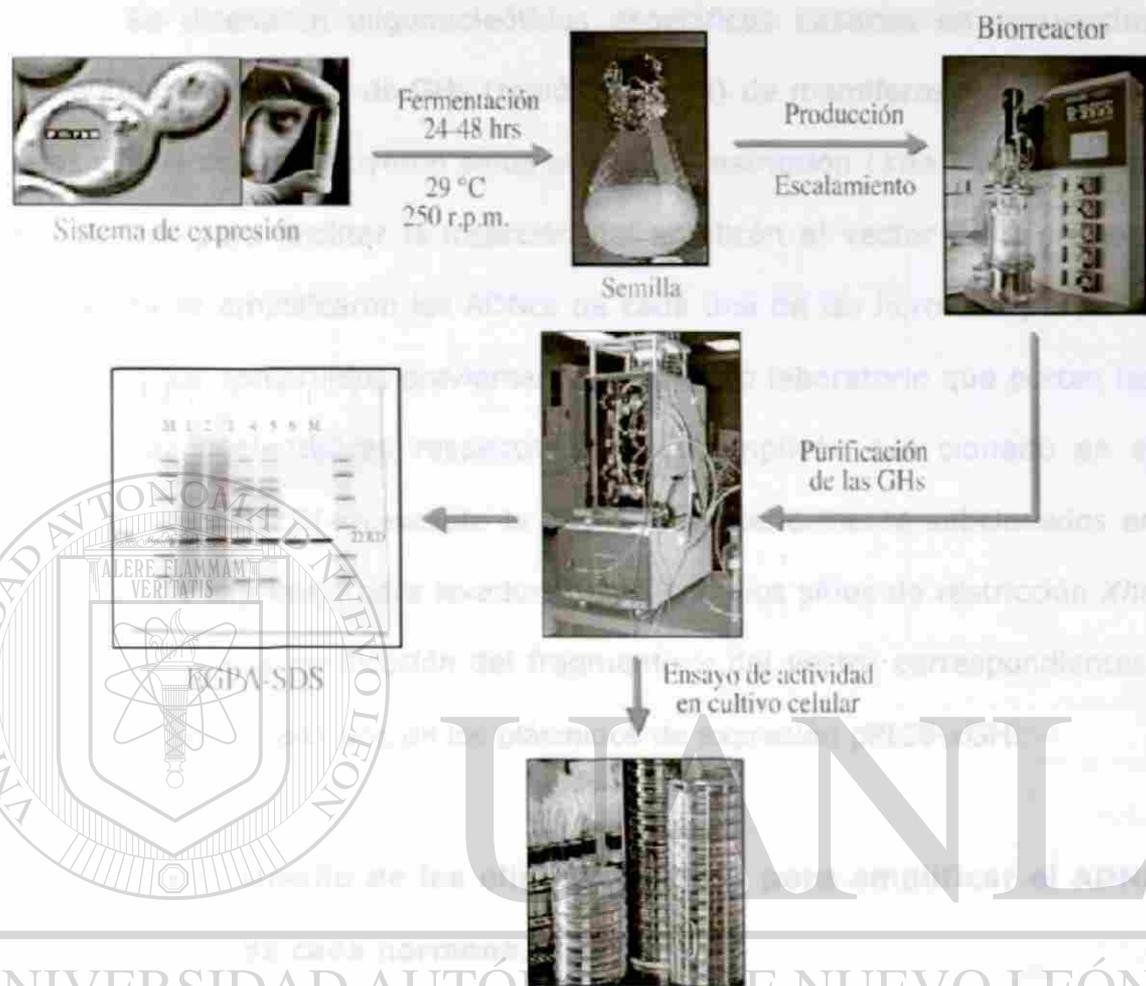
d) Análisis y caracterización de las hormonas producidas.

e) Desarrollo del esquema de semipurificación de las hormonas.

f) Determinación de la actividad biológica de cada hormona.



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

2.2 Construcción de los plásmidos pBS- $\alpha$ GH para cada hormona.

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

**recombinantes.** Se muestran los pasos que se siguieron para la producción y escalamiento de las hormonas recombinantes, su semipurificación y bioensayo de cada una de las distintas hormonas recombinantes.

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

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

### 5.2.1 Diseño de los oligonucleótidos para amplificar el ADNc de cada hormona.

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

TABLA III

## LONGITUD CARACTERÍSTICA DE LAS GHs DE MAMÍFEROS

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

\* Lactógeno Placentario Humano

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

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

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

**TABLA IV**

**CONDICIONES DE LA REACCION DE LA RCP  
EN LA AMPLIFICACION DEL ADNc**

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACION FINAL
Agua ultrapura	10.0 $\mu\text{L}$	Volumen final= 25 $\mu\text{L}$
Amortiguador 10 X	2.5 $\mu\text{L}$	1 X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.5 $\mu\text{L}$	1.5 mM
dNTPs 10 mM	0.75 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{M}$
Oligo 5' 5 $\mu\text{M}$	2.5 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{M}$
Oligo 3' 5 $\mu\text{M}$	2.5 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{M}$
ADNc 10 ng/ $\mu\text{L}$	5.0 $\mu\text{L}$	2.0 ng/ $\mu\text{L}$
ADN Polimerasa Taq (5U/ $\mu\text{L}$ )	0.3 $\mu\text{L}$	0.06 U/ $\mu\text{L}$

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

TABLA V

**CARACTERÍSTICAS DE LOS CICLOS DEL TERMOCICLADOR USADOS EN LA RCP DE LOS ADNcs DE LAS HORMONAS**

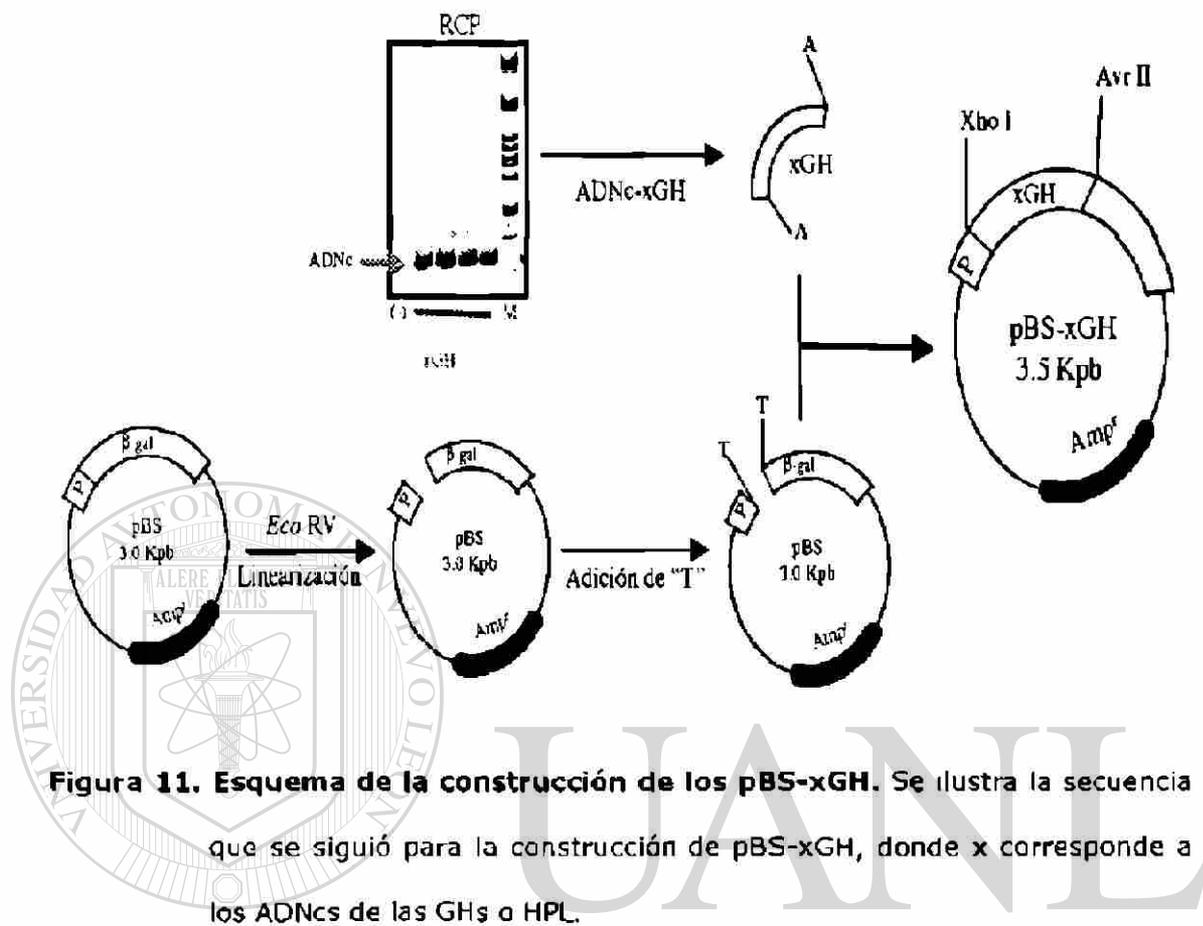
<b>PASO</b>	<b>TEMPERATURA °C</b>	<b>TIEMPO</b>
1	94	5 min.
2	94	30 seg.
3	58	45 seg.
4	72	1 min.
5 (Del 2 al 4)		28 ciclos
6	72	5 min.
7	FIN	

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

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

La clonación se inició con la obtención de ADN plasmídico de pBS II

KS(+) a partir de colonias de *Escherichia coli* (XL1 Blue) portadoras del plásmido con el fin de disponer de suficiente material para el proceso de clonación de los ADNcs según Sambrook y cols., 1989.



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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

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

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

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

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

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

Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  equivalentes a 1  $\mu\text{g}$  de plásmido linearizado y se procedió como se describe en la Tabla VI para la adición de timinas al vector linearizado.

**TABLA VI**  
**CONDICIONES DE REACCIÓN PARA LA ADICIÓN DE "TIMINAS" AL VECTORE pBS LINEARIZADO CON *Eco RV***

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACION FINAL
Agua ultrapura	51.0 $\mu\text{L}$	Volumen final=100 $\mu\text{L}$
ADN pBS II KS(+) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	20.0 $\mu\text{L}$	20 ng/ $\mu\text{L}$
Amortiguador RCP 10x	10.0 $\mu\text{L}$	1 X
Mg Cl <sub>2</sub> 25 mM	8.0 $\mu\text{L}$	2 mM
dTTPs 10 mM	10.0 $\mu\text{L}$	1 mM
ADN Polimerasa Taq (5U/ $\mu\text{L}$ )	1.0 $\mu\text{L}$	0.05 U/ $\mu\text{L}$

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

### 5.2.3.3 Ligación de cada ADNc de GH al vector pBS.

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

**TABLA VII**

**CONDICIONES DE REACCION PARA LA LIGACION DEL ADNc DE CADA HORMONA AL VECTOR DE CLONACION pBS**

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

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

#### **5.2.3.4 Transformación con células calcio-competentes**

##### ***Escherichia coli XL1 Blue.***

Se sembró *Escherichia coli* (XL1-Blue) por estría en una caja con medio LB se incubó a 37°C por 12-14 hrs, se levantó una colonia e inoculó en tubo de ensayo con 4 mL de medio LB a 37°C por 12 hrs con agitación vigorosa. Se inoculó un matraz que contenía 50 mL de LB con una dilución 1:100 del cultivo celular del tubo y se creció hasta una densidad óptica (600 nm) de 0.30-0.35 unidades aproximadamente de 2 a 2.5 hrs. Se colocó el matraz en hielo por 10 min. Se pasaron las bacterias a un tubo Falcon de 50 mL. Se empastillaron las bacterias y decantó el sobrenadante (todo en hielo y en condiciones de esterilidad). Se resuspendió la pastilla en 20 mL de cloruro de calcio 100 mM frío e incubó 20 min. en hielo, se volvió a empastillar y se repitió este último paso. Se empastillaron las células y se ajustaron a un volumen final de 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M por 20 min. y se

transformaron, usando 200 µL de células o bien las guardamos a 4°C por no más de 2 días.

### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

### 5.2.3.5 Selección de colonias portadoras de plásmidos recombinantes.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Se realizaron digestiones preparativas con las enzimas *Xho* I y *Avr*

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

TABLA VIII

## CONDICIONES PARA LA REACCION DE LIGACION DEL ADNc DE CADA HORMONA CON pPIC9

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Agua ultrapura	5.5 $\mu\text{L}$	Volumen final=30 $\mu\text{L}$
Amortiguador de ligación 5X	6 $\mu\text{L}$	1 X
Vector pPIC9 ( <i>Xho</i> I/ <i>Avr</i> II) 20 ng/ $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	6.6 ng/ $\mu\text{L}$
ADNc ( <i>Xho</i> I/ <i>Avr</i> II) 10 ng/ $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	3.3 ng/ $\mu\text{L}$
Ligasa 2 U/ $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	0.13 U/ $\mu\text{L}$

La ligación se llevó a cabo a 16 °C durante toda la noche. Una vez verificada ésta por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, 1 y 3  $\mu\text{l}$  de la reacción de ligación entre pPIC9 y cada ADNc fueron utilizados para

transformar células  $\text{Ca}^{++}$  competentes de *Escherichia coli* XL1-Blue.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 5.3.1 Hormona del crecimiento canino (CFGH).

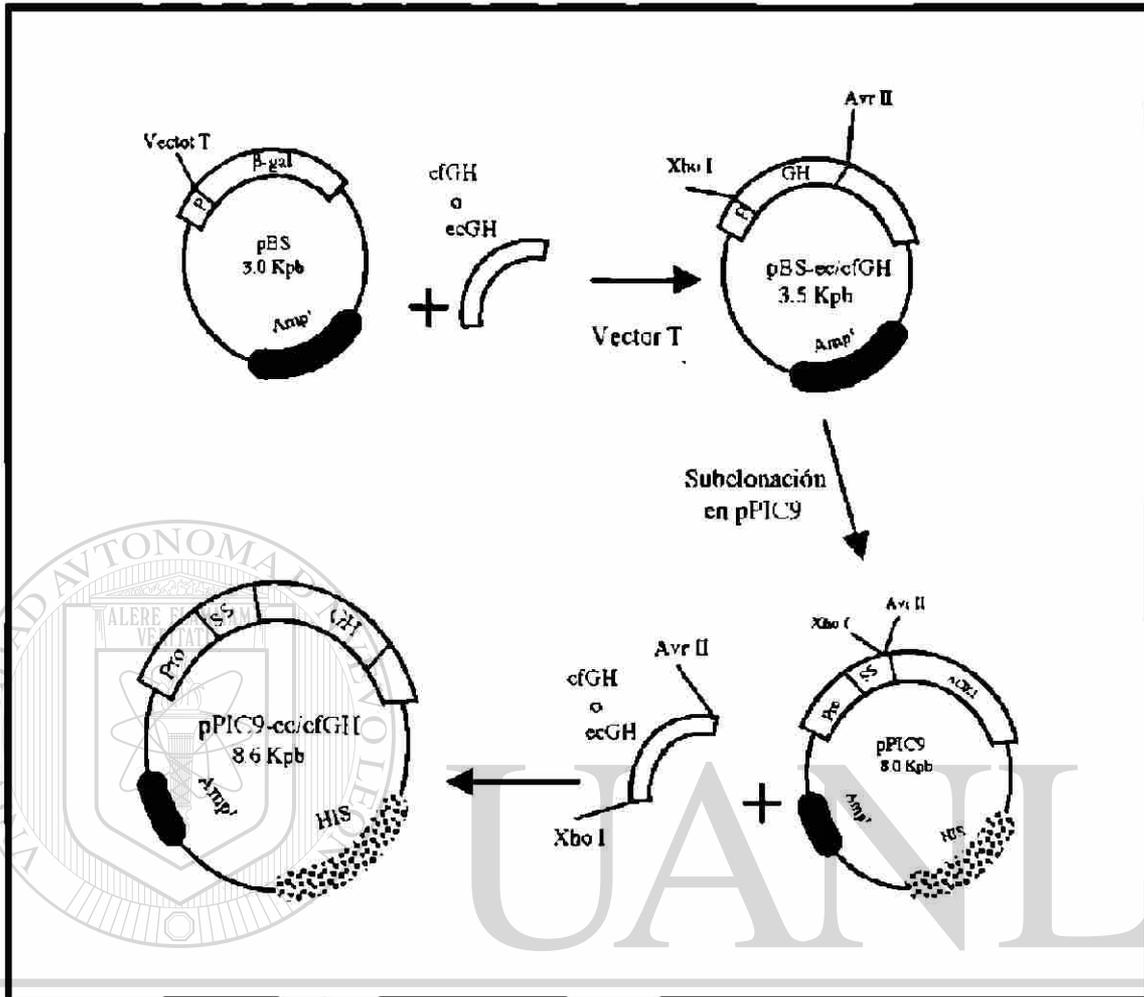
Se diseñaron oligonucleótidos específicos basados en secuencias nucleotídicas consenso de GHs de mamíferos relacionados, a los cuales se les incluyeron sitios extras de restricción (*Xho* I y *Avr* II) en sus flancos para facilitar la inserción del amplicón al vector de expresión. Con éstos se amplificó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

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

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

### 5.3.2 Hormona del crecimiento equino (ECGH).

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



**Figura 12. Construcciones de los vectores de expresión pPIC9-cfGH y pPIC9-ecGH.** Una vez recuperados los ADNcs correspondientes, se

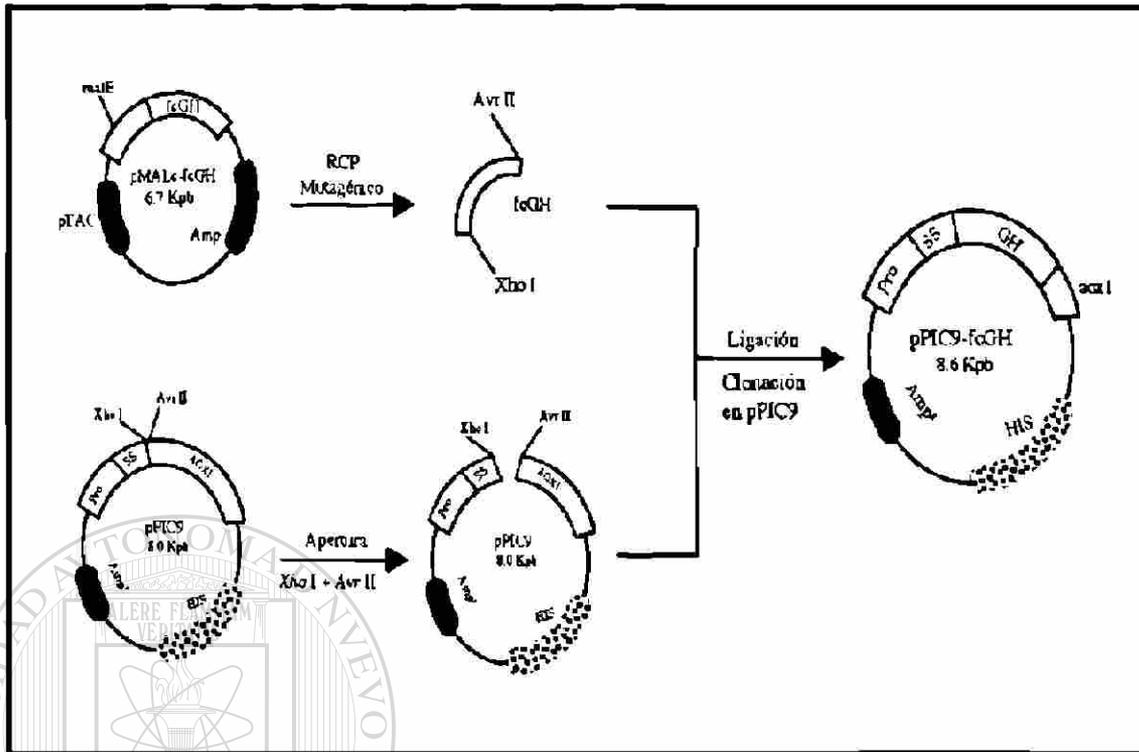
clonaron en pBS donde fueron secuenciados y luego se transfirieron a pPIC9. Pro= Promotor de la alcohol oxidasa 1. SS= Secuencia señal del factor  $\alpha$  de apareamiento de *Saccharomyces cerevisiae*. aox1= parte del gen de la alcohol oxidasa. HIS= Gen de la histidinol deshidrogenasa. y Amp<sup>r</sup>= gen de resistencia a ampicilina,

### 5.3.3 Hormona del crecimiento felino (FCGH).

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

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

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

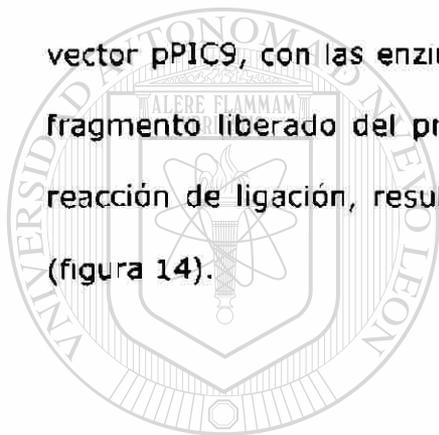


**Figura 13. Construcción del vector de expresión pPIC9-fcGH.** Se amplificó por la RCP el ADNc de la GH del gato, al cual se le incluyeron sitios de restricción *Xho* I y *Avr* II para facilitar la clonación, misma que se consiguió al digerir el producto amplificado con las enzimas mencionadas y poniéndolo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

#### 5.3.4 Lactógeno placentario humano (HPL).

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

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

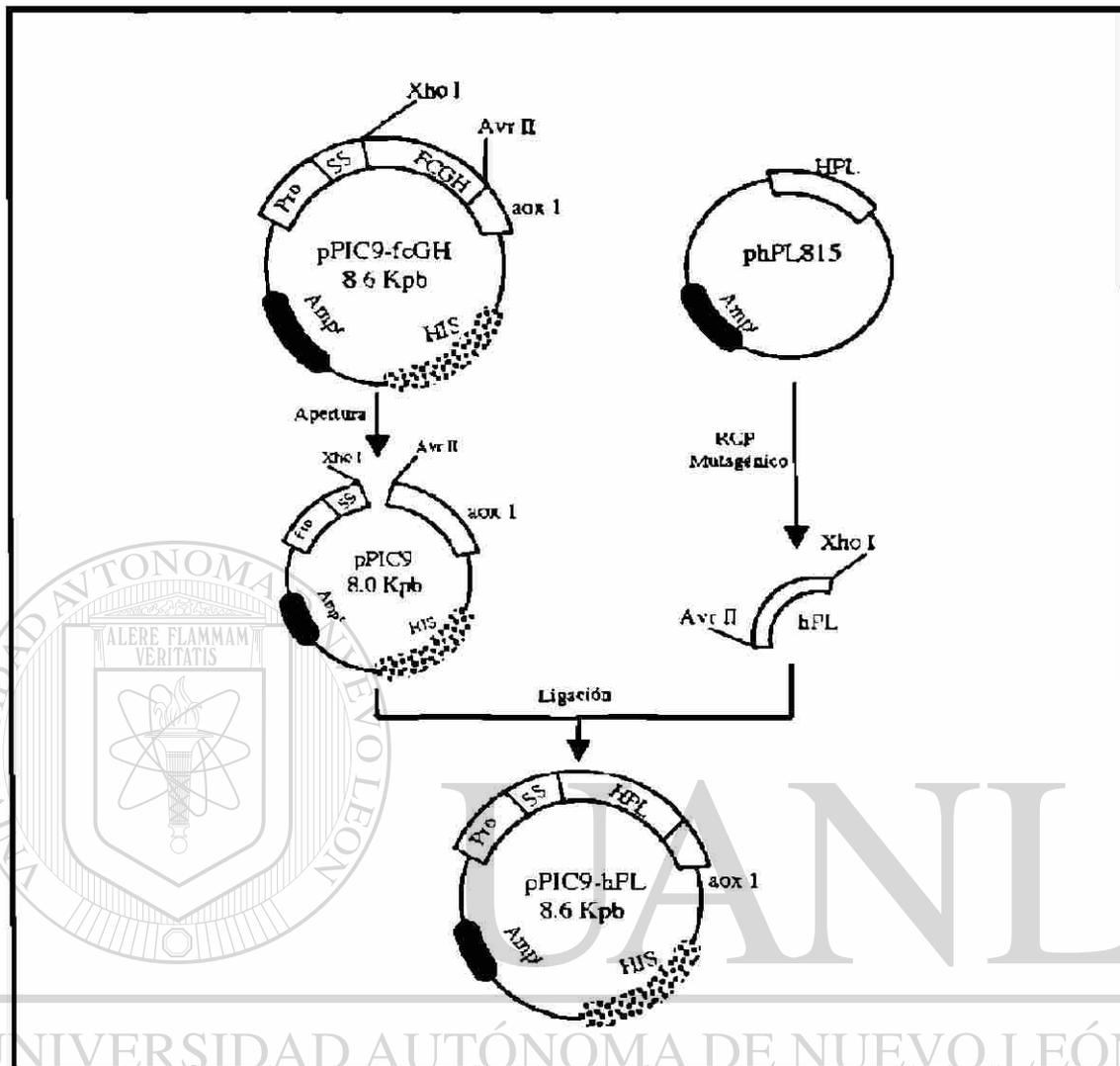


# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

### **a) Selección de colonias portadoras de plásmidos recombinantes.**

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

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

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

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

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

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

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

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **5.4.2.1 Extracción de ADN genómico de las levaduras transfectadas.**

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

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

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

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

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

#### **5.4.2.2 Detección del "casete" de expresión por RCP.**

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

### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

TABLA IX

**CONDICIONES DE LA RCP PARA EVIDENCIAR LA INSERCIÓN DEL  
"CASETE" DE EXPRESIÓN DE CADA HORMONA EN EL  
GENOMA DE *Pichia pastoris***

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACION FINAL
Agua ultrapura	14.0 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
Amortiguador 10 X	2.5 $\mu\text{l}$	1 X
Mg Cl <sub>2</sub> 25 mM	1.5 $\mu\text{L}$	1.5 mM
dNTPs 10 mM	0.75 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{M}$
Oligo 5' 5 $\mu\text{M}$	2.5 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{M}$
Oligo 3' 5 $\mu\text{M}$	2.5 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{M}$
ADN 200 ng/ $\mu\text{L}$	1.0 $\mu\text{L}$	8.0 ng/ $\mu\text{L}$
ADN Polimerasa Taq (5U/ $\mu\text{L}$ )	0.3 $\mu\text{L}$	0.06 U/ $\mu\text{L}$

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

TABLA X

PROGRAMA DE AMPLIFICACION PARA LOS INICIADORES *αox1*

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

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

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

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

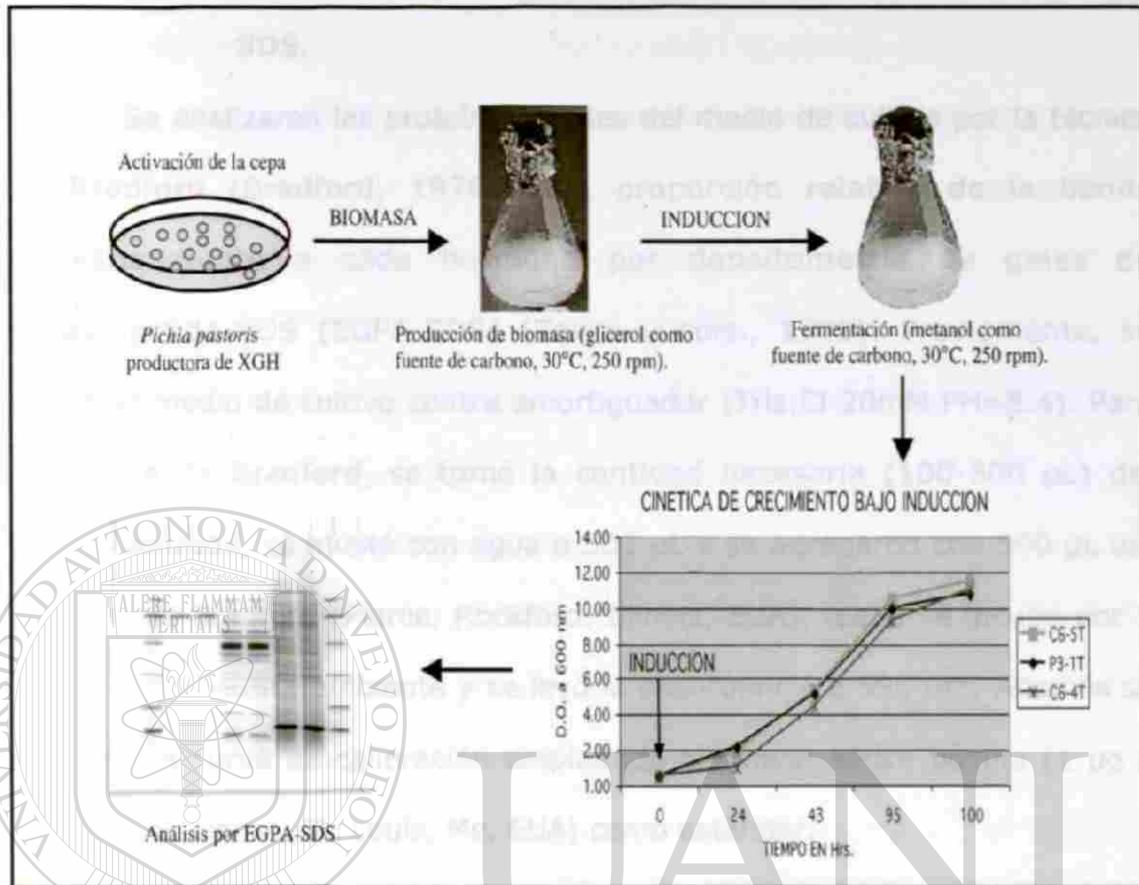
### **5.6 Análisis del fenotipo Mut<sup>+</sup> o Mut<sup>-</sup> de las construcciones.**

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 5.9 Escalamiento de la producción en biorreactor.

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

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

### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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



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

ilustran las etapas del proceso biotecnológico de producción, desde la preparación del fermentador y del medio, hasta el análisis de las proteínas en el medio de cultivo fermentado.

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

#### **5.9.1 Etapa de preparativos:**

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

#### **5.9.2 Etapa de Preinóculo:**

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

#### **5.9.3 Etapa de inoculación:**

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

#### **5.9.4 Etapa de lote alimentado con glicerol:**

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

#### **5.9.5 Etapa de inducción de lote alimentado con metanol:**

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

#### **5.9.6 Etapa de cosecha:**

Se cosecha el caldo de cultivo y se hacen los análisis de muestras. Por centrifugación se separa la biomasa del caldo en donde se encuentra la hormona recombinante. Este se procesa sometiéndolo a ultradiálisis y ultraconcentración, por último se liofiliza el ultraconcentrado.

### 5.10 Métodos y parámetros evaluados:

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

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

Se dedicó especial atención al control de los siguientes parámetros:

#### **Control del fermentador.**

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

#### **Control de oxígeno disuelto en el biorreactor.**

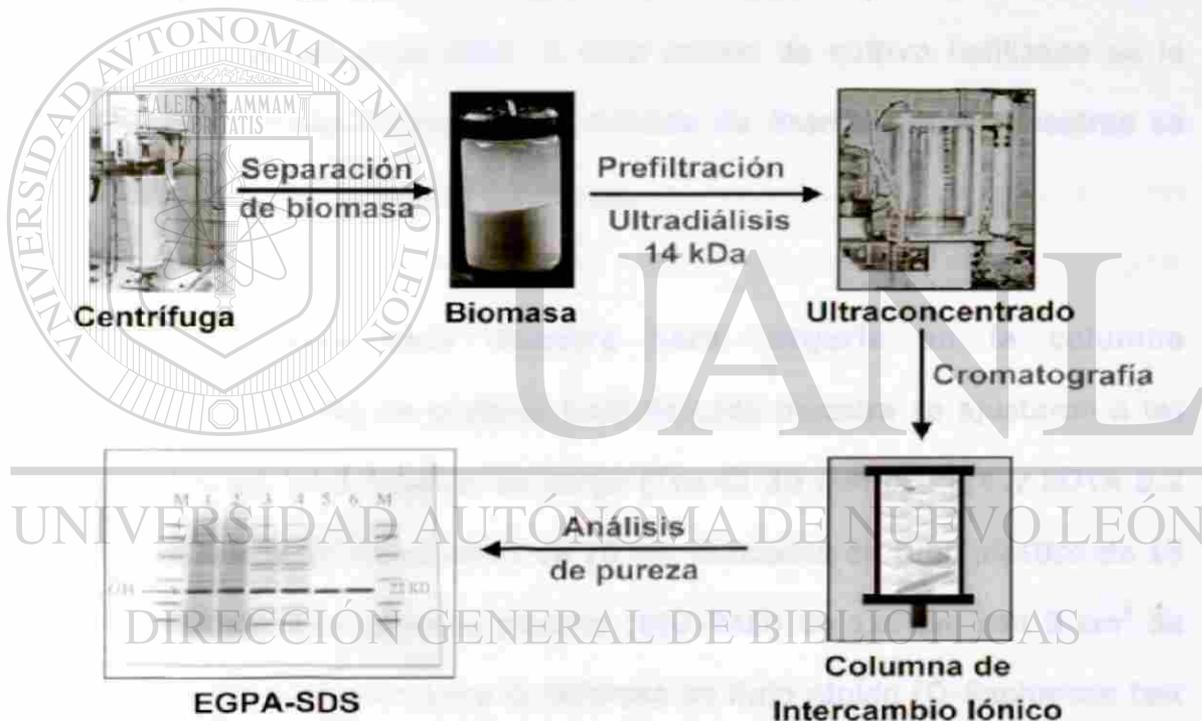
- a) Primera etapa: aire-agitación.
- b) Segunda etapa: aire-oxígeno.
- c) Tercera etapa: oxígeno-agitación.

**Control microbiológico.**

- Esterilidad de medios.
- Esterilidad de adiciones.
- Esterilidad de muestras.

**5.11 Semipurificación de las hormonas recombinantes.**

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



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

separó el medio de cultivo de la biomasa por centrifugación, se prefiltró en membrana de  $0.45 \mu\text{m}$ , se ultradializó con membrana con corte de  $10 \text{ kDa}$ , se pasó por la columna de intercambio aniónico (QS-FF), se analizó la pureza en EGPA-SDS, se cuantificó y por último se liofilizó y almacenó para su uso posterior.

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

Se preparó cada muestra para cargarla en la columna cromatográfica. 5 mg de proteína total de cada muestra se ajustaron a las condiciones del amortiguador de carga (Tris-Cl 20 mM pH=8.4 y EDTA 0.2 mM), dejándolas en un volumen de 10 mL colocados en tubo plástico de 15 mL. Se empacó una columna plástica (BIO-RAD) de 1x9 cm<sup>3</sup> de resina de intercambio aniónico Q-Sepharosa de flujo rápido [Q-Sepharose fast flow (QS-FF)], el llenado de la columna con la resina, se hizo a flujo de gravedad.

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

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

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

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

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

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

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

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

### 5.12 Ensayo de la actividad biológica de las hormonas.

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

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

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

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

Para iniciar el ensayo, se cosecharon las células por centrifugación a 3000 r.p.m. por 5 min., y se pasaron a medio de ensayo, mismo medio mencionado pero sin SFB, dejándolas ajustadas de manera que no rebasen de  $1.0 \times 10^6$  células/mL. Se hicieron los cálculos para colocar 15,000 células

Nb2 por posillo de manera que junto con el volumen de las muestras a probar se ajustaran a un volumen final de 100  $\mu$ L y se incubaron por 72 hrs.

Las concentraciones que se probaron fueron 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 50 nM de las siguientes hormonas, CFGH, ECGH, FCGH, HGH, HPL y RPRL. Después de concluido el tiempo del ensayo, se procedió a medir el efecto de las hormonas sobre la proliferación celular por el ensayo de sales de tetrazolio (MTT).

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

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

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

El bioensayo se llevó a cabo por triplicado bajo condiciones de atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>-95% aire a la temperatura de 37°C. Pasado el periodo de incubación de 3 días, se agregaron 10 µL de MTT (a la concentración final de 0.5 mg/mL) a cada pozo. Se incubaron las muestras por 4 hrs bajo las condiciones atmosféricas mencionadas. Pasado este tiempo, se le agregaron 100 µL de la solución solubilizante del formazán (10% SDS en 0.01 M HCl) a cada uno de los pozos. Y se dejaron incubando por toda la noche bajo las mismas condiciones atmosféricas. Se verificó que el precipitado de los cristales púrpuras de formazán se hubieran disuelto completamente y se midió la absorbancia a 590 nm utilizando un lector de placas de elisa (BIO-RAD).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Iniciadores del ADNc de cada hormona.

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

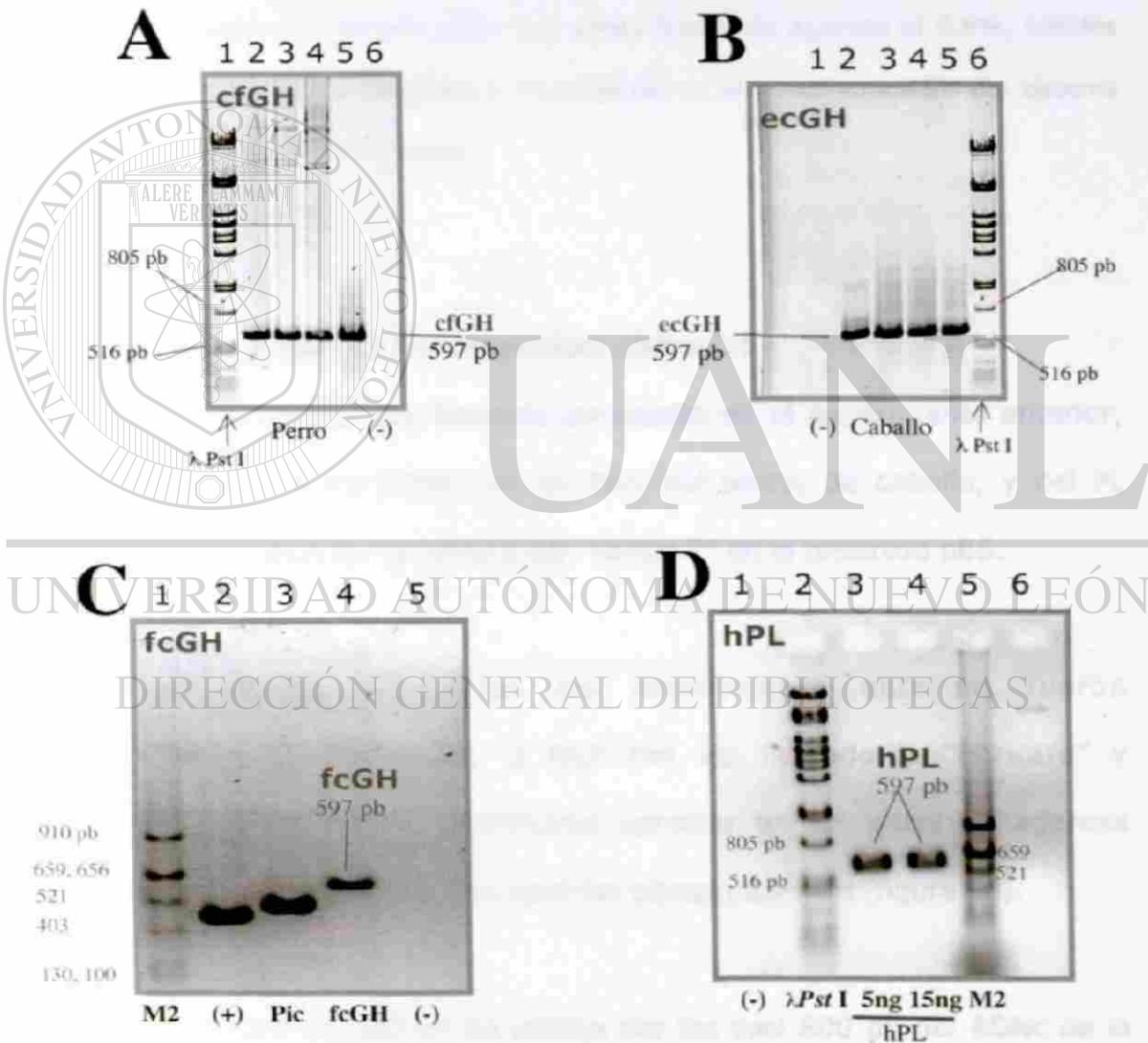
5'- CAG CTC GAG AAA AGA TTC CC C GCC ATG CCC TTG TC

e d - 3'- GGC CCT AGG CTA GAA GGC GCA GC  
A r I

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

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

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



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

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

### 6.3 Construcción de los plásmidos pBS-xGH.

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

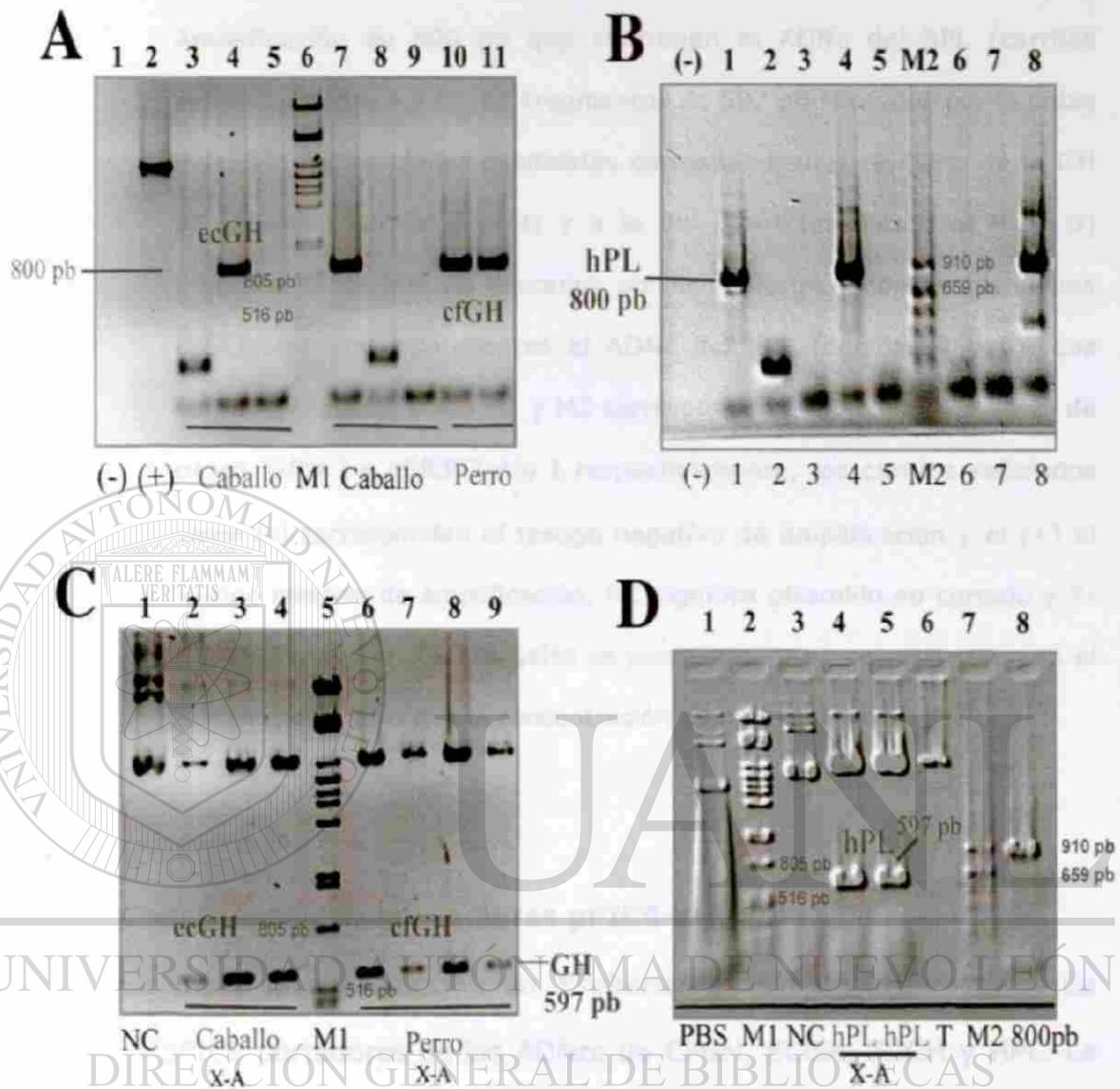
Las clonas resultantes del experimento anterior, fueron primeramente tamizadas por la RCP con los iniciadores "Forward" y "Reverse" para el vector, pudiéndose apreciar en los geles de agarosa amplicones de 800 pb, esperados para las clonas pBS-xGH (figura 20).

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

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

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

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

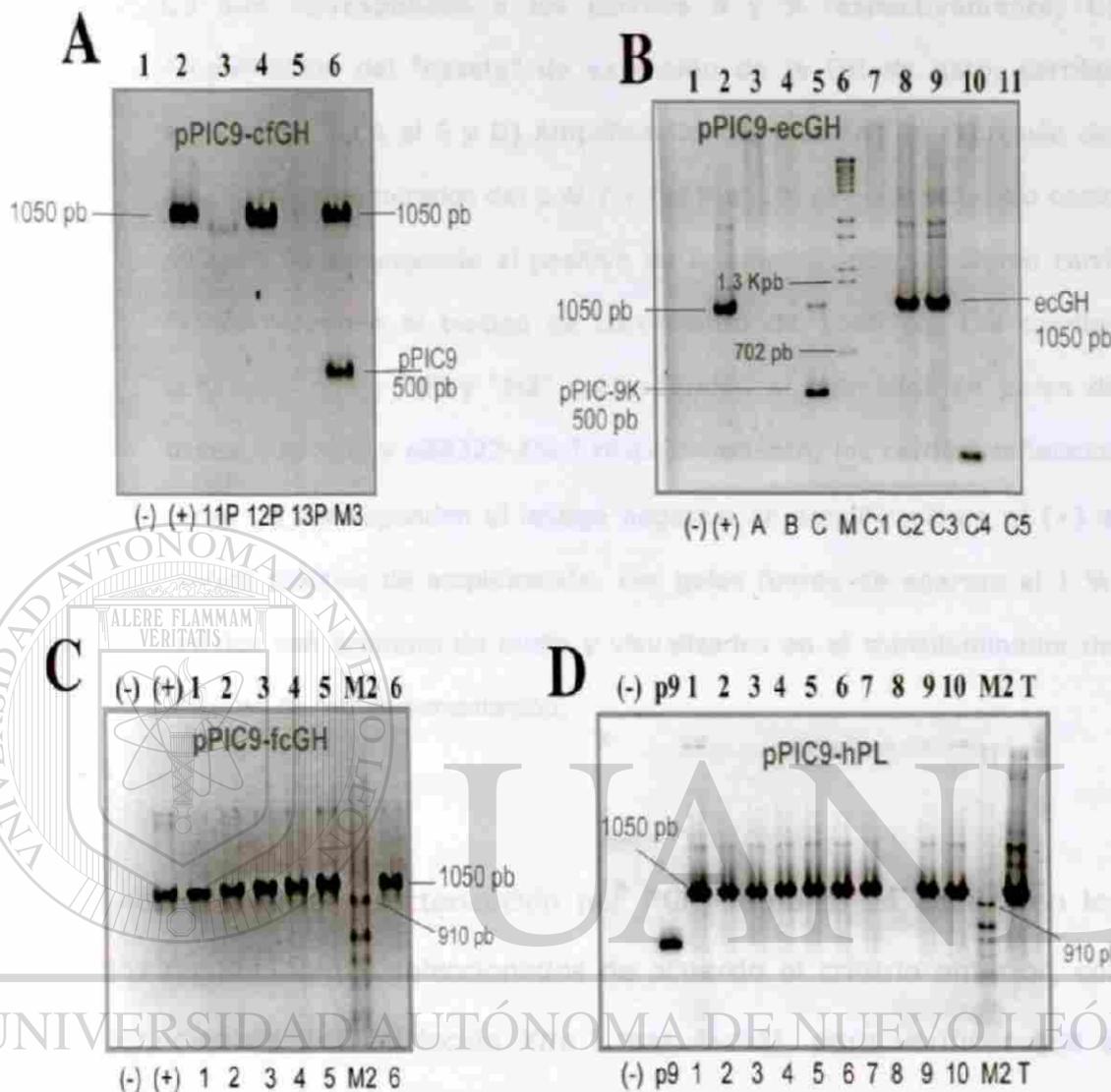


**Figura 20. Detección y caracterización de pBS-cfGH (ecGH y hPL).** En los geles superiores A) y B) se muestran los productos de la RCP a nivel de 800 pb que indican las clonas candidatas. En los geles inferiores C) y D) se corroboran las clonas candidatas cuando se someten a doble digestión con las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

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

#### 6.4 Construcción de los vectores pPIC9-xGH.

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



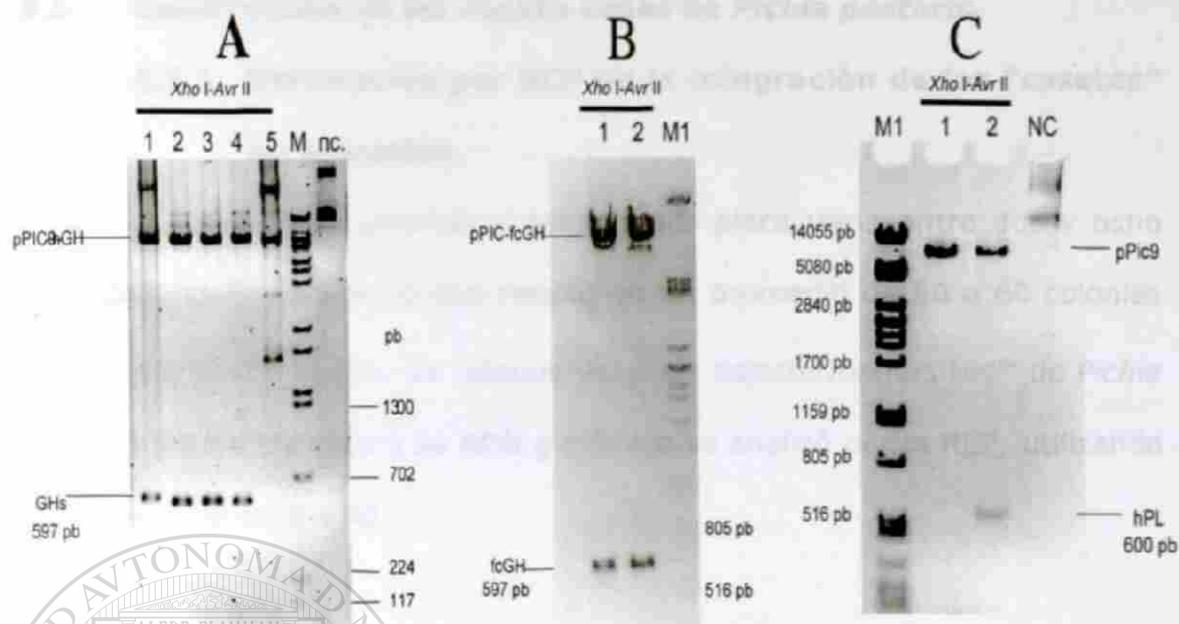
**Figura 21. Detección por RCP de las clonas con pPIC9-xGH.** Se aprecian en

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

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

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

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



**Figura 22. Caracterización de pPIC9-cfGH, pPIC9-ecGH, pPIC9-fcGH y pPIC9-hPL.** Caracterización con las enzimas de restricción *Xho* I más *Avr* II de las construcciones en pPIC9 para los plásmidos portadores de los ADNcs de las GHs mencionadas. Nótese en todos los casos la

liberación a partir de cada construcción pPIC9-xGH de un fragmento a nivel de los 597 pb correspondiente al ADNc de cada hormona. A) el carril H=GH de humano, CF=GH de perro, EC=GH de caballo. B) carriles 1 y 2 corresponden a la GH de gato y C) carril 1=pPIC9 linearizado, 2=lactógeno placentario humano. M=marcador de pares de bases  $\lambda$ -*Bste* II y M1= marcador de pares de bases  $\lambda$ -*Pst* I, y NC=plásmido no cortado. Los gels fueron de agarosa al 1 %, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en el transiluminador del sistema de fotodocumentación.

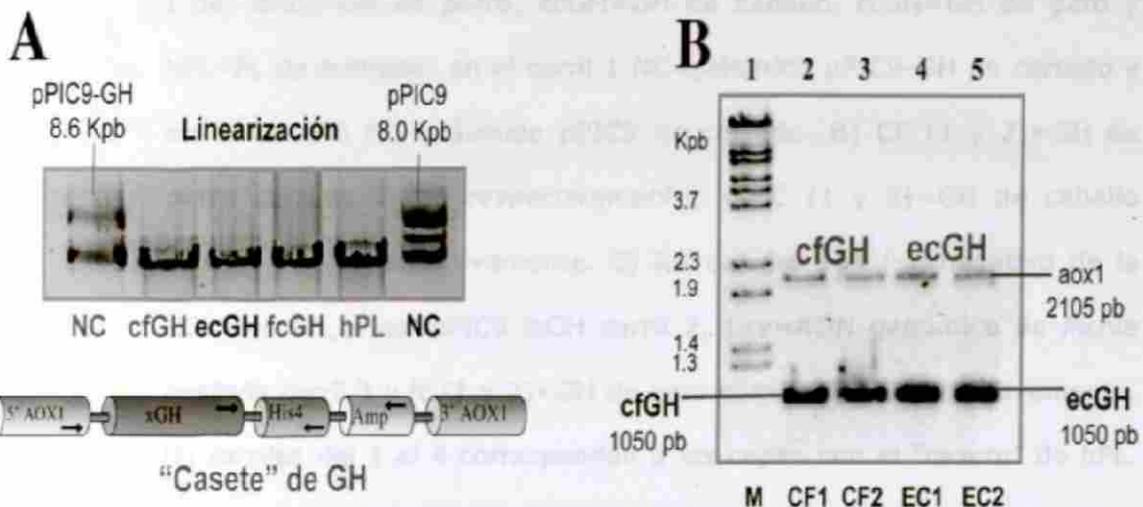
## 6.5 Construcción de las nuevas cepas de *Pichia pastoris*.

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

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

La verificación de la integración al genoma de la levadura de los "casetes" de expresión de las hormonas se logró al constatar en geles de agarosa que la reacción de amplificación resultaba en una banda de 1050 pb, que corresponde al "casete" de expresión de la hormona en cuestión para cada caso, y otra de 2105 pb que corresponde al gen endógeno aox1 del genoma de *Pichia pastoris*.

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



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

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

## 6.6 Construcción de la cepa testigo negativo de expresión.

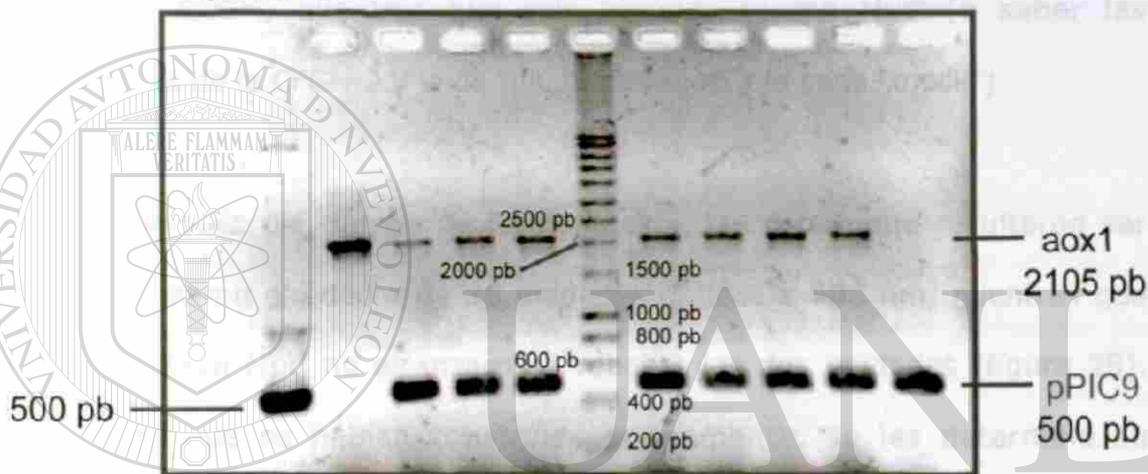
La introducción por recombinación homóloga del "casete" vacío de pPIC9 (figura 24) a la levadura generó varias cepas "mock" capaces de crecer bajo la inducción del metanol, pero sin la producción de proteína recombinante alguna. Esto con el fin de utilizar este tipo de cepas como referencia en la producción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

Fig. 24. Identificación del fenotipo *His4* de cada cepa.



**B**

(-) (+) Gen 1 2 3 ME 4 5 6 7 8



**Figura 24. Identificación de las clonas "mock" (testigo negativo de**

**expresión) de *Pichia pastoris*.** A). La imagen ilustra la estructura del "casete" vacío (sin el ADNc de la hormona) de pPIC9 que se integró en el genoma de las cepas "mock". B). En los carriles numerados del 1 al 8 se muestran los productos de la RCP amplificados con los iniciadores *aox1* a partir de ADN genómico, (-)= testigo negativo de la RCP, (+)=testigo positivo de RCP (pPIC9), Gen=ADN genómico de *Pichia pastoris* y ME=marcador de pares de bases (Escala de 200 pb). La banda de 2105 pb corresponde al gen *aox1* endógeno y la de 500 pb al "casete" vacío de pPIC9 (Gel de agarosa al 1%).

### 6.7 Identificación del fenotipo Mut de cada cepa.

Del análisis del crecimiento de las cepas durante una fermentación de 100 hrs alimentada con metanol al 0.5% permitió identificar el fenotipo Mut de cada cepa.

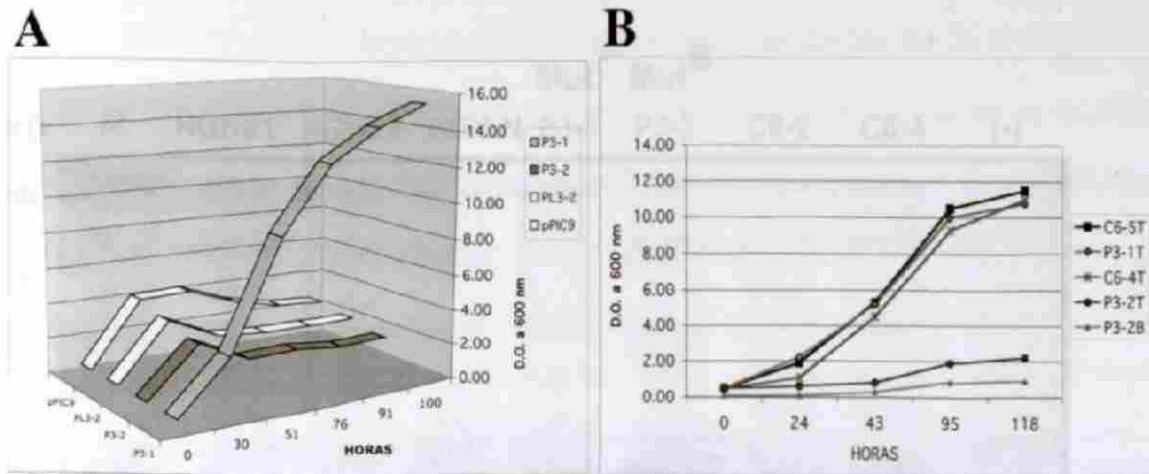
Las cepas de *Pichia pastoris* que presentaron fenotipo Mut<sup>+</sup> fueron la mayoría, siendo las siguientes: CFGH-1, HGH 22 kDa, HGH 20 kDa, HGH-V, BGH y la ECGH; mientras que solo algunas fueron Mut<sup>-</sup> (a saber las productoras de la CFGH-2 y la de HPL, incluyendo a la cepa "mock").

Después del tiempo de fermentación, las cepas que resultaron ser Mut<sup>+</sup> alcanzaron alrededor de 15 unidades ópticas a 600 nm, mientras que las que fueron Mut<sup>-</sup> no alcanzaron a rebasar las dos unidades (figura 25). Las cepas que se habían construido previamente, se les determinó su fenotipo Mut cuando se fermentaron en el biorreactor.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



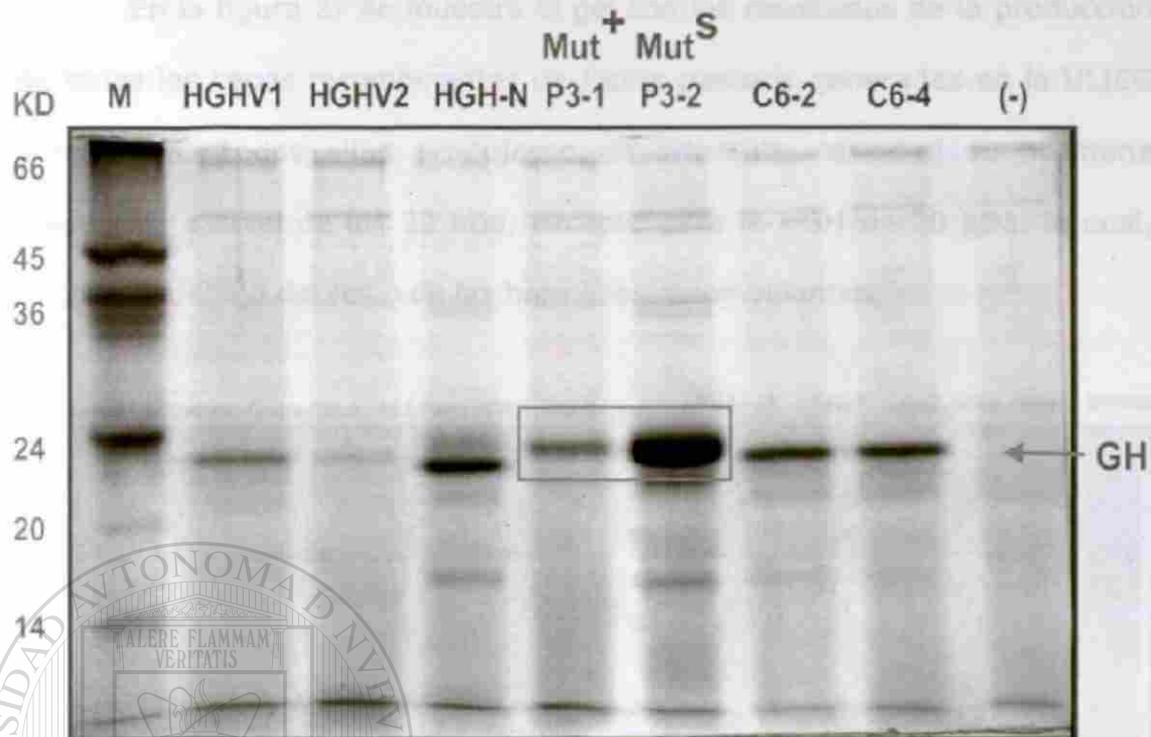
**Figura 25. Caracterización del fenotipo Mut en las cepas de *Pichia pastoris*.**

Cinética de crecimiento en medio mínimo utilizando metanol como única fuente de carbono. La inducción se arrancó a la densidad de 0.5 U y terminó después de aproximadamente 100 hrs. A) gráfica de las muestras P3-1 y 2=GH de perro cepas 1 y 2, PL3-2=PL humano cepa 2 y pPIC9=cepas "mock" con el plásmido pPIC9. B) gráfica de las muestras C6-5T=GH de caballo, P3-1T=GH de perro, C6-4T=GH de caballo, P3-2T=GH de perro y P3-2B=GH de perro.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

### 6.8 Producción y análisis a nivel matraz de las hormonas.

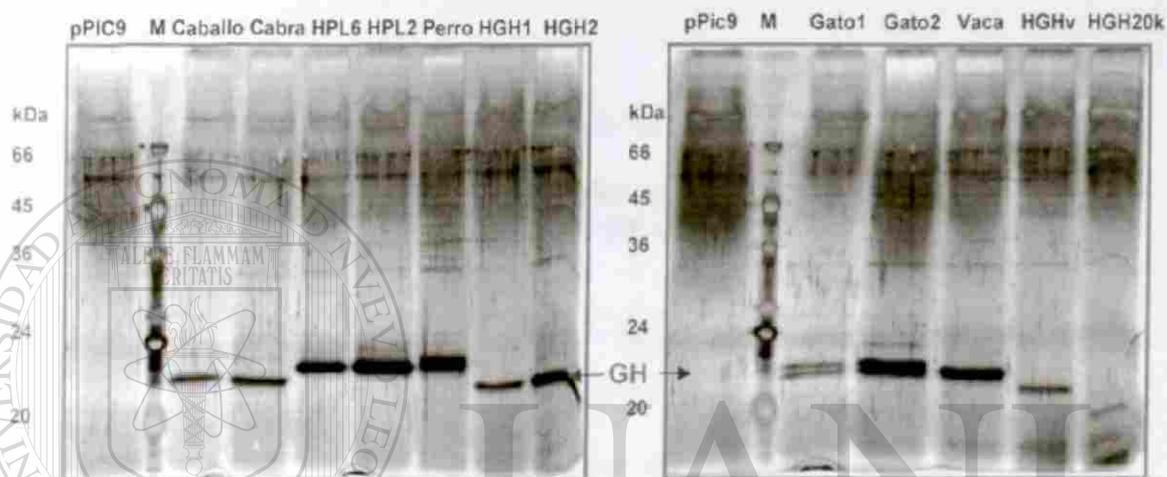
Al analizar los geles de poliácridamida de las proteínas de los medios de cultivo de cada cepa, se pudo observar que todas las construcciones produjeron la hormona recombinante en cuestión en mayor o menor cantidad. Para el caso particular de la CFGH se observó que la cepa con fenotipo Mut<sup>s</sup> resultó con una mayor producción de la proteína recombinante que su contraparte Mut<sup>+</sup>. Las cepas de la HGH-V resultaron ser las menos productoras (figura 26).



**Figura 26. Producción en *Pichia pastoris* de las GHs (CFGH, HGH, HGH-V y ECGH) recombinantes.** Se aprecian las bandas sobresalientes de proteínas correspondientes a las GHs en cuestión a nivel de 22 kDa,

provenientes de los medios de cultivo inducidos con metanol. Los carriles son: M=marcador de peso molecular, HGHV1=HGH variante cepa 1, HGHV2=HGH variante cepa 2, HGH=HGH normal hipofisiaria de 22 kDa, P3-1=GH de perro cepa 1, P3-2=GH de perro cepa 2, C6-2=GH de caballo cepa 2, C6-4=GH de caballo cepa 4 y el último carril identificado como (-)=testigo negativo de la RCP. Mut<sup>+</sup>=“methanol utilization plus”, Mut<sup>S</sup>=“methanol utilization slow”. Nótese la banda sobresaliente de la P3-2 correspondiente al fenotipo Mut<sup>S</sup>, comparada con la de menor intensidad de la Mut<sup>+</sup>. Gel de poliacrilamida-SDS al 15% teñido con azul de Coomassie.

En la figura 27 se muestra el gel con los resultados de la producción de todas las cepas recombinantes de *Pichia pastoris* generadas en la ULIEG a la fecha. Todas ellas produjeron en diferente cantidad su hormona respectiva a nivel de los 22 kDa, excepto para la HGH de 20 kDa, la cual, migró por debajo del resto de las hormonas recombinantes.



**Figura 27. Producción en matraz de todas las cepas productoras de las hormonas recombinantes.** En todos los casos se puede apreciar una

banda sobresaliente (excepto para HGH 20 kDa) a nivel de los 22 kDa correspondiente a cada hormona, éstas se aprecian en su carril respectivo indicado en cada caso por su nombre e imagen. En los carriles del gel de la izquierda se muestran las proteínas de los medios de cultivo con las hormonas recombinantes: caballo=ECGH, cabra=CHGH, HPL (6 y 2)= lactógeno placentario humano clona 6 y 2, perro=CFGH y HGH (1 y 2)=GH de humano clona 1 y 2. En el gel de la derecha se muestran los carriles de: gato (1 y 2)=GH de gato clona 1 y 2, vaca=BGH, HGHv=HGH variante placentaria y HGH20k=isoforma de la HGH de 20 kDa. El carril pPIC9 se refiere a la cepa de *Pichia pastoris* "mock". Los geles son de EGPA-SDS al 15% teñidos con plata.

Además, también se estimó por densitometría de cada gel, el porcentaje de cada hormona recombinante en el medio de cultivo. Para esto se utilizó el software del Gel-Doc de BIO-RAD y el programa ImageJ. En la tabla XI se muestran los resultados de las estimaciones del porcentaje de cada hormona en relación a las proteínas de fondo de *Pichia pastoris*.

TABLA XI

**ESTIMACION DEL PORCENTAJE DE CADA HORMONA  
EN EL MEDIO DE CULTIVO**

Cepa	% de Hormona
HPL	65
CFGH	60
HGH 22 kDa	30
ECGH	30
BGH	25
FCGH	25
CHGH	25
HGH 20 kDa	12
HGH-V	8

## 6.9 Escalamiento a biorreactor de la producción de las hormonas.

Se escaló la fermentación de las cepas recombinadas a nivel de biorreactor de 1 litro. Las pruebas incluyeron a las cepas productoras de las GHs del perro, caballo, humano, vaca, gato y el PL humano. Además, se hicieron las primeras pruebas para la estandarización de la producción en biorreactor del resto de las GHs, la variante placentaria humana de 22 kDa, la isoforma hipofisaria humana de 20 kDa y la GH de la cabra (resultados no mostrados).

En las figuras de la 28 a la 33 se muestran los resultados del desarrollo de las fermentaciones para cada cepa, donde se analizó: la producción de cada hormona recombinante a través del tiempo (vista en geles de poliacrilamida); las curvas de crecimiento indicando la producción de biomasa en g/L, la densidad óptica y las proteínas totales en mg/L. Los parámetros controlados por el biorreactor obtenidos en el transcurso de la fermentación (agitación de 200 a 1,000 r.p.m., temperatura constante a 30° Celsius, oxígeno disuelto por arriba del 30% y pH de 5 a 4. Y por último, la producción de proteína total en mg/L, el porcentaje de la hormona recombinante en relación a las proteínas de fondo propias de *Pichia pastoris* y la producción final obtenida en mg/L de la hormona en cuestión.

A continuación se describen los resultados particulares para cada uno de los seis procesos de fermentación en biorreactor de cada cepa de *Pichia pastoris* productoras de las GHs canina, humana, equina, felina y bovina, y del lactógeno placentario humano.

### **6.9.1 Proceso y desarrollo de la fermentación en biorreactor para la CFGH.**

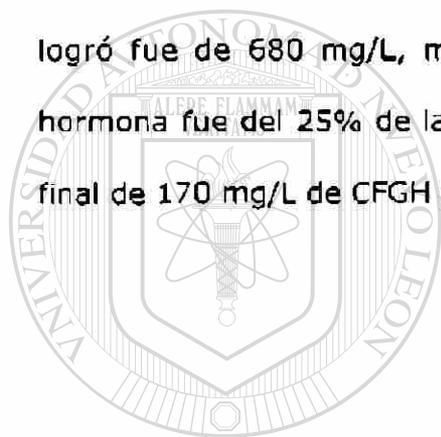
En el gel de poliacrilamida de la figura 28 se aprecian las proteínas encontradas en el medio de cultivo. El primer carril corresponde a las proteínas propias de la levadura, ya que la muestra fue tomada antes de la inducción con metanol. El resto de los carriles corresponden a las muestras inducidas con metanol, donde se indica la banda sobresaliente del resto de las proteínas de *Pichia pastoris* y que corresponde a la CFGH a nivel de 22 kDa.

El tiempo que duró la inducción fue de 70 hrs. En la gráfica de la curva de crecimiento se observa cómo la levadura va adquiriendo biomasa a través del tiempo, logrando una alta concentración correspondiente a un peso húmedo superior a los 450 g/L. También se logró un alta densidad celular correspondiente a 500 unidades ópticas a 600 nm.

Respecto a la gráfica de los parámetros controlados en el biorreactor, se muestra el comportamiento de cada uno: el pH inicia a 5 y posteriormente se bajó a 4 para disminuir el efecto de las proteasas; la

agitación va subiendo a lo largo del tiempo para ayudar a que se mantenga el oxígeno disuelto; la temperatura se mantuvo constante a 30° Celsius; la línea correspondiente al oxígeno disuelto fue la que mas varió, debido al metabolismo de la levadura (se trató de mantener por arriba del 20 %; esta curva de oxígeno es típica de los fenotipos Mut<sup>s</sup>, como correspondió a esta cepa productora de la CFGH).

La concentración de proteínas totales en el medio de cultivo que se logró fue de 680 mg/L, mientras que el porcentaje correspondiente a la hormona fue del 25% de las proteínas totales, obteniéndose una producción final de 170 mg/L de CFGH (figura 28).

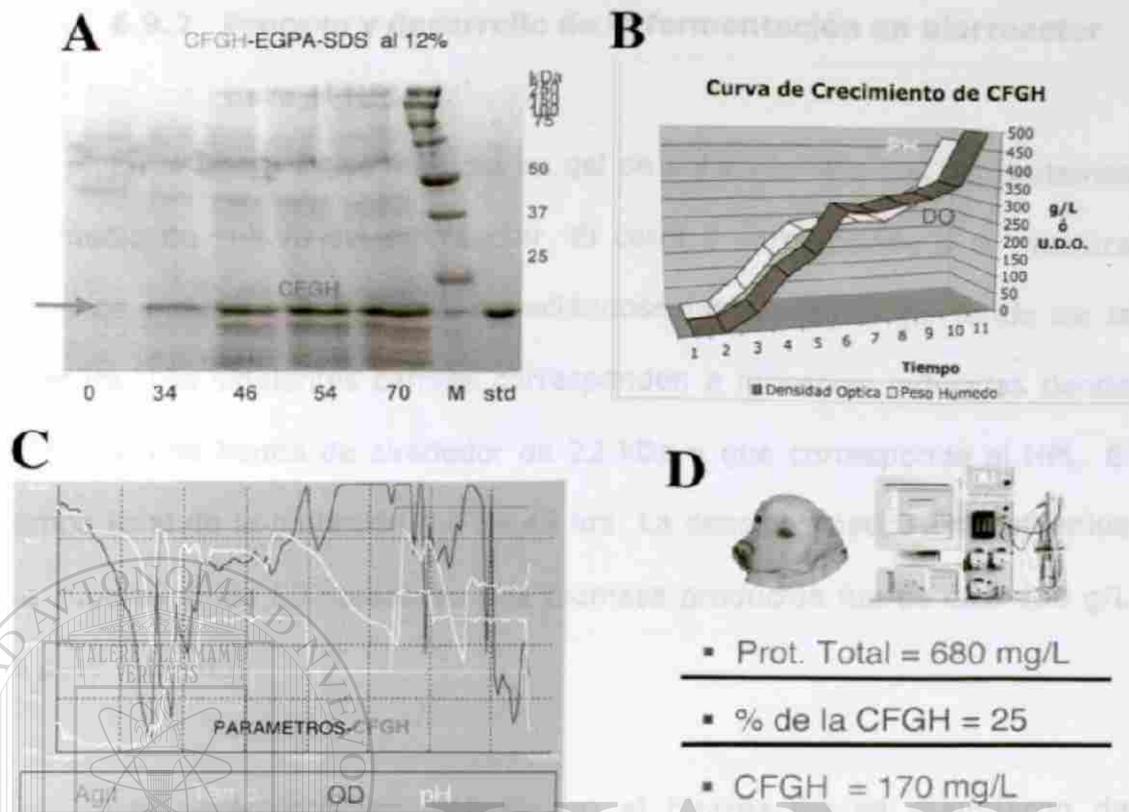


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

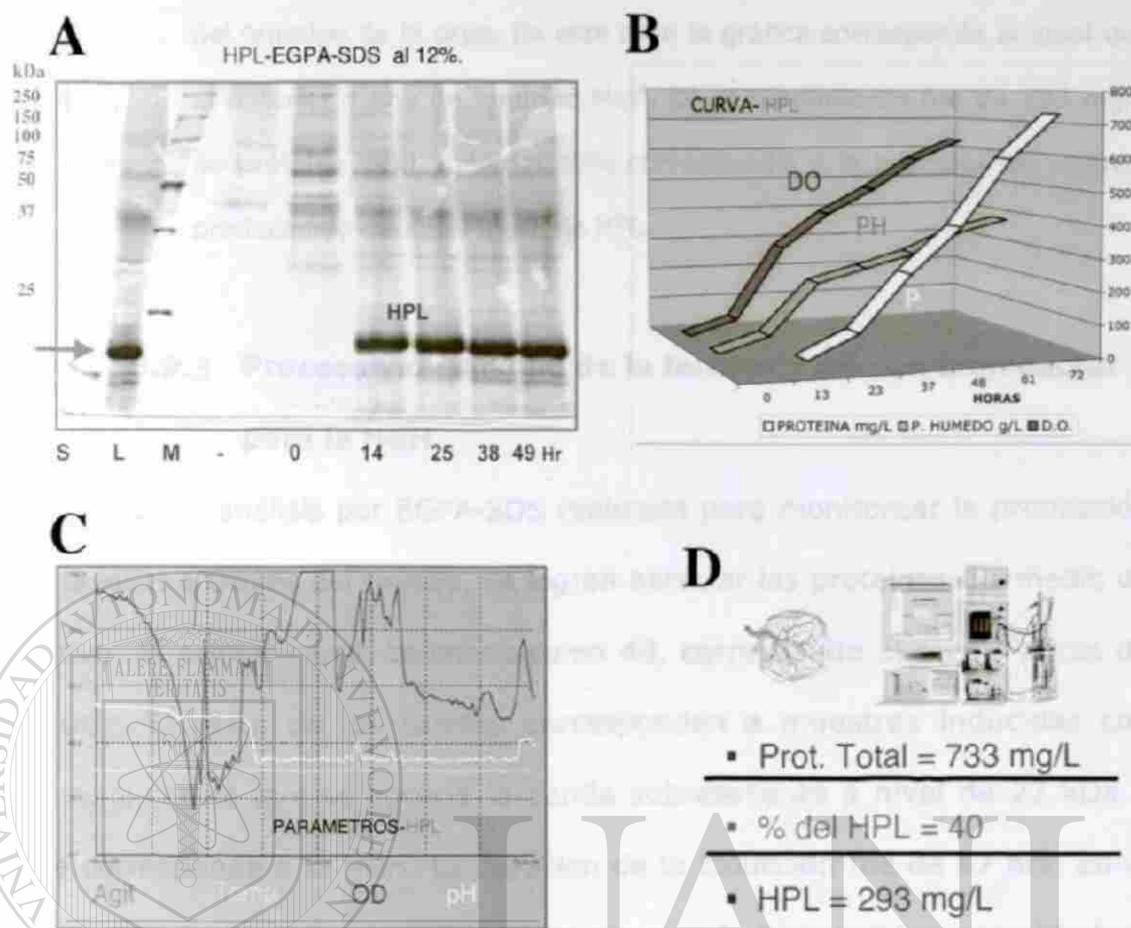


**Figura 28. Desarrollo de la fermentación en biorreactor de la CCFGH.** A) Se trata de un gel de poliacrilamida al 12% con las muestras del fermentador a lo largo del tiempo, carril 0 (antes de la inducción) hasta el carril 70 (70 hrs de inducción). Se aprecia una banda sobresaliente a nivel de 22 kDa que corresponde a la CCFGH. B) Gráfica de la curva de crecimiento. Se alcanza un peso húmedo de más de 450 g/L y una densidad celular de 500 unidades ópticas a 600 nm. C) Gráfica de los parámetros controlados del biorreactor. La agitación (1,000 r.p.m.), la temperatura (30°C) y el pH (5 a 4) se comportaron de manera similar. Donde hubo diferencia fue en el oxígeno disuelto, en este caso la gráfica corresponde a una de fenotipo Mut<sup>s</sup>. D). Los datos del rendimiento resultaron ser: 680 mg/L de proteína total, correspondiendo el 25% a la proteína de interés, obteniéndose 170 mg/L de CCFGH.

### 6.9.2 Proceso y desarrollo de la fermentación en biorreactor para el HPL.

En la figura 29 se muestra un gel de poliacrilamida con las proteínas del medio de cultivo del biorreactor. El carril 0 corresponde a la muestra antes de inducir con metanol, apreciándose las proteínas de fondo de la levadura. Los siguientes carriles corresponden a muestras inducidas donde sobresale una banda de alrededor de 22 kDa y que corresponde al HPL. El tiempo total de la inducción fue de 49 hrs. La densidad óptica final obtenida fue superior a las 600 unidades y la biomasa producida fue de casi 400 g/L de peso húmedo.

Los parámetros controlados en el biorreactor se manejaron de manera similar en todas las fermentaciones, con la temperatura manteniéndose constante a 30° Celsius, el pH iniciando a 5 y luego bajándose a 4 para inactivar proteasas, y la agitación aumentándose hasta 1,000 r.p.m. El comportamiento del oxígeno disuelto dependió del fenotipo de la levadura y se mantuvo por arriba del 20 %. La curva mostrada es la correspondiente al fenotipo Mut<sup>s</sup>. La concentración de proteínas totales en el medio de cultivo fue de 733 mg/L y más del 40% correspondió a la proteína de interés, obteniéndose una producción final de casi 300 mg/L de HPL. Cabe mencionar que esta construcción resultó ser la mejor de entre las cepas generadas para las otras hormonas, tanto en producción del recombinante como en la abundancia relativa de las proteínas totales en el medio de cultivo (figura 29).



**Figura 29. Desarrollo de la fermentación en biorreactor del HPL.** A) Se

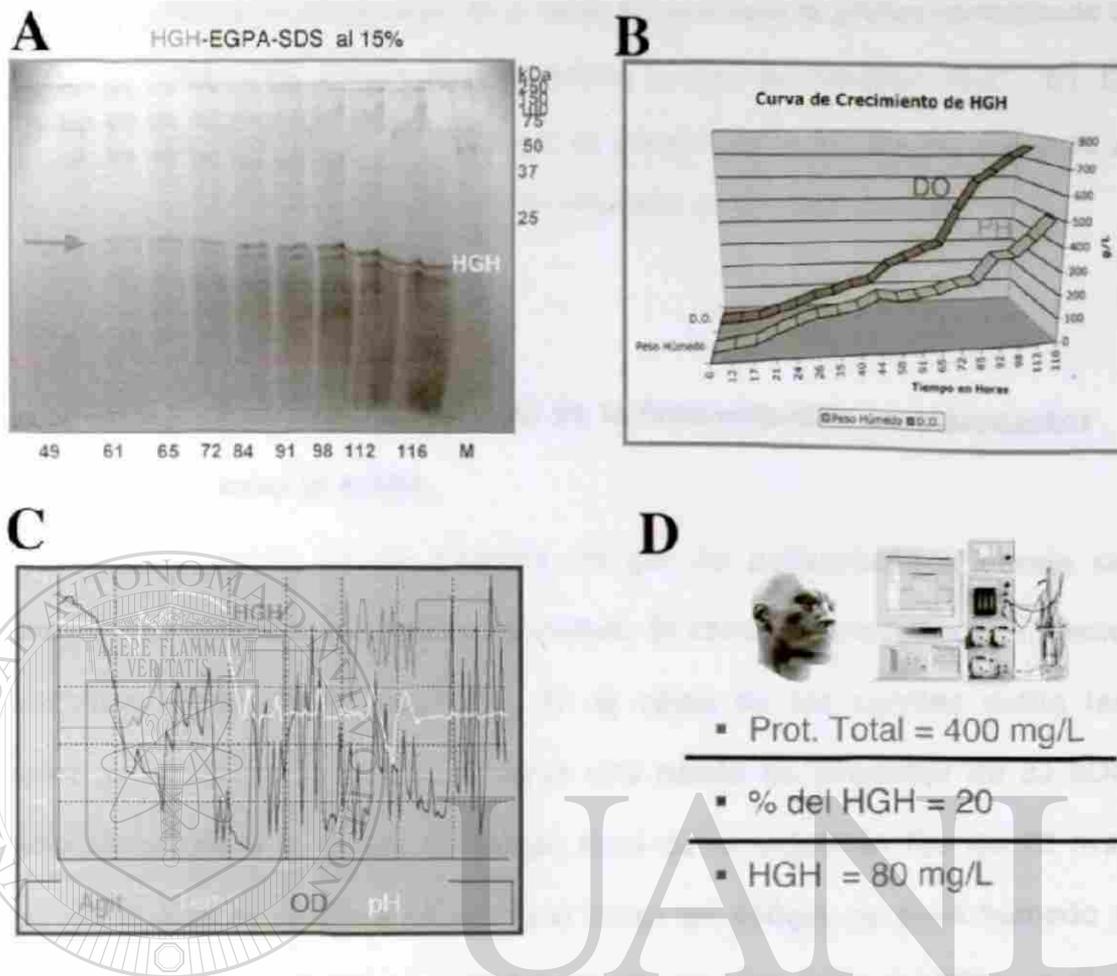
muestra un gel de poliacrilamida al 12% con las muestras del fermentador a través del tiempo, carril 0 (antes de la inducción) hasta el carril 49 (49 hrs de inducción). Se aprecia una banda sobresaliente a nivel de 22 kDa que corresponde al HPL. B) Gráfica de la curva de crecimiento. Se logra un peso húmedo de casi 400 g/L, la concentración de las proteínas totales que se alcanzó fue de más de 700 mg/L y se obtuvo una densidad celular de más de 600 unidades ópticas a 600 nm. C) Gráfica de los parámetros controlados del biorreactor. La agitación (1,000 r.p.m.), la temperatura (30°C) y el pH (5 a 4) se comportaron de manera similar en todos los casos. Donde hubo diferencia fue en la gráfica del oxígeno disuelto, este dependió

del fenotipo de la cepa. En este caso la gráfica corresponde al igual que la anterior a una de fenotipo Mut<sup>s</sup>. D) el rendimiento fue de 733 mg/L de proteína total, más del 40% correspondió a la hormona de interés, produciendo casi 300 mg/L de HPL.

### **6.9.3 Proceso y desarrollo de la fermentación en biorreactor para la HGH.**

En el análisis por EGPA-SDS realizada para monitorear la producción de la HGH a través del tiempo, se logran apreciar las proteínas del medio de cultivo. El primer carril, señalado como 49, corresponde al medio antes de inducir. El resto de los carriles corresponden a muestras inducidas con metanol, en la que se aprecia la banda sobresaliente a nivel de 22 kDa y que corresponde a la HGH. La duración de la inducción fue de 67 hrs. En la gráfica de la curva de crecimiento se observa la biomasa incrementándose en el tiempo. El peso húmedo alcanzó los 500 g/L y la densidad celular más

de 700 unidades ópticas a 600 nm. Los parámetros controlados en el biorreactor fueron el pH iniciando a 5 y luego bajándose a 4, la agitación incrementándose hasta 1,000 r.p.m. y la temperatura constante a 30° Celsius, mismos que se mantuvieron prácticamente sin cambios. En este caso el oxígeno disuelto varió más, por tener la cepa un mayor metabolismo dada la presencia del gen *aox1* que le confirió un fenotipo Mut<sup>+</sup>, el cual se reflejó en la gráfica. La concentración de proteínas totales logradas en el medio de cultivo fue de 400 mg/L, siendo el porcentaje de la hormona en el medio del 20%, lo que corresponde a una producción final de 80 mg/L de HGH (figura 30).



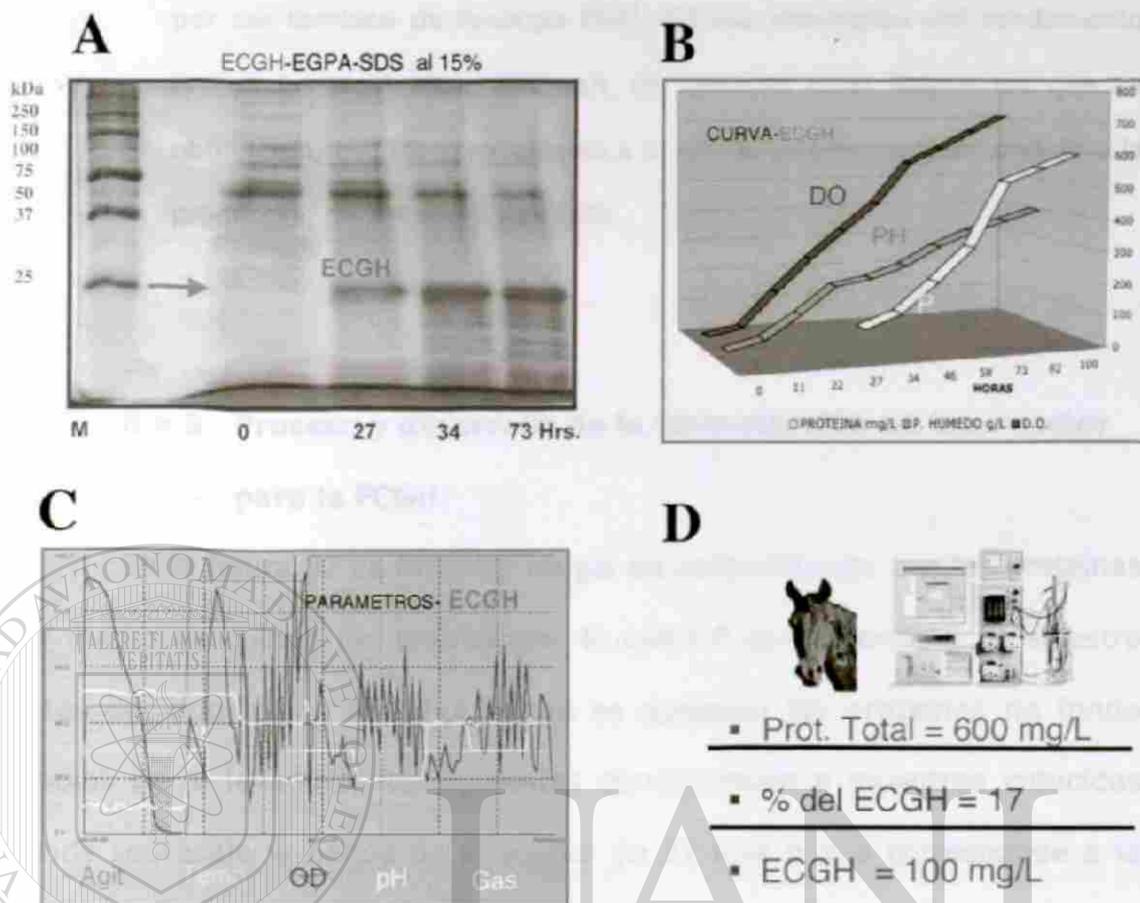
**Figura 30. Desarrollo de la fermentación en biorreactor de la HGH.** A) Se muestra un gel de poliacrilamida al 15% con muestras tomadas del fermentador a diferentes tiempos, carril 49 (antes de la inducción) hasta el carril 116 (67 hrs de inducción). Se aprecia la banda sobresaliente a nivel de 22 kDa que corresponde a la HGH. B) Gráfica de la curva de crecimiento. Se alcanza un peso húmedo de 500 g/L y una densidad celular de más de 700 unidades ópticas a 600 nm. C) Gráfica de los parámetros controlados del biorreactor, La agitación (hasta 1,000 r.p.m.), la temperatura (30°C) y el pH (5 a 4) se comportaron de manera similar en todos los casos. Donde hubo diferencia fue en la gráfica del oxígeno disuelto, el comportamiento

dependió del fenotipo de la cepa. En este caso la gráfica corresponde a diferencia de las dos anteriores a una de fenotipo Mut<sup>+</sup>. D) El rendimiento fue de 400 mg/L de proteína total, el 20% correspondió a la GH de interés, produciendo alrededor de 80 mg/L de HGH.

#### **6.9.4 Proceso y desarrollo de la fermentación en biorreactor para la ECGH.**

En la figura 31 se muestra un gel de poliacrilamida donde se aprecian las proteínas del medio de cultivo. El carril 0 corresponde al medio de cultivo antes de la inducción, en el resto de los carriles están las muestras inducidas, donde se observa una banda de alrededor de 22 kDa correspondiente a la ECGH. El tiempo total de la inducción fue de 73 hrs, durante el cual la biomasa se acumuló hasta los 400g/L de peso húmedo y la densidad celular llegó a las 700 unidades ópticas leídas a 600 nm. Los

parámetros controlados en el biorreactor resultaron similares a los anteriores (pH iniciando a 5 y después bajándose a 4, agitación hasta 1,000 r.p.m. y temperatura constante a 30° Celsius) y el del oxígeno disuelto se comportó similar a la GH humana por ser Mut<sup>+</sup> (esto se apreció en la gráfica respectiva). Se obtuvieron 600 mg/L de proteínas totales (uno de los más altos aquí logrados), mientras que el porcentaje de la ECGH resultó de 17%, correspondiendo a una producción final de 100 mg/L proteína recombinante (figura 31).



**Figura 31. Desarrollo de la fermentación en biorreactor de la ECGH.** A) En el

gel de poliacrilamida al 15% se puede apreciar en el carril 0 (antes de la

inducción) las proteínas de *Pichia pastoris*, mientras que en los carriles siguientes de la hora 27 a la 73 de inducción, se aprecia la aparición de

la banda proteica alrededor de los 22 kDa correspondiente a la ECGH.

B) Gráfica de la curva de crecimiento. Se produjo un peso húmedo de

400 g/L, la concentración de proteínas totales en el medio fue de 600

mg/L y la densidad celular final resultó de 700 unidades ópticas a 600

nm. C) Al igual que todas las fermentaciones los parámetros

controlados del biorreactor fueron semejantes. La agitación de 1,000

r.p.m., la temperatura de 30°C y el pH se cambió de 5 a 4. El

comportamiento de la curva del oxígeno disuelto fue similar a la HGH

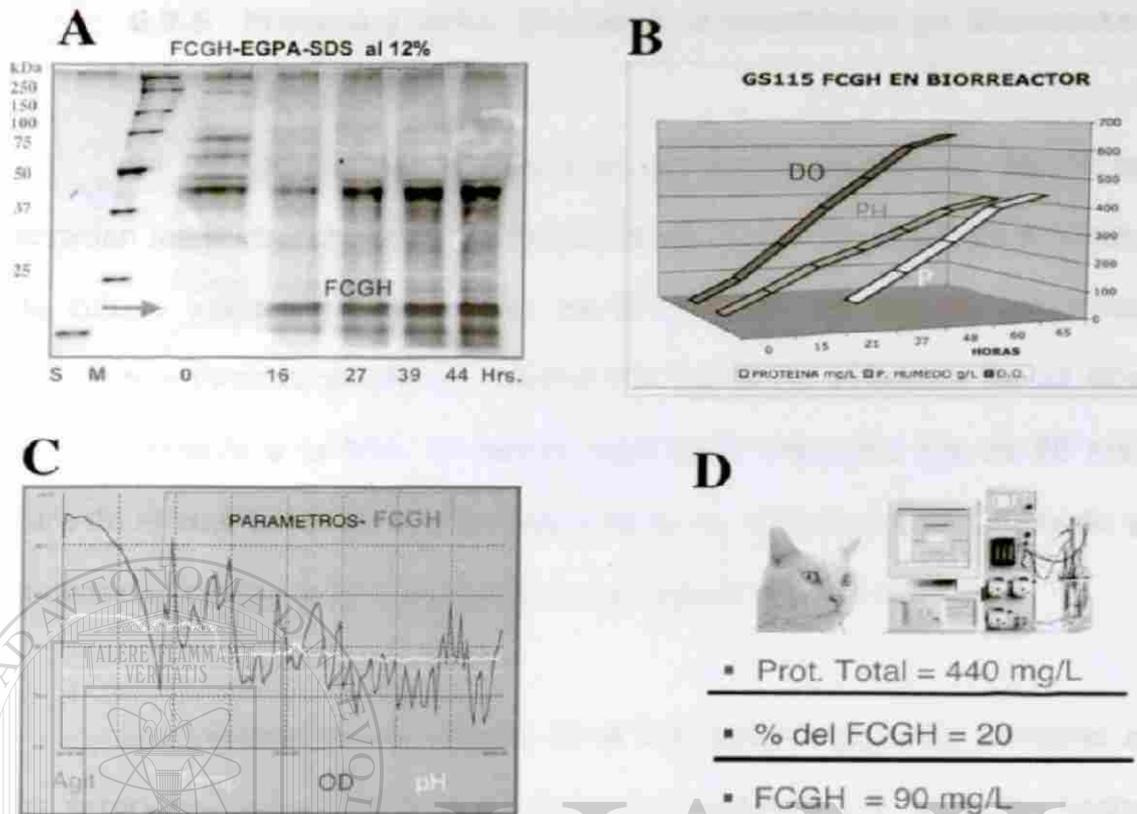
por ser también de fenotipo Mut<sup>+</sup>. D) Los resultados del rendimiento fueron los siguientes: 600mg/L de proteína total fueron los que se obtuvieron, el 17% correspondió a la GH de interés, lo que condujo a la producción de 100 mg/L de ECGH.

#### **6.9.5 Proceso y desarrollo de la fermentación en biorreactor para la FCGH.**

En la figura 32 se muestra un gel de poliacrilamida con las proteínas del medio de cultivo del biorreactor. El carril 0 corresponde a la muestra antes de inducir con metanol donde se aprecian las proteínas de fondo propias de la levadura, los siguientes corresponden a muestras inducidas donde sobresale la banda de alrededor de 22 kDa y que corresponde a la FCGH. El tiempo total de la inducción fue de 44 hrs. La densidad óptica final que se obtuvo fue superior a las 600 unidades y la biomasa producida fue de casi 400 g/L en peso húmedo.

#### **DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

Los parámetros controlados en el biorreactor se manejaron de manera similar en todas las fermentaciones. El oxígeno disuelto mostró una curva típica del fenotipo Mut<sup>+</sup>. La concentración de proteínas totales en el medio de cultivo fue de 440 mg/L. De éstas, el 20% fue de la hormona felina, obteniéndose una producción final de 90 mg/L de la FCGH (figura 32).



**Figura 32. Desarrollo de la fermentación en biorreactor de la FCGH.** A) Se muestra un gel de poliacrilamida al 12% con las muestras de la fermentación a lo largo del tiempo, carril 0 (antes de la inducción) hasta el carril 44 (44 hrs de inducción). Se aprecia una banda que sobresale a

nivel de 22 kDa que corresponde a la FCGH. B) Gráfica de la curva de crecimiento. Se logró un peso húmedo de 400 g/L, la concentración de

las proteínas totales fue de más de 400 mg/L y se obtuvo una densidad celular de más de 600 unidades ópticas a 600 nm. C) De igual manera que en las fermentaciones anteriores los parámetros controlados del biorreactor que se comportaron de manera similar fueron los ya mencionados. La gráfica del oxígeno disuelto correspondió a una de

fenotipo Mut<sup>+</sup>. D) El rendimiento resultó ser de: 440 mg/L de proteína total, correspondiendo el 20% a la proteína de interés, resultando en 90 mg/L de FCGH.

fenotipo Mut<sup>+</sup>. D) El rendimiento resultó ser de: 440 mg/L de proteína total, correspondiendo el 20% a la proteína de interés, resultando en 90 mg/L de FCGH.

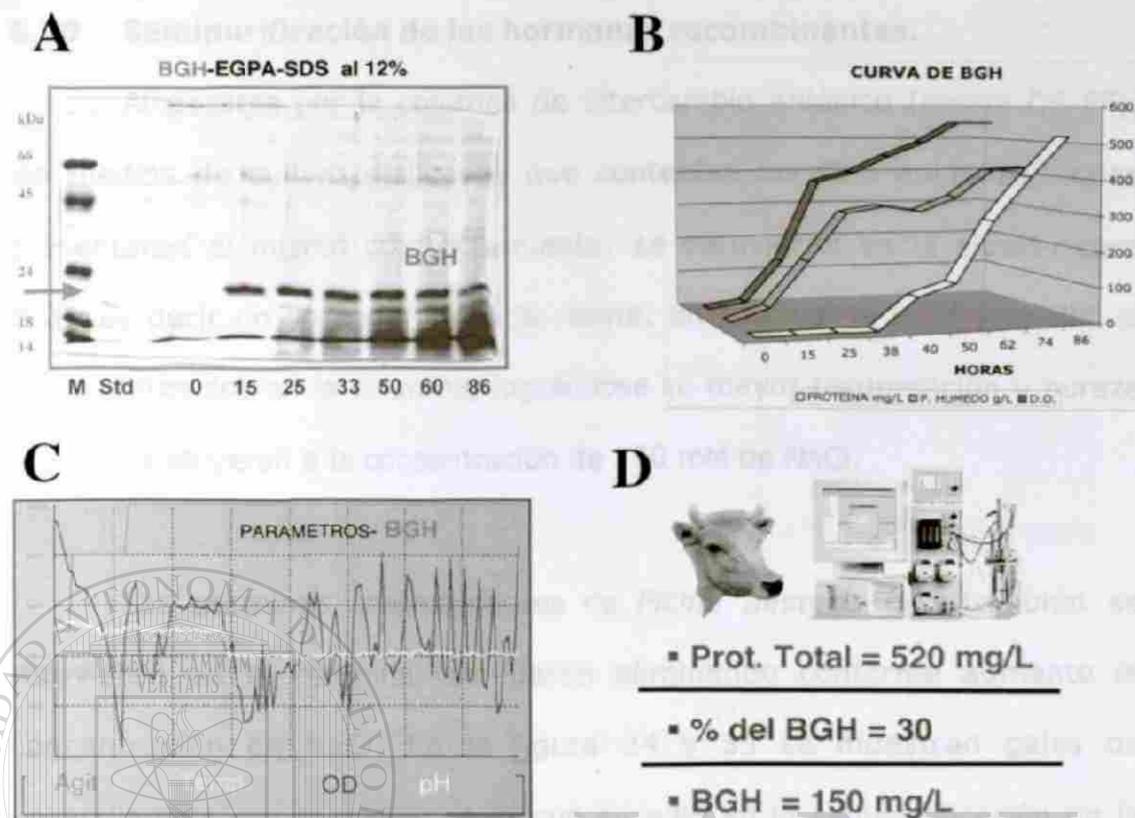
fenotipo Mut<sup>+</sup>. D) El rendimiento resultó ser de: 440 mg/L de proteína total, correspondiendo el 20% a la proteína de interés, resultando en 90 mg/L de FCGH.

fenotipo Mut<sup>+</sup>. D) El rendimiento resultó ser de: 440 mg/L de proteína total, correspondiendo el 20% a la proteína de interés, resultando en 90 mg/L de FCGH.

### 6.9.6 Proceso y desarrollo de la fermentación en biorreactor para la BGH.

En la figura 33 se muestra un gel de poliacrilamida donde se aprecian las proteínas del medio de cultivo. El carril 0 corresponde al medio de cultivo antes de la inducción, en el resto de los carriles están las muestras inducidas, donde se observa una banda de alrededor de 22 kDa correspondiente a la BGH. El tiempo total de la inducción fue de 86 hrs, durante el cual la biomasa se acumuló hasta los 420g/L de peso húmedo y la densidad celular llegó a las 550 unidades ópticas leídas a 600 nm.

Los parámetros controlados en el biorreactor resultaron similares a los anteriores (pH iniciando a 5 y después bajándose a 4, agitación hasta 1,000 r.p.m. y temperatura constante a 30° Celsius) y el del oxígeno disuelto se comportó similar a la GH humana por ser Mut<sup>+</sup> (esto se apreció en la gráfica respectiva). Se obtuvieron 520 mg/L de proteínas totales, mientras que el porcentaje de la BGH resultó de 30%, correspondiendo a una producción final de 150 mg/L proteína recombinante (figura 33).



**Figura 33. Desarrollo de la fermentación en biorreactor de la BGH.** A) Se muestra un gel de poliacrilamida al 12% con las muestras de la fermentación a lo largo del tiempo, carril 0 (antes de la inducción)

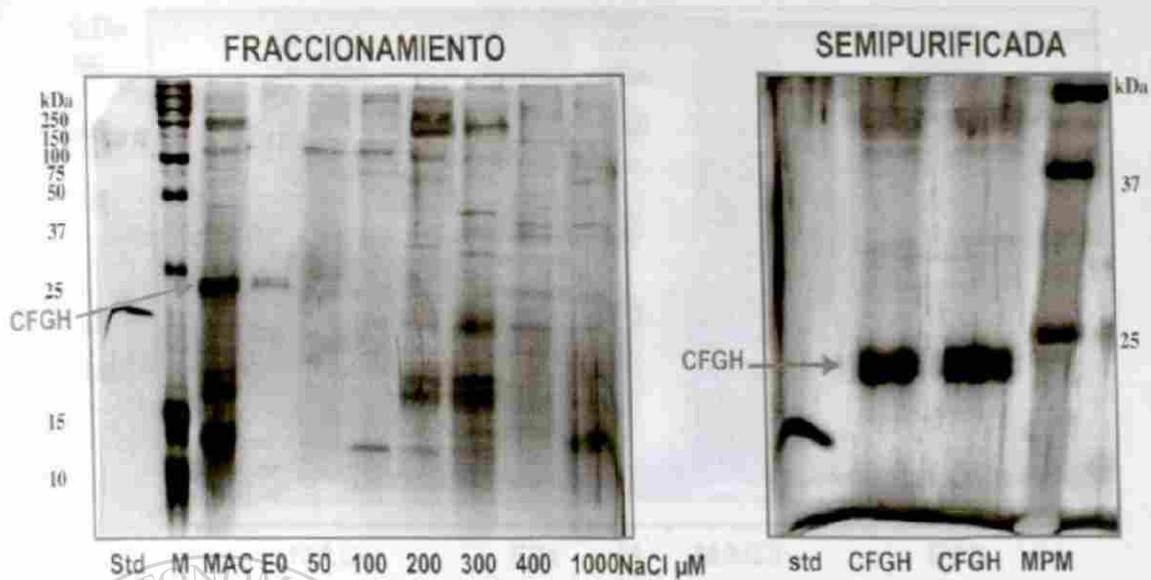
hasta el carril 86 (86 hrs de inducción). Se aprecia una banda que sobresale a nivel de 22 kDa que corresponde a la BGH. B) Gráfica de la curva de crecimiento. Se logró un peso húmedo de 420 g/L, la concentración de las proteínas totales fue de más de 500 mg/L y se obtuvo una densidad celular de 550 unidades ópticas a 600 nm. C) De igual manera que en las fermentaciones anteriores los parámetros controlados del biorreactor que se comportaron de manera similar fueron los ya mencionados. La gráfica del oxígeno disuelto correspondió a una de fenotipo Mut<sup>+</sup>. D) El rendimiento fue de: 520 mg/L de proteína total, correspondiendo el 30% a la proteína de interés, resultando en 150 mg/L de BGH.

### 6.10 Semipurificación de las hormonas recombinantes.

Al pasarse por la columna de intercambio aniónico (resina QS-FF), los medios de cultivo dializados que contenían las GHs animales, todas presentaron el mismo comportamiento: se obtuvieron en la elusión cero (E0), es decir no se pegaron en la resina. En cambio, la HGH y el HPL si fueron retenidos en la columna, lográndose su mayor recuperación y pureza cuando se eluyeron a la concentración de 200 mM de NaCl.

Las proteínas contaminantes de *Pichia pastoris* que también se retuvieron en la columna, se fueron eliminando conforme aumento la concentración de NaCl. En la figura 34 y 35 se muestran geles de poliacrilamida con ejemplos de lo que sucedió en la semipurificación de la GH de perro y de la BGH, las cuales fueron recuperadas en la elusión E0 conforme se fue cargando la muestra en la columna.

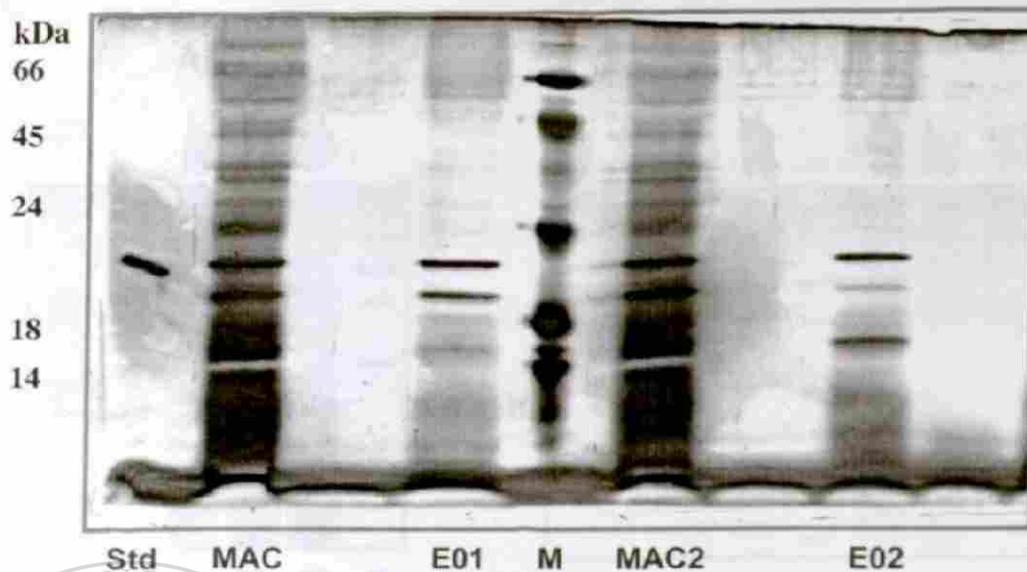
En la figura 34 se muestra el fraccionamiento a las distintas fuerzas iónicas para la semipurificación de la CFGH. Además, se concentró y analizó la fracción E0 que contenía la CFGH por EGPA-SDS teñido con plata, para ver que tan pura había quedado, pudiéndose apreciar el monómero de CFGH como forma predominante, aunque también se apreciaron otras bandas contaminantes de mayor peso molecular (véase el gel de la derecha en la figura 34).



**Figura 34. Semipurificación de la CFGH.** En el gel de la izquierda se aprecian las muestras del proceso de la purificación de la CFGH por cromatografía de intercambio iónico. El carril número 3 señalado como "Mac" corresponde al medio de cultivo con la CFGH antes de pasar por la columna. El resto de los carriles son de las fracciones eluidas de la columna. En el marcado como E0 muestra la banda semipura de la CFGH. El resto, de

50 a 1,000, corresponden a las diferentes concentraciones de sal, donde se aprecian cada elusión de las diferentes proteínas contaminantes de

*Pichia pastoris* separadas de la columna, conforme se fue incrementando la fuerza iónica. El gel de la derecha muestra la fracción E0 concentrada para poder apreciar la pureza que se había obtenido la CFGH. Std=estándar de HGH; M y MPM, corresponden a marcador de peso molecular. Además, los geles se tiñeron con plata, que por su alta sensibilidad permitió apreciar mejor las proteínas contaminantes.

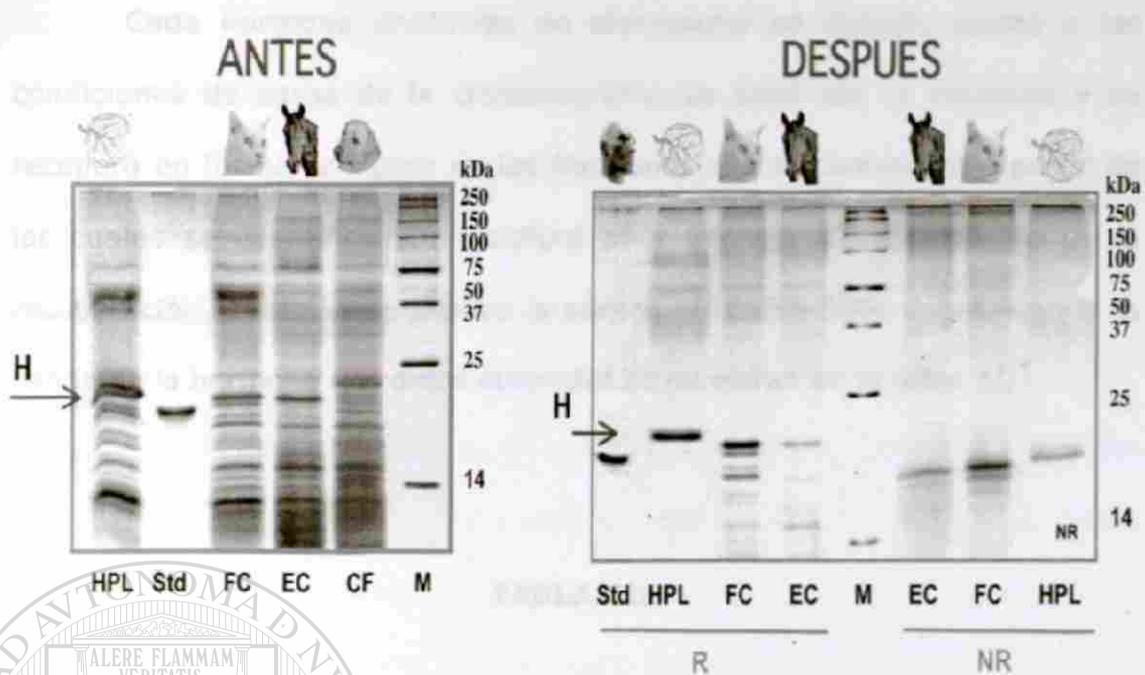


**Figura 35. Semipurificación de la BGH.** En el gel se aprecian las muestras del proceso de la purificación de la BGH por cromatografía de intercambio iónico. Los carriles número 2 y 6 señalados como "Mac y Mac2" corresponden al medio de cultivo con la BGH antes de pasar por la columna. El resto de los carriles son de las fracciones eluidas de la columna. Los marcados como E01 y E02 muestran la banda semipura de la BGH. Std=HGH, M=marcador de pesos molecular.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

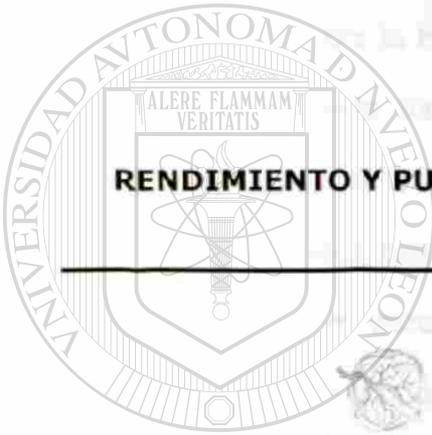
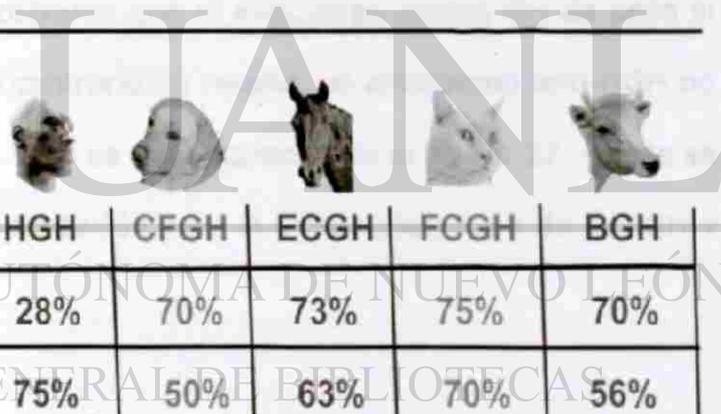
El resto de las proteínas recombinantes semipuras se muestran en los gels de la figura 36: el gel identificado como "ANTES", corresponde a las muestras del medio de cultivo de cada hormona junto con las proteínas de *Pichia pastoris*, mientras que el marcado como "DESPUES" corresponde a las hormonas pasadas por la columna de intercambio iónico, donde se aprecian las proteínas recombinantes semipuras corridas tanto en condiciones reductoras como no reductoras para apreciar posibles formas agregadas debido a los puentes de azufre (figura 36).



**Figura 36. Semipurificación de las GHs animales y PL humano.** En el gel de la izquierda (ANTES) se muestran las GHs animales y el PL humano antes de ser sometidos al proceso de purificación tal cual provienen del biorreactor. En el gel de la derecha (DESPUES) se muestran las GHs y el HPL después de haber sido sometidos al proceso de purificación por cromatografía de intercambio iónico. En los carriles, HPL=PL de humano, FC=GH de gato, EC=GH de caballo y CF=GH de perro. M= marcador de peso molecular y std= estándar comercial de HGH. Los geles corresponden a poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes, las muestras de la parte derecha del gel derecho se corrieron en condiciones no reductoras (NR).

Cada hormona producida en biorreactor se dializó, ajustó a las condiciones de carga de la cromatografía, se pasó por la columna y se recuperó en forma semipura en las fracciones que la contenían, a partir de las cuales se cuantificó por Bradford para conocer el rendimiento de la recuperación. También se analizó la pureza en EGPA-SDS, cuantificando la banda de la hormona (los datos obtenidos se muestran en la tabla XII).

TABLA XII


**RENDIMIENTO Y PUREZA DE LAS HORMONAS RECOMBINANTES**


	HPL	HGH	CFGH	ECGH	FCGH	BGH
RENDIMIENTO	58%	28%	70%	73%	75%	70%
PUREZA	90%	75%	50%	63%	70%	56%

### 6.11 Inmunodetección de HGH recombinante del medio de cultivo de biorreactor.

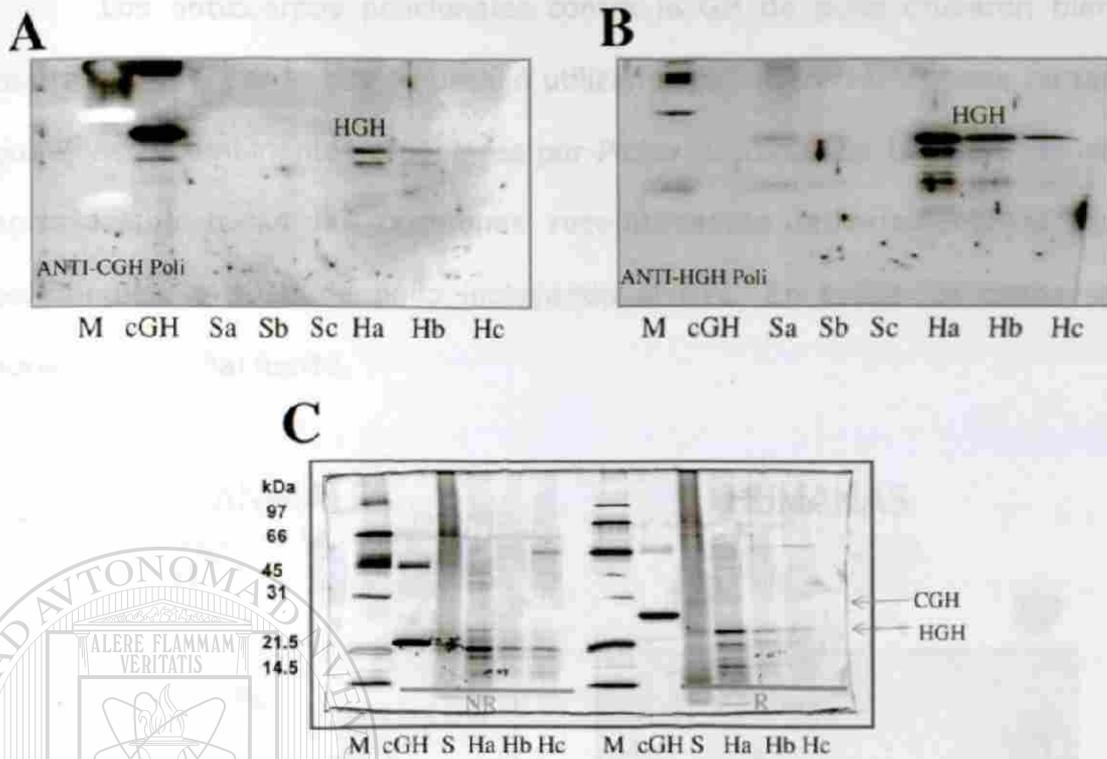
Como siguiente paso se procedió a confirmar la identidad de las bandas proteicas sobresalientes apreciadas en los geles de poliacrilamida de

las muestras de las cepas de *Pichia pastoris* fermentadas en el biorreactor que correspondieran a GHs y HPL. Para ello se realizó la detección por anticuerpos o "western blot" de cada hormona por un anticuerpo que fuera capaz de reconocer a todas al mismo tiempo, ya que no contábamos con un anticuerpo específico para cada una de las nueve construcciones.

Se recurrió al empleo de un anticuerpo policlonal (proporcionado por el Dr. Carlos Arámburo) dirigido contra la GH del pollo, el cual se probó primeramente contra la HGH, con el argumento de que si cruzaba con ésta, por lógica lo debería hacer con el resto de las recombinantes animales. También se probó si los anticuerpos anti-HGH reaccionaban con la GH de pollo. Los resultados nos mostraron que el anticuerpo contra GH de pollo si reconoció a la HGH, pero lo contrario no resultó: el anticuerpo anti-HGH no cruzó contra la GH de pollo. Esto se puede apreciar en la figura 37, donde se muestra el ensayo de estandarización para la inmunodetección de la HGH y de la GH del pollo.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Además, también se muestra un gel de poliacrilamida teñido con plata para apreciar la calidad y concentración de los estándares de HGH y de la HGHr producida y secretada por *Pichia pastoris* hacia el medio de cultivo, así como del testigo positivo correspondiente a la GH de pollo, mismos que fueron utilizados en los geles con los que se llevó a cabo la electrotransferencia para los "western blot".



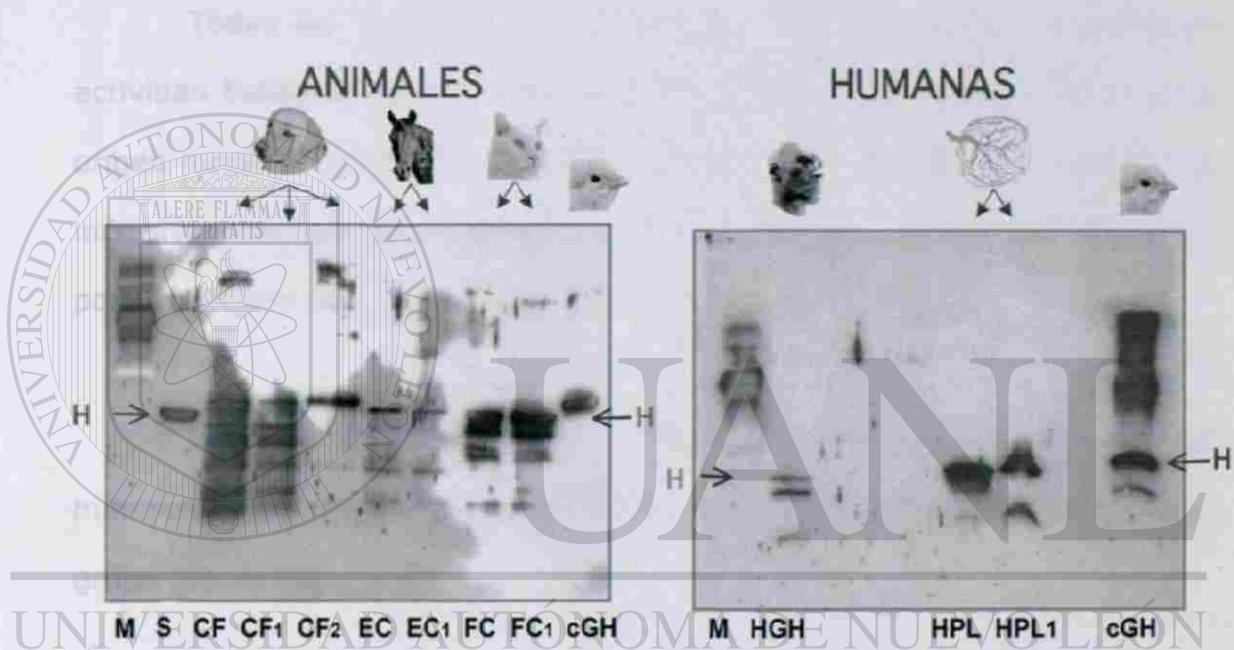
**Figura 37. Detección por anticuerpos de la HGH recombinante.** A) En la membrana se muestra el "western blot" donde se detecta la HGH del medio de cultivo por medio de anticuerpos policlonales contra la GH de

pollo y en B) se muestra la detección de la HGH con anticuerpos anti-HGH, pero que no detectaron la GH de pollo, por lo que los anticuerpos contra la HGH no cruzan con la GH de pollo, en cambio los anticuerpos

contra la GH de pollo si cruzan con la HGH. C) Se muestra un gel de poliacrilamida teñido con plata correspondiente a las muestra inmunodetectadas arriba en condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR).

Para A), B) y C) los carriles corresponden a: S(a, b y c)= estándar de HGH a diferentes diluciones, H(a, b y c)=HGH de biorreactor a diferentes diluciones, M=marcador de peso molecular, cGH=GH de pollo testigo positivo. Los gels con los que se realizaron los "westerns" fueron de poliacrilamida al 15%.

6.12 Los anticuerpos policlonales contra la GH de pollo cruzaron bien contra la HGH, por lo que se decidió utilizarlos para detectar el resto de las proteínas recombinantes producidas por *Pichia pastoris*. En la figura 38 se aprecia que todas las hormonas recombinantes cruzaron contra los policlonales anti-GH de pollo incluyendo al HPL. En todos los casos se apreció una señal fuerte.



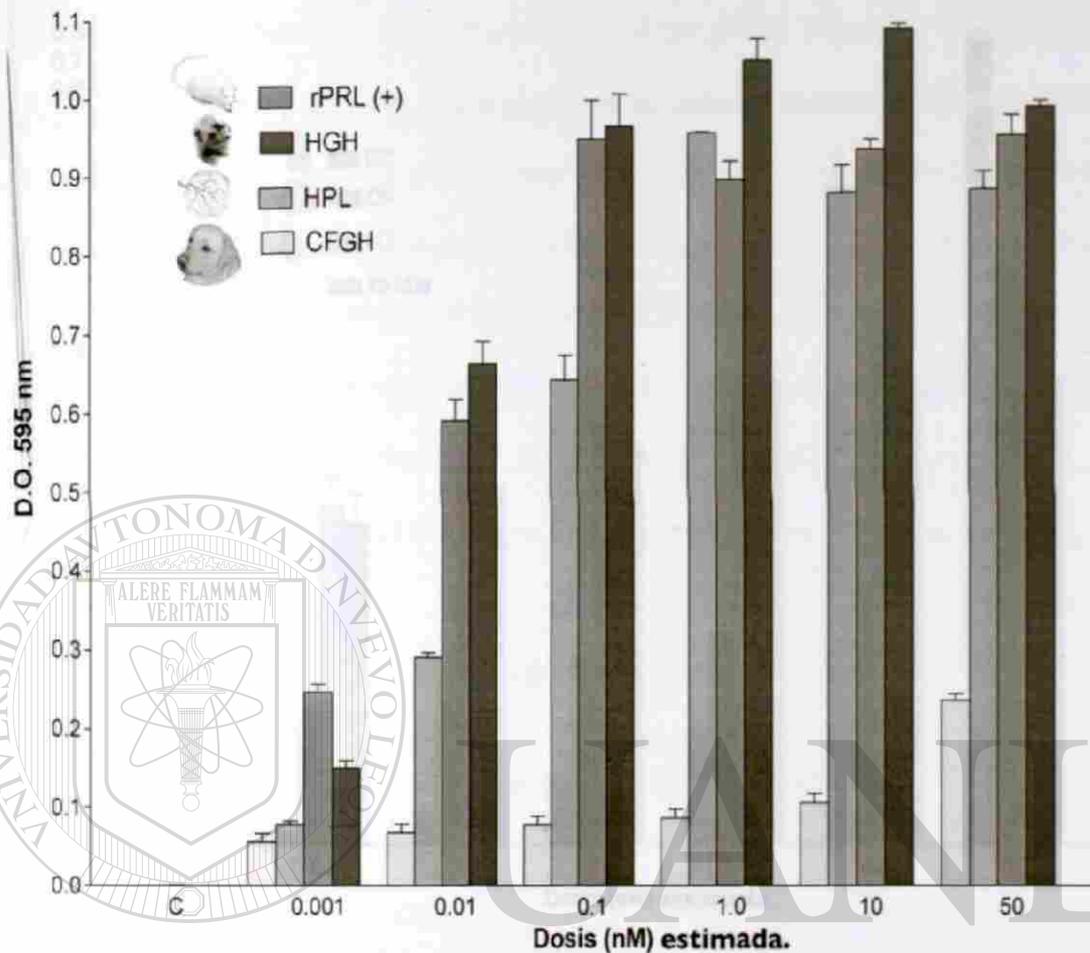
**Figura 38. Inmunodetección de las GHs y HPL.** En la imagen de la izquierda se aprecia la identificación de las GH animales por los anticuerpos policlonales contra la GH de pollo. En los carriles CF=GH de perro, EC=GH de caballo y FC=GH de gato. En la imagen de la derecha se observa la inmunodetección de la GH y PL humanos, también por la anti-GH de pollo. HGH=GH de humano y HPL=PL de humano. M= marcador de peso, S= estándar comercial de HGH y cGH= estándar y testigo positivo de GH de pollo. Los geles con los que se realizaron los "westerns" fueron de poliacrilamida al 15%.

### **6.12 Ensayo de la actividad biológica en la línea celular Nb2.**

En este bioensayo se utilizó la línea celular de linfoma de rata, cuyas células tienen en su superficie el receptor para prolactina y la actividad se traduce en aumento de la proliferación celular cuando las células son expuestas a un estímulo externo que las induzca.

Todas las hormonas recombinantes aquí producidas presentaron actividad biológica en este sistema, resultando con mayor actividad las de origen humano. En efecto, la HGH presentó mayor bioactividad que el HPL, inclusive más que la prolactina recombinante de rata que fue el testigo positivo (figura 39).

Las GHs de origen animal presentaron menor actividad que las humanas, caso notable fue la ECGH que superó ampliamente al resto de su grupo (figura 40).

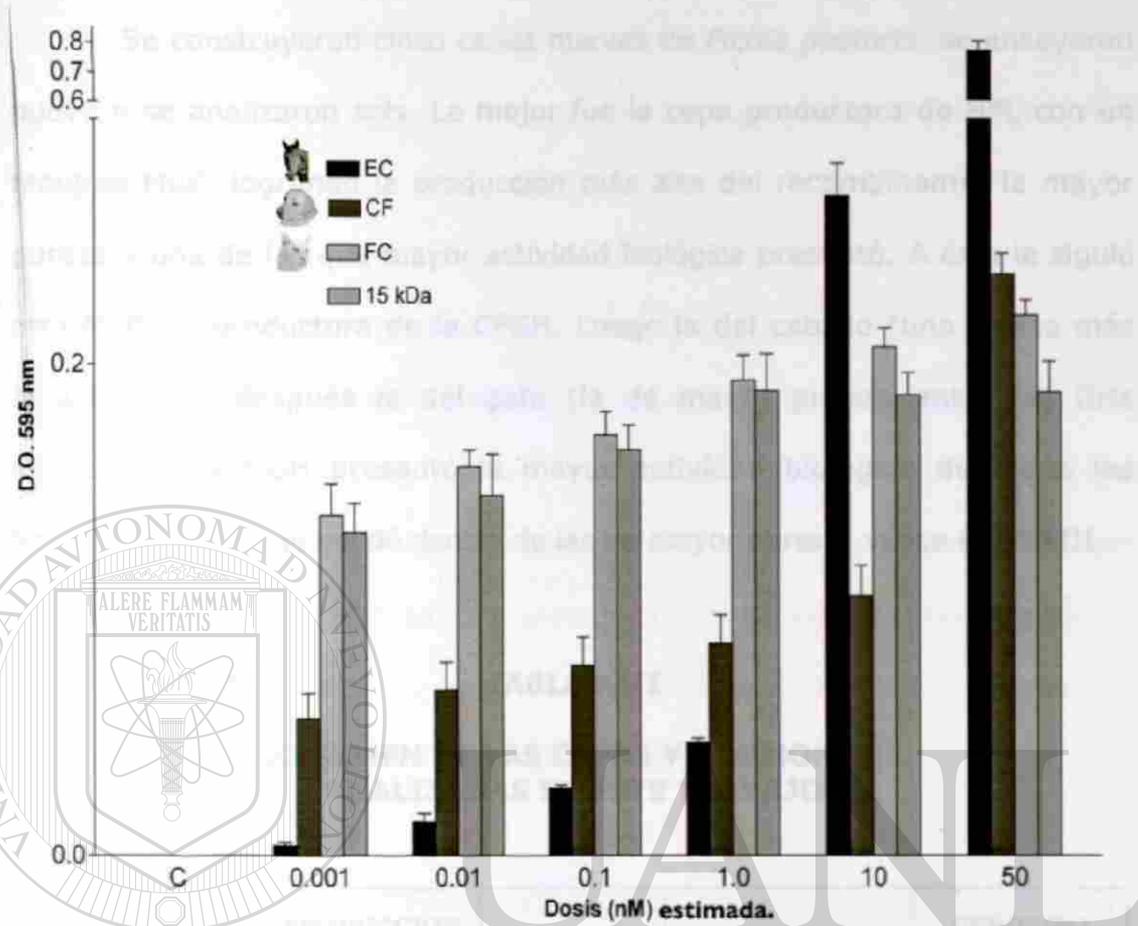


## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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

gráfica muestra la actividad biológica expresada en unidades absolutas, de las hormonas humanas que se probaron a diferentes concentraciones (0.001 a 50 mM). Se incluyó una GH animal para contrastarla con las humanas. El testigo positivo que se utilizó fue la prolactina de rata. Todas las hormonas mostraron actividad dependiente de las dosis, siendo la más activa la HGH.

4.1.3 Resultados.



**Figura 40. Bioensayo en células Nb2 de las GHs animales.** En esta gráfica se muestran los resultados del ensayo de la actividad biológica de las GHs animales, la altura de las barras miden el nivel de la actividad. Las concentraciones que se probaron fueron desde 0.001 mM hasta a 50 mM. En todas se observó bioactividad y ésta fue dosis dependiente. La actividad mostró variación dependiendo de la hormona, resultando la más activa la GH de caballo.

### 6.13 Resumiendo.

Se construyeron cinco cepas nuevas de *Pichia pastoris*, se ensayaron nueve y se analizaron seis. La mejor fue la cepa productora de HPL con un fenotipo Mut<sup>s</sup>, logrando la producción más alta del recombinante, la mayor pureza y una de las que mayor actividad biológica presentó. A ésta le siguió otra Mut<sup>s</sup>, la productora de la CFGH. Luego la del caballo (una de las más bioactivas) y después la del gato (la de mayor pureza entre las GHs animales). La HGH presentó la mayor actividad biológica de todas las hormonas y además quedó dentro de las de mayor pureza, véase tabla XIII.

**TABLA XIII**

**RESUMEN DE LAS CEPAS Y HORMONAS  
ANALIZADAS EN ESTE TRABAJO**

HORMONA	PRODUCCION mg/L	PUREZA	BIOACTIVIDAD	FENOTIPO Mut
 CFGH	170	50%	++	S
 ECGH	100	63%	++++	+
 BGH	150	56%	---	+
 FCGH	90	70%	++	+
 HGH	80	75%	+++++	+
 HPL	300	90%	++++	S

## 7. DISCUSION

Se describe por primera vez el desarrollo de un nuevo proceso de producción en biorreactor, purificación y ensayo de la actividad biológica de las GHs recombinantes del perro, caballo, gato, vaca y del humano, así como del lactógeno placentario humano (HPL). Actualmente todas las GHs disponibles comercialmente son producidas en el sistema bacteriano de *Escherichia coli*, de modo que el sistema de la levadura *Pichia pastoris* que aquí reportamos es una alternativa al ya clásico de *Escherichia coli*.

### 7.1 Construcción de las cepas.

Se diseñaron tres juegos de iniciadores, un par para la amplificación de los ADNcs de las GH de caballo y perro, un segundo para la amplificación del ADNc de la GH del gato, y un tercero y último juego para la amplificación del ADNc del HPL. Esto por presentar diferencias en la secuencia nucleotídica que se traducían en una o más diferencias aminoacídicas, como sucedió en el caso para los iniciadores sentido o río arriba (5'). En cambio, la región río abajo (3') de las GHs se conserva, utilizándose el mismo iniciador antisentido para todos los casos, siendo la única excepción el HPL, que como secuencia humana es menos similar a las de los otros animales animales.

En primera instancia se decidió clonar el ADNc de cada hormona en el plásmido pBS. Las ventajas que tiene este plásmido son: tamaño pequeño (3000 pb), estabilidad dentro de la bacteria, alta eficiencia en la replicación y el poseer una región de sitios únicos de restricción bastante versátil para clonación. Esto último facilitó sacar el ADNc de interés y traspararlo al plásmido de expresión. Otra ventaja adicional es la que presenta como vector "T", la que permitió clonar los ADNcs ya mencionados. Dicha técnica de clonación es de las más fáciles, sencillas, eficientes y económicas, ya que no se requiere de estuches sofisticados y costosos para lograr la clonación deseada.

La clonación del ADNc para la GH de gato fue diferente a la del resto, ya que se decidió hacerla directamente del producto amplificado sobre el vector de expresión pPIC9, ambos previamente digeridos con *Xho* I y *Avr* II, ahorrándose un paso, el de pasarlo a pBS. Aunque en tesis previas de nuestro laboratorio se hace referencia a la imposibilidad de clonar directamente los amplicones de este tipo en pPIC9 -probablemente debido al espacio reducido que queda al lado de los sitios de restricción extras incorporados vía los iniciadores (Kaufman y Evans, 1990), para que pueda actuar la enzima respectiva (*Xho* I o *Avr* II)-, pero en nuestro caso, ambos procedimientos funcionaron bien para llevar a cabo clonaciones.

Donde sí se presentaron contratiempos, fue en la reacción de ligación, pues se generaron con frecuencia productos religados por causa de las endonucleasas contaminando la reacción que se sospechaba rasuraba los extremos del vector para hacerlo romo y propiciar el que se cerrara el vector plasmídico. Esto se resolvió al pre-tratar a todos los reactivos, incluyendo los ADNs, por 30 min. a 65° Celsius para inactivar las posibles endonucleasas presentes e impedir su interferencia con la clonación deseada.

El resto de los ADNcs provenientes de los pBS-xGH se subclonaron en el vector pPIC9 para generar los vectores de expresión pPIC9-xGH. Esto se facilitó grandemente debido al diseño de los iniciadores, ya que además de permitir enfatizar adecuadamente el marco abierto de lectura para la generación correcta de la proteína recombinante, incluyeron los sitios extras de restricción (*Xho* I – *Avr* II) que facilitaron sacar cada ADNc y pasarlo a pPIC9.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Una vez que se transfectaron las levaduras con cada "casete" de expresión para cada hormona, las cepas de *Pichia pastoris* adquirieron la capacidad de crecer en las placas de medio regenerador carente de histidina, debido a que habían incorporado dicho "casete", que además de permitirles producir la GH, les permitía sintetizar la histidina necesaria para su crecimiento. La identificación de las clonas transfectadas por RCP directo de las colonias de la placa de Petri (Ascacio-Martínez y Barrera Saldaña,

2004) nos ahorró bastante tiempo, ya que solamente se le hizo extracción del ADN genómico (que consume mucho tiempo) a las clonas de la primera construcción; pero como la RCP directa de colonia también funcionó muy bien, se decidió tamizar el resto de las construcciones de esta manera.

El número de transfectantes viables fue bajo y osciló entre 0 y 8 por placa, de manera que se necesitaron plaquear varias cajas de Petri para tener diferentes clonas de cada construcción, para probar todas en el ensayo de producción de proteína recombinante en matraz y escoger la mejor productora. El bajo número de clonas de *Pichia pastoris* por placa se debió a la técnica para hacerlas competentes, que en nuestro caso correspondió al protocolo de cloruro de litio, que de los tres referidos es el de más baja eficiencia en la transfección (siguiéndole en eficiencia el de generación de esferoplastos, el cual es el más tardado y tedioso, y finalmente el de electrocompetencia, que aunque es el más eficiente, también es el más caro). A pesar de su baja eficiencia, se decidió utilizar el de cloruro de litio por ser rápido, barato y adecuado a nuestras necesidades.

Una vez obtenidas las nuevas cepas de *Pichia pastoris*, fue necesario caracterizarles su fenotipo Mut, según utilizaran el gen *aox1* (Mut<sup>+</sup>) o el gen *aox2* (Mut<sup>-</sup>; gen *aox1* ausente) para metabolizar el metanol de manera rápida o lenta, respectivamente. De esto dependía el protocolo a seguir en la producción del recombinante (véase más adelante).

## 7.2 Producción de las hormonas recombinantes.

Aunque se observó una banda sobresaliente a nivel de 22 kDa para casi todas las hormonas, la excepción fueron la HGH-V y la HGH 20 kDa, que si bien se logró apreciar la banda proteica de interés, ésta no sobresalió tanto como las otras del resto de las proteínas naturales de *Pichia pastoris*. Esto dependió de cada cepa *per se*, que aunque provinieran de la misma construcción y aun de la misma transfección, presentaron patrones de producción muy distintos, pudiendo variar la producción hasta en un 300%, aun y cuando se manejen bajo las mismas condiciones. De aquí la importancia de tamizar y probar un mínimo 8-10 clonas independientes para escoger la mejor productora, antes de dedicarse a modificar otros parámetros para intentar mejorar la producción; además de poder comparar entre cepas Mut<sup>+</sup> y Mut<sup>s</sup> los niveles de producción de la misma proteína recombinante. Esto último sucedió para las cepas de *Pichia pastoris* productoras de la GH de perro, en la que la cepa con fenotipo Mut<sup>s</sup> produjo siete veces más CFGH que la cepa Mut<sup>+</sup>.

### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Además de lo anteriormente mencionado, también hay que tomar en cuenta otras variables extrínsecas que pueden mejorar la producción del recombinante. Las que en este trabajo se encontraron son en orden de importancia las siguientes:

- 1) La composición del medio de cultivo, si es mínimo o rico, dependiendo de si tiene o no extracto de levadura y peptona. El

medio rico disminuye la proteólisis, además de permitir adquirir biomasa más fácilmente por los nutrientes extras que contiene.

- 2) La densidad óptica de la biomasa a la que se arranca la inducción. Para las cepas Mut<sup>+</sup> funciona bien arrancar la inducción a densidades bajas menores de 5, ya que este tipo de cepas metabolizan eficientemente el metanol y pueden generar biomásas superiores a las 15 unidades de densidad óptica a lo largo de la fermentación, inclusive pasar de 30. Esto dependerá de la biomasa con la que se inició la inducción; pero para las cepas Mut<sup>s</sup> es necesario arrancar la inducción a biomásas más altas de 5 a 10 unidades. Esto para que haya suficientes células para producir la proteína recombinante, dado su metabolismo lento con que utilizan el metanol, por lo que al final de la fermentación no habrá aumento considerable de la biomasa, siendo esta la causa de iniciar a altas densidades celulares.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

- 3) El pH es otro de los factores, recomendándose trabajar a pHs ácidos de entre 5 y 6 para disminuir la activación de las proteasas en el medio de cultivo. Inclusive en el biorreactor se recomienda bajar aun más el pH (hasta 4) para disminuir aun más el efecto proteolítico, ya que por la misma fricción por las aspás se aumenta la lisis celular y por ende la liberación de proteasas. pHs neutros o alcalinos no se recomiendan, debido a

que se activan las proteasas naturales de *Pichia pastoris*, mismas que luego degradarán el producto recombinante.

- 4) El porcentaje de metanol es importante en la eficiencia de la producción, ya que cuando es menor del 0.5 % conduce a una inducción ineficiente, por lo tanto entre menor sea, habrá baja o nula producción del recombinante. En contraste, altos porcentajes (por arriba del 1%) son tóxicos para la célula, las que se mueren, lisan, liberan las proteasas y por último conducen a la proteólisis de la proteína recombinante; por lo que se recomienda que el metanol no se pase del 1% en matraz. Donde es más crítica la concentración de este alcohol es en el biorreactor, no debiendo de pasar del 0.8%; sobre todo con las cepas Mut<sup>s</sup>, que son más susceptibles de intoxicación debido a la lenta metabolización del metanol.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

- 5) El tiempo de duración de la inducción de la fermentación en matraz típicamente se centra alrededor de las 100 hrs, pero puede ir hasta 120 e inclusive hasta las 150 hrs. El problema es que a tiempos largos de fermentación se incrementa la muerte y lisis celular, y por lo tanto la liberación de proteasas, repercutiendo en el rendimiento del producto. Lo importante es lograr los tiempos mínimos, con la máxima producción y la menor degradación del recombinante. Esto aplica principalmente

a la producción en biorreactor, donde se observa que a tiempos mayores de 70 hrs de inducción, la degradación del recombinante se hace notar. Además, a partir de este tiempo ya no se aprecia un aumento sustancial en la producción del recombinante.

A pesar de la alta similitud a nivel nucleotídico y aminoacídico entre las hormonas animales y humanas, la producción del recombinante varió de cepa a cepa entre diferentes construcciones, inclusive entre las mismas cepas tomadas de la misma placa. Esto nos muestra el comportamiento totalmente independiente e individual entra cada cepa.

Todas las cepas se fermentaron en matraz bajo distintas condiciones y se les determinó cuáles producían mejor la proteína recombinante en cuestión. Además, se determinaron las condiciones propicias donde prácticamente se produce cualquier recombinante de esta familia.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A continuación se describen las condiciones óptimas encontradas: se utilizó un medio rico, amortiguado con fosfatos a pH de 5 (aunque también se observó que el pH de 6 funciona bien), con 1 % de metanol y un tiempo de 96 horas de inducción a 30° Celsius con agitación de 300 r.p.m. Bajo éstas condiciones se logró la producción de cada recombinante de manera abundante para las nueve diferentes hormonas animales y humanas, siendo la excepción, como ya se dijo, los casos de la HGH-V y la HGH 20 kDa. Claro

que no se descarta que las probadas no hayan sido las mejores cepas (de hecho para el caso de la HGH 20 kDa, se probaron otras cepas que produjeron mayor cantidad de la proteína recombinante), o bien que con los pases de placa en placa para mantenerla, se haya afectado la producción del recombinante, como se ha visto en otras construcciones. Inclusive, que este sistema no sea tan eficiente en la producción para el caso particular de esa hormona. La producción de la FCGH y la HGH-V se vio favorecida en el medio rico, ya que en el medio mínimo prácticamente no se produjeron. En cambio el HPL se produjo eficientemente, tanto en medio rico, como en medio mínimo.

### **7.3 Comparación con otros sistemas productores de GH.**

De las diversas hormonas aquí producidas, prácticamente solo de dos (HGH 22 kDa y de la BGH) existe más información acerca de sus características y demás propiedades. Además, por ser las de mayor interés comercial, desde hace algunos años se encuentran disponibles en el mercado mundial.

El mercado para la HGH actualmente es de alrededor de \$2,000 millones de dólares y lo comparten principalmente las industrias Kabi, Genentech, Eli-Lilly y Novo Nordisk. Del resto de las hormonas no hemos encontrado referencias en la literatura científica que refieran la producción en su forma recombinante ni por levaduras, ni en bacterias. La excepción es la versión recombinante de la ECGH producida en *Escherichia coli*, la cual se

encuentra desde hace poco en el mercado australiano, comercializada por una compañía biotecnológica de ese país.

Para la HGH se tienen bien estandarizados los procesos de producción industrial en la bacteria *Escherichia coli*. Por ser ésta la de mayor interés industrial, se le ha invertido muchos millones de dólares y años de investigación para eficientar su proceso.

Hace más de 25 años que se inició con los primeros experimentos para producir la GH recombinante en *Escherichia coli*. La primera GH fue la de la rata (Seeburg y cols., 1978), siguiéndole la GH humana (Martial y cols., 1979; Olson y cols., 1981) y luego la GH bovina (Keshet y cols., 1981; Rosner y cols., 1982; Seeburg y cols., 1983; Schoner y cols., 1984), después la GH porcina (Seeburg y cols., 1983). De manera que a lo largo de todo este tiempo se ha mejorado la producción de los recombinantes.

Diversos investigadores han intentado producir en *Escherichia coli* la HGH en su forma madura, tal cual se produjeron en este trabajo las GHs y el HPL, fusionando el ADNc de la HGH a un péptido líder y enviándola al espacio periplásmico bacteriano, de donde es relativamente más fácil purificarla, si se compara con los cuerpos de inclusión; pero sobre todo, debido a las condiciones no reductoras del periplasma, en las que la proteína recombinante se pliega bien, adquiere sus puentes disulfuro y queda

correctamente estructurada (tal como sucede con las nuestras en el sistema de *Pichia pastoris*).

El mayor problema de enviarla al periplasma, aparte de que es más difícil la recuperación de la proteína de interés que si se hiciera del medio de cultivo como en nuestro caso, es la baja producción que se ha visto. Se han reportado valores para HGH de 8.6 mg/L (Kato y cols., 1987), 10-15 mg/L (Hsiung y cols., 1989), 20.6 (Oliveira y cols., 1999) y en el mejor de los casos 28 mg/L (Becker y Hsiung, 1986). En este último caso la HGH representó tan solo el 6% de las proteínas en relación al extracto celular total y del 30% de la fracción periplásmica. En contraste, nuestras hormonas recombinantes lograron constituir hasta más del 40% de las proteínas del medio, correspondiendo a 300 mg/L en el medio de cultivo en biorreactor y hasta más del 65% en el medio en matraz.

En cuanto a la recuperación de HGH del periplasma que obtuvieron Gerald y colaboradores en 1986, ésta fue del 70%, siendo muy similar a la que se obtuvo en la mayoría de los casos en nuestro trabajo. Por otro lado, respecto a la pureza de la HGH, Gerald y su grupo la obtienen alrededor del 90% cuantificada por densitometría sobre EGPA-SDS-Coomassie, similar a la que se obtuvo en nuestro trabajo para el HPL [pero analizada por EGPA-SDS-Plata y por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (resultados no mostrados)].

Existen otros casos similares donde la HGH se secreta al periplasma también en *Escherichia coli* (Ghorpade y Garg, 1993). Lo mismo se ha hecho pero para la hormona del crecimiento placentaria (Igout, 1993), también producida en cantidades muy bajas, al igual que para la HGH 20 kDa (Uchida y cols., 1997). Otra bacteria diferente a *Escherichia coli* donde también se ha producido la HGH, es el *Bacillus subtilis* (Franchi y cols., 1991).

Oliveira y cols., en 1999 describen un proceso bastante completo de producción y purificación de HGH en *Escherichia coli* secretada al espacio periplásmico en el que utilizan seis pasos de purificación (uno de precipitación selectiva y cinco de cromatografía). La HGH es obtenida con muy alto grado de pureza (grado farmacéutico), donde a pesar de tantos pasos logran rendimientos altos de más del 40% (mayor grado de pureza, pero menor rendimiento) y sobre todo que el análisis no es por EGPA-SDS-Coomassie, sino por CLAR utilizando filtración en gel de alta resolución y fase reversa. Con este procedimiento, ellos obtuvieron un producto bastante puro pero no probaron la actividad biológica.

Existe otro trabajo donde por seis pasos de purificación obtienen la met-HGH con alto grado de pureza, pero la recuperación fue apenas del 19% (Niimi y cols., 1987).

La producción de HGH del grupo de Oliveira fue relativamente baja de 412 mg en 20 litros en biorreactor, lo que se compensa escalando a cientos o miles de litros. Una de las desventajas del proceso anterior es el tiempo que tarda la purificación que es aproximadamente de cinco días, comparado con la de nosotros que es menor a un día. Otra desventaja es que el medio de cultivo utilizado, es un medio complejo con antibiótico, lo que encarece el proceso de producción, comparado con el medio de cultivo mineral que es económico y que es el utilizado en nuestro proceso.

Otra de las pocas ventajas de producirlo en bacteria es la rapidez de la fermentación, ya que en menos de un día se lleva a cabo, comparado con los cuatro a cinco días que tarda un proceso típico en *Pichia pastoris*, aunque nuestros procesos los hemos eficientado a solo tres días, de tal modo que el proceso completo que aquí describimos, incluyendo la purificación, llevaría cuatro días, comparado con los seis o siete que requiere el de *E. coli*.

Existen otros trabajos donde por estrategias más complejas han tratado de secretar al medio de cultivo la HGH producida en *Escherichia coli*, en aras de evitar la contaminación con las proteínas del huésped y así facilitar la purificación, pero los resultados son poco alentadores ya que la producción lograda es aun más baja que la periplásmica; se han reportado desde los 4.5 mg/L (Hsiung y cols., 1989) hasta los 11.2 mg/L (Kato y cols., 1987), y más recientemente se lograron purificar cantidades de apenas 1 mg/L de medio de cultivo (Lloubes y cols., 1993), comparado con el sistema

aquí descrito que también secreta al medio de cultivo pero en cantidades que superan hasta en cientos de veces al de *Escherichia coli*.

Existe un trabajo aislado donde un grupo de investigadores construyeron un sistema secretor de HGH al medio de cultivo pero en una levadura, *Hansenula polymorpha*, donde reportan la producción de HGH de hasta 2 g/L, aunque no reportan purificación ni ensayo de actividad biológica (Aprikan y cols., 1991).

El sistema de *Escherichia coli* donde se produce la HGH en mayor cantidad, es el de cuerpos de inclusión, que por la sobreproducción del recombinante se precipita y se acumula en el citoplasma como gránulos insolubles. Existen reportes donde se han alcanzado niveles de producción en *Escherichia coli* de met-HGH de más de 1600 mg/L con recuperaciones del 50% y pureza del 99% (analizada por EGPA-SDS-Coomassie) y la actividad biológica se probó en la línea celular Nb2 (Patra y cols., 2000).

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

También se ha reportado la producción en biorreactor de la GH de borrego (OGH) y de la HGH en *Escherichia coli* donde se alcanzan niveles de 3.2 g/L (Panda, 2003). La mayor desventaja de este sistema está implícita en su gran producción, debido a que la proteína recombinante se va agregando hasta precipitarse y formar los llamados cuerpos de inclusión que se acumulan en el citoplasma de donde hay que liberarlos por disrupción celular, solubilizarlos, procesarlos bajo estrictas condiciones para que

posteriormente se pueda renaturalizar adecuadamente la hormona, y sobre todo que ya pura quede con la actividad biológica deseada, de lo contrario no sirve de nada que haya una gran producción. Todo esto lo hace un proceso largo, tedioso y caro. Además de que el medio de cultivo utilizado es complejo, lo que encarece más el proceso.

La producción de HGH por Patra y cols., supera a las de nosotros, pero con la serie de desventajas ya mencionadas. Por lo que nuestro sistema pudiera resultar más atractivo para la industria, siendo una buena opción al tradicional de *Escherichia coli*. Aun más, se sigue trabajando para mejorar las cepas productoras de estas hormonas recombinantes. Además, existe un reporte reciente de un trabajo similar al que aquí se describe, pero para la hormona del crecimiento del cerdo (PGH), donde se logra producir 900 mg/L en cepas multicasetes de *Pichia pastoris* y tan solo a nivel de matraz (Ouyang y cols., 2003); en fermentador se espera que se incremente sustancialmente la producción. Este grupo al igual que nosotros también probó la actividad biológica en la línea celular Nb2, resultando con actividad similar a la que aquí reportamos para las GHs animales.

De hecho existe un reporte previo de nuestro laboratorio de producción de HGH en biorreactor por *Pichia pastoris* donde se consiguen alrededor de 50 mg/L (Escamilla y cols., 2000). Este proceso se ha venido eficientando, de manera que actualmente se ha logrado producir y secretar

la HGH al medio de cultivo en cantidades de alrededor de 300 mg/L (resultados no mostrados).

Otro de los grandes productores es *Saccharomyces cerevisiae*, microorganismo que ha sido clasificado como GRAS (generalmente considerado como seguro), lo que sin duda es una ventaja sobre el resto de los microorganismos que están en espera del proceso de regulación y aprobación gubernamental para los productos recombinantes, como es el caso de *Pichia pastoris*. En *Saccharomyces cerevisiae* se ha reportado hasta 1,300 mg/L de HGH secretada al medio de cultivo (Lee y cols., 1999). Por mejoramiento del sistema anterior se ha llegado a producir de 1,500 a 2,000 mg/L; estas cepas son construidas para fines de producción industrial (<http://www.protheon.com/hgh-yeast.htm>).

Investigadores del mismo grupo han desarrollado sistemas de *Escherichia coli* que produce la HGH como proteína de fusión, reportando producciones de 8.9 hasta 15.0 g/L. Por contener una etiqueta de polihistidinas, el producto recombinante lo purifican por columnas de afinidad de Ni<sup>+2</sup>, y además, por presentar también el sitio de corte para la enzima enterocinasa, separan la HGH de la etiqueta de histidinas, en seguida la purifican por intercambio iónico logrando una recuperación del 25% que corresponde a 2.22 g con una pureza alrededor del 99% (Shin y cols., 1998a; Shin y cols., 1998b). Anteriormente ya se había descrito algo

parecido al sistema anterior, pero con menor producción de HGH (Mukhija y cols., 1995).

Los niveles de proteínas que se lograron con las cepas aquí construidas y con las que probamos, van de los 100 mg/L hasta los 300 mg/L, dependiendo de las cepas ensayadas. Estos valores empiezan a ser atractivos para la industria, no obstante aun podemos mejorar las cepas y el proceso para aumentar la producción, siendo la meta alcanzar un par de gramos de GH por litro de medio de cultivo.

#### **7.4 Semipurificación de las hormonas recombinantes.**

En relación al proceso de semipurificación, éste se llevó a cabo de una manera rápida y sencilla con la resina de intercambió aniónico (QS-FF). Esta resina resultó con muchas ventajas en nuestro sistema, ya que las GHs animales por presentar puntos isoeléctricos (pI) básicos no se pegan a la resina bajo las condiciones aquí ensayadas, lo que nos permitió semipurificarlas de manera fácil en menos de un día.

Por otro lado, las proteínas contaminantes de *Pichia pastoris*, según las analizamos por isoelectroenfoque, tienden a ser de pI ácido (resultados no mostrados), por lo que éstas si se pegan a la resina, y de esta manera se pueden separar de las proteínas recombinantes de interés. Diferente comportamiento se observó para las humanas (el HPL y la HGH), que por presentar pI ácido, éstas si se pegaron a la resina.

El HPL se suelta alrededor de 200-300 mM de NaCl, obteniéndose con una muy buena pureza de alrededor del 90%. En cambio la HGH, si bien su pureza fue relativamente buena, se comportó de manera no esperada, ya que se desprendió de la columna a lo largo de toda la escala de NaCl (50 a 400 mM); de aquí que la recuperación indicada en este trabajo de 28% sea relativamente baja, debido a que se escogió la fracción de 200 mM de NaCl que fue la que presentó la mayor pureza, pero baja recuperación, ya que el resto de HGH se distribuyó en las diferentes concentraciones de sal y estas fracciones no se pudieron incluir, ya que presentaban mayor contaminación con proteínas de la levadura.

Aun queda por mejorar el proceso de purificación sobre todo para la HGH que fue la que más trabajo presentó. Inclusive también intentamos purificarla por isoelectroenfoque en el sistema ROTOFOR de Bio-Rad, pero migró en una banda muy ancha de pHS de 3 a 10 (resultados no mostrados). A la fecha no hay reportes de protocolos de purificación de GHs producidas en *Pichia pastoris*, excepto por el ya mencionado para la PGH (Ouyang y cols., 2003) en el cual este grupo obtuvo resultados muy parecidos a los aquí descritos. Al igual que ellos, se probaron varios tipos de resinas y la que mejor resultó fue el intercambio aniónico.

También, ensayamos la purificación en cromatografía líquida de baja presión (FPLC) con otras resinas de intercambio aparte de la QS-FF; la DEAE-Celulosa y la DEAE-Sephadex, comportándose de manera similar con

las GHs (resultados no mostrados). En sí el proceso se comporta algo diferente al multicitado de *Escherichia coli*.

Cabe mencionar, que si bien los valores de pureza descritos para la mayoría de estos trabajos en *Escherichia coli* andan en alrededor del 90%, están analizados por densitometría en EGPA-SDS teñidos con Coomassie. En cambio, nosotros los determinamos con tinción con plata, la cual es mucho más sensible, por lo que se pueden apreciar mejor las proteínas contaminantes, dándonos una idea más clara del grado de contaminación; claro que esto nos lleva a subestimar el grado de pureza, ya que la pureza es relativa a la técnica con que se detecten los contaminantes.

Por otra parte, los resultados aquí mostrados de porcentaje de recuperación y de pureza corresponden a muestras de biorreactor, las cuales siempre vienen cargadas con más proteínas contaminantes por la lisis celular incrementada en parte por la fricción con las aspas del fermentador.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuando llevamos a cabo los primeros ensayos de purificación eran de muestras provenientes de matraz, las cuales de entrada estaban menos contaminadas. Por ejemplo, para la CFGH el porcentaje en el medio de cultivo en relación a las contaminantes fue de más del 60% y cuando se semipurificaba por intercambio aniónico, la pureza obtenida era mayor del 90% y la recuperación de alrededor del 80%. Estos resultados ya no se

incluyeron por enfocarse más el trabajo a la purificación de GHs a partir de biorreactor.

Otros resultados que tampoco se incluyeron son los de la purificación de las GHs, pero con resina de intercambio aniónico (QS-FF) nueva (no reciclada), la cual nos permitió obtener resultados mejores. Por ejemplo, para la BGH proveniente de biorreactor logramos una pureza de alrededor del 90% y además analizada con tinción de plata. Estos resultados con valores más altos de pureza, se pueden explicar por el intenso uso al que se sometió la resina antigua y a la gran cantidad de muestras que se procesaron, que con el tiempo van mermando la capacidad de la resina, a pesar del buen manejo y mantenimiento adecuado que se le dio.

### **7.5 Otros análisis.**

Otros de los análisis que se realizaron fue determinar si existía glicosilación en las GHs y el HPL, los primeros resultados parecen indicar que probablemente el HPL presenta glicosilación (resultados no mostrados). Del resto de las GHs hay que llevar a cabo más ensayos para poder concluir si alguna de estas está glicosilada, sobre todo la HGH-V, la cual en la naturaleza presenta glicosilación.

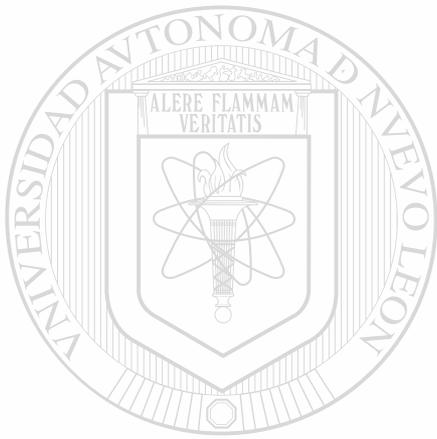
Por último, también se procesaron las muestras de cada hormona recombinante producida en biorreactor, con el fin de determinar la secuencia aminoacídica. Los primeros resultados de los 25-26 aminoácidos leídos nos

indicaron que el HPL y la FCGH si corresponden a la secuencia natural reportada. Además, para la FCGH se apreció cierta microheterogeneidad en las posiciones 4 (muy claramente) y 13 y 25 (con cierto nivel de duda) en las que se observan dos aminoácidos. Los tres cambios son consistentes con el cambio de una sola base en cada uno de los tres codones involucrados. A partir de la posición 21 se observan varios aminoácidos en cada ciclo, posiblemente como resultado de rupturas en el interior de la proteína; sin embargo, el residuo más abundante es el indicado arriba y concuerda con la secuencia esperada (resultados no mostrados).

Para el HPL también se apreció cierta microheterogeneidad en las posiciones 14 (muy claramente), 21 (dudoso) y 23 y 25 (con cierto nivel de duda), en las que se observan dos aminoácidos. Nuevamente, tres cambios (posiciones 14, 23 y 25) son consistentes con el cambio de una sola base en cada uno de los tres codones involucrados (resultados no mostrados).

Finalmente podemos decir, que si bien actualmente las GHs que se encuentran en el mercado son producidas en el sistema de *Escherichia coli*, esto se debe a que no existe un sistema opcional como el aquí descrito, que tenga ventajas en la producción de las GHs recombinantes, como lo son la producción y la secreción abundante del recombinante correctamente procesado (en su forma madura y nativa) hacia el medio de cultivo a partir del cual se facilita su purificación. Y sobre todo que *Pichia pastoris* las produce con plena actividad biológica, la que conservan después de haber

sido purificadas. Lo que sin duda indica que vamos en el camino correcto, requiriéndose mejorar el proceso de producción y purificación de estos importantes reguladores metabólicos.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 8. CONCLUSIONES

1. Se construyeron cepas de *Pichia pastoris* que tienen integrados los "casetes" de las GHs canina, equina, felina y PL humano. A estas se le sumaron cepas previamente construidas en nuestro laboratorio para las GHs de 22 y 20 kDa, así como la de la bovina.
2. Es la primera vez que se producen en este sistema en biorreactor y se semipurifican las versiones recombinantes de las GHs de perro, caballo, gato, vaca, humano y del HPL.
3. Las hormonas fueron eficientemente producidas, procesadas y secretadas hacia el medio de cultivo.
4. Cada hormona constituye la principal banda entre las proteínas secretadas de *Pichia pastoris* a juzgar por la EGPA-SDS.
5. Los fenotipos Mut<sup>s</sup> son mejores productores de GHs, como se observó para el caso de la CFGH y para el HPL.

6. Con el biorreactor se aumentó de 10 a 20 veces la producción del recombinante en relación al matraz.

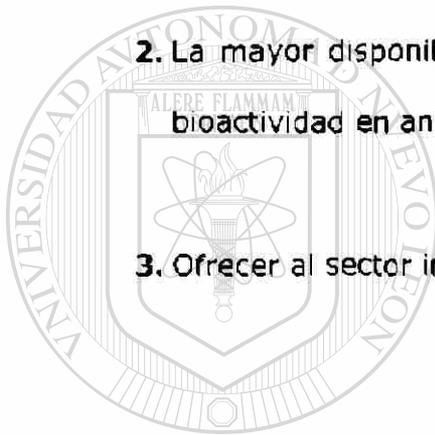
7. La cromatografía de intercambio aniónico fue la mejor opción en todos los casos para la semipurificación de las GHs y del HPL en este sistema.

8. Las hormonas mostraron actividad biológica en el ensayo de células Nb2, notándose que las humanas presentaron mayor actividad que las GHs animales, concluyendo que *Pichia pastoris* las produce, procesa y secreta de forma adecuada, confirmando su correcta conformación.

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

## 10. PERSPECTIVAS

1. Expresar a nivel de laboratorio, e incluso planta piloto escalando la producción de proteínas recombinantes.
2. La mayor disponibilidad de las GHs permitirá iniciar los estudios de bioactividad en animales de laboratorio y de granja.
3. Ofrecer al sector industrial tecnología y asesoría en el campo.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 10. BIBLIOGRAFIA

**Aloj, S.,** Edelhoich, H. (1971). The molecular properties of human chorionic somatomammotropin. *J. Biol. Chem.* **246**(16):5047-5052.

**Aprikian, P.G.,** Karpichev, I.V., Mikhailover, V.M., Gracheva, V.D., Shchedrin, A.M., Beburov, M.Iu., El'darov, M.A., Skriabin, K.G. (1991). Expression and secretion of human growth hormone (hGH) in methylotrophic yeasts *Hansenula polymorpha*. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* **321**(2):390-394.

**Ascacio-Martínez, J.A.,** Barrera-Saldaña H.A. (1994a). A dog growth hormone cDNA codes for a mature protein identical to pig growth hormone. *Gene.* **143**(2):277-80.

*Gene.* **143**(2):277-80.

**Ascacio-Martínez, J.A.,** Barrera-Saldaña H.A. (1994b). Sequence of a cDNA encoding horse growth hormone. *Gene.* **143**(2):299-300.

**Ascacio-Martínez, J.A.,** Barrera-Saldaña H.A. (2004). Abundant production and secretion of biologically active recombinant canine growth hormone by *Pichia pastoris*. *Gene.* Enviado.

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

**Baldi, A. (1999).** Manipulation of milk production and quality by use of somatotropin in dairy ruminants other than cow. *Domest. Anim. Endocrinol.* **17(2-3):131-137.**

**Baldi, A., Modina, S., Cheli, F., Gandolfi, F., Pinotti, L., Scesi, L.B., Fantuz, F., Dell'Orto, V. (2002).** Bovine somatotropin administration to dairy goats in late lactation: effects on mammary gland function, composition and morphology. *J. Dairy Sci.* **85(5):1093-1102.**

**Baldo, B.A. (1984).** Milk allergies. *Austr. J. Dairy Technol.* **39: 120-128.**

**Barrera-Saldaña, H.A. (1998).** Growth hormone and placental lactogen: biology, medicine and biotechnology. *Gene.* **211(1):11-18.**

**Barrera-Saldaña, H.A. (2000).** *Harmonas del crecimiento: Clonación y evaluación de sus propiedades en la biotecnología médica, veterinaria, pecuaria y piscícola.* Solicitud presentada a la Combocatoria Biotecnología 2000 del CONACYT.

**Barrera-Saldaña, H.A.** (2001). BIOTECNOLOGIA MODERNA PARA EL DESARROLLO DE MEXICO EN EL SIGLO XXI: RETOS Y OPORTUNIDADES. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

**Barrera-Saldaña, H.A.,** Ascacio-Martínez Jorge A., Castro Peralta Felipa. (2000). Proyecto Genoma Humano en la UANL. Parte IX. Aplicaciones en la biotecnología animal". CIENCIA UANL. VOL. III, No. 2, ABRIL-JUNIO: 182-190.

**Barrera-Saldaña, H.A.,** Seeburg, P.H., Saunders, G.F. (1983). Two structurally different genes produce the secreted human placental lactogen hormone. J. Biol. Chem. **258**:3787-3793.

**Bauman, D.E.** (1989). Regulation of Nutrient Partitioning: Homeostasis, Homeorhesis and Exogenous Somatotropin. Keynote lecture in: Seventh International Conference on Production Disease in Farm Animals, F.A. Kallfelz pp: 306-323.

**Bauman, D.E.,** Hard, D.L., Crooker, B.A., Partridge, M.S., Garrick, K., Sandles, L.D., Erb, H.N., Franson, S.E., Hartnell, G.F., Hintz, R.L. (1989). Long-term evaluation of a prolonged-release formulation of N-methionyl bovine somatotropin in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. **72**(3):642-651.

**Becker, G.W.,** Bowsher, R.R., Mackellar, W.C., Poor, M.L., Tackitt, P.M., Riggan, R.M. (1987). Chemical, physical, and biological characterization of a dimeric form of biosynthetic human growth hormone. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **9**(6):478-487.

**Becker, G.W.,** Hsiung, H.M. (1986). Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. Purification and characterization. *FEBS Lett.* **204**(1):145-150.

**Boutinaud, M.,** Rousseau, C., Keisler, D.H., Jammes, H. (2003). Growth Hormone and Milking Frequency Act Differently on Goat Mammary Gland in Late Lactation. *J. Dairy Sci.* **86**:509-520.

**Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Brenneman, J.C.** (1978). *Basics of food allergy*. Charles C. Thomas Publ., Springfield, Illinois.

**Cab-Barrera, E.L.** (2000). Construcción de una cepa de *Pichia pastoris* sobreproductora de la isoforma de 20 kDa de la hormona del crecimiento humana recombinante. Tesis de maestría. ULIEG, Facultad de Medicina, UANL., México.

**Campbell, R.M.,** Kawauchi, H., Lewis, U.J., Papkoff, H., Scanes, C.G. (1991). Comparison of lipolytic and antilipolytic activities of lower vertebrate growth hormones on chicken adipose tissue in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **197(4):**409-415.

**Cant, A.J.,** Bailes, J.A., Marsden, R.A., (1985). Cow's milk, soya milk and goat milk in a mother's diet causing eczema and diarrhoea in her breast fed infant. *Acta Paediatr. Scand.* **74:** 467-468.

**Castro-Peralta, F.** Barrera-Saldana, H.A. (1995). Cloning and sequencing of cDNA encoding the cat growth hormone. *Gene.* **160(2):**311-312.

**Cereghino, J.L.,** Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24(1):**45-66.

**Chen, H.C.,** Wilhelmi, A.E., Howard, S.C. (1970). Purification and characteristics of porcine growth hormone. *J. Biol. Chem.* **245(13):**3402-3406.

**Chen, E.Y.,** Liao, Y.C., Smith, D.H., Barrera-Saldaña, H.A., Gelinas, R.E., Seeburg, P.H. (1989). The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics.* **4(4):**479-497.

**Clare, J.J.,** Rayment, F.B., Sreekrishna, K., Romanos, M.A. (1991a). High Level Expression of Tetanus Toxin Fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology* **9**: 455-460.

**Clare, J.J.,** Romanos, M.A., Rayment, F.B., Rowedder, J.E., Smith, M.A., Payne, M.M., Sreekrishna, K. Henwood, C.A. (1991b). Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*. **105(2)**:205-212.

**Clark, J.M.** (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **16(20)**:9677-9686.

**Cregg, J.M.,** Cereghino, J.L., Shi, J., Higgins, D.R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* **16(1)**:23-52.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Daughaday, W.H.** (1985). The anterior pituitary. *Williams textbook of Endocrinology*. Ed Philadelphia, WB Saunders. 568-613.

**Davis, J.J.,** Sahlu, T., Puchala, R., Herselman, M.J., Fernandez, J.M., McCann, J.P., Coleman, S.W. (1999). The effect of bovine somatotropin treatment on production of lactating angora does with kids. *J. Anim. Sci.* **77(1)**:17-24.

**Denizot, F., Lang, R. (1986).** Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* **89(2):271-277.**

**Devlin, R.H., Byatt, J.C., Maclean, E., Yesaki, T.Y., Krivi, G.G., Jaworski, E.G., Clarke, W.C. (1994).** Bovine placental lactogen is a potent stimulator of growth and displays strong binding to hepatic receptor sites of coho salmon. *General and Comparative Endocrinology.* **95:31-41.**

**Eigenmann, J.E. (1981).** Diagnosis and treatment of dwarfism in a German Shepherd dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **17:798-804.**

**Elia, G., Jamieson, J., Gross, S. (1999).** *Staying Young: Growth Hormone and Other Natural Strategies to Reverse the Aging Process.* Age Reversal Press. First Edition pp:120.

**Ellis, S.B., Brust, P.F., Koutz, P.J., Waters, A.F., Harpold, M.M., Gingeras, T.R. (1985).** Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **5:1111-1121.**

**Escamilla-Treviño, L.L., Viader Salvado, J.M., Barrera Saldaña, H., Guerrero Olazarán, M. (2000).** "Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia Pastoris*. *Biotechnology Letter.* **22:109-114**

**Etherton, T.D.,** Kensinger, R.S. (1984). Endocrine regulation of fetal and postnatal meat animal growth. *J. Anim. Sci.* **59**(2):511-528.

**Evoock, C.M.,** Etherton, T.D., Chung C.S., Ivy, R.E. (1988). Pituitary porcine growth hormone (pGH) and a recombinant pGH analog stimulate pig growth performance in a similar manner. *J. Anim. Sci.* **66**(8):1928-1941.

**Faber, K.N.,** Harder, W., Veenhuis, M. (1995). Review: Yeasts as Factories for the Production of Foreign Proteins. *Yeast.* **11**:1131-1344.

**Farmer, S.W.,** Light, P., Papkoff, H. (1977). Biological activity of bullfrog growth hormone in the rat and the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Endocrinology.* **101**(4):1145-1150.

**Farmer, S.W.,** Papkoff, H. (1979). In: *Hormones and evolution.* (Ed. E.J.W. Barrington). Academic Press, New York. pp:525-559.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Farmer, S.W.,** Papkoff, H., Hayashida, T. (1976). Purification and properties of reptilian and amphibian growth hormones. *Endocrinology.* **99**(3):692-700.

**Franchi, E.,** Maisano, F., Testori, S.A., Galli, G., Toma, S., Parente, L., Ferra, F.D., Grandi, G. (1991). A new human growth hormone production process using a recombinant *Bacillus subtilis* strain. *J. Biotechnology*. **18**:41-54.

**Friesen, H.** (1965). Purification of a Placental Factor with Immunological and Chemical Similarity to Human Growth Hormone. *Endocrinology*. **76**:369-381.

**Frigeri, L.G.,** Peterson, S.M., Lewis, U.J. (1979). The 20,000-dalton structural variant of human growth hormone: lack of some early insulin-like effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**(3):778-782.

**Fronk, T.J.,** Peel, C.J., Bauman, D.E., Gorewit, R.C. (1983). Comparison of different patterns of exogenous growth hormone administration on milk production in Holstein cows. *J. Anim Sci.* **57**(3):699-705.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Gallardo-Blanco, H.L.** (1999). Construcción de Cepas de *Pichia pastoris* portadoras del ADNc de la hormona del Crecimiento Bovino. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UANL.

**Gerlier, D.,** Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods.* **94**(1-2):57-63.

**Ghorpade, A.,** Garg, L.C. (1993). Efficient processing and export of human growth hormone by heat labile enterotoxin chain B signal sequence. *FEBS Lett.* **330**(1):61-65.

**Gietz, R.D.,** Schiestl, R.H. (1991). Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast.* **7**(3):253-263.

**Gietz, R.D.,** Schiestl, R.H., Willems, A.R., Woods, R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast.* **11**(4):355-60.

**Gietz, R.D.,** Woods, R.A. (2001). Genetic transformation of yeast. *Biotechniques.* **30**(4):816-820, 822-826, 828.

**Gietz, R.D.,** Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* **350**:87-96.

**Goeddel, D.V.,** Heyneker, H.L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itajura, K., Yansura, D.G., Ross, M.J., Miozarri, G., Crea, R., Seeburg, P. (1979). Direct expression in *Escherichia coli* of a ADN sequence coding for human growth hormone. *Nature.* **281**(5732):544-548.

**Haenlein, G.F.** (1985). Dimensions of the goat milk industry in the USA. Proceedings International Seminar on Production and Utilization of Ewe's and Goat Milk, Athens, Greece. *IDF Bul.* **202**:215-217.

**Haenlein, G.F.** (1996). Status and prospects of the dairy goat industry in the United States. *J. Anim. Sci.* **74**(5):1173-1181.

**Hankin, M.** (1992). New products association needs you. *Dairy Goat J.* Jan.-Febr., 24.

**Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K.** (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods.* **119**(2):203-10.

**Henderson, A.J., Blatchford, D.R., Peaker, M.** (1985). The effects of long-term thrice-daily milking on milk secretion in the goat: evidence for mammary growth. *Q. J. Exp. Physiol.* **70**(4):557-565.

**Hill, L.W.** (1939). Immunological relationships between cow's milk and goat milk. *J. Pediatrics.* **15**:157-162.

**Host, A., Husby, S., Osterballe, O.** (1988). A prospective study of cow's milk allergy in exclusively breast-fed infants. *Acta Paediatr. Scand.* **77**: 663-670.

**Hsiung, H.M., Cantrell, A., Luirink, J., Oudega, B., Veros, A.J., Becker, G.W. (1989).** Use of bacteriocin release protein in *E. coli* for excretion of human growth hormone into the culture medium. *Bio/Technology*. **7**:267-271.

<http://www.protheon.com/hgh-yeast.htm>

**Hwang, L.H., Chen, B.F., Lee, P.J., Ho, S.Y., Liu, J.J. (1992).** Use of helper-free retroviral vector to direct a high expression of porcine growth hormone in mouse fibroblast cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **16**(2):171-181.

**Igout, A., Van Beeumen, J., Frankenne, F., Scippo, M.L., Devreese, B., Hennen, G. (1993).** Purification and biochemical characterization of recombinant human placental growth hormone produced in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **295**(Pt 3):719-724.

**Invitrogen. (2000).** Products for Gene Expression and Analysis. Instruction manual. Pichia Expression Kit. Protein Expression. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris* . Version L.

**Jackson, C. (1992).** Production and marketing of goat milk products. Proceedings Vth International Conference on Goats, New Delhi, India. ICAR Publ., New Delhi. **2**(II):599-603.

**Jo, J.M., Lee, T.H., Jeong, H.H., Lee, Y.B., Lee, T.G., Park, Y.W., 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.

**Josimovich, J.B., MacLaren, J.A.** (1962). Presence in the human placenta and term serum of a highly lactogenic substance immunologically related to pituitary growth hormone. *Endocrinology*. **71**:209-220.

**Juarez-Aguilar, E., Castro-Munozledo, F., Guerra-Rodriguez, N.E., Resendez-Perez, D., Martinez-Rodriguez, H.G., Barrera-Saldana, H.A., Kuri-Harcuch, W.** (1999). Functional domains of human growth hormone necessary for the adipogenic activity of hGH/hPL chimeric molecules. *J. Cell Sci.* **112**(18):3127-3135.

**Juskevich, J.C., Guyer, C.G.** (1990). Bovine growth hormone: human food safety evaluation. *Science*. **249**(4971):875-884.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Kapture, J.** (1982). An overview of problems in marketing dairy goat products in the USA. *Proceedings IIIrd International Conference on Goat Production and Disease*, Tucson, Arizona. DGJ Publ., Scottsdale, Arizona, p. 63-67.

**Kato, C.,** Kobayashi, T., Kudo, T., Furusato, T., Murakami, Y., Tanaka, T., Baba, H., Oishi, T., Ohtsuka, E., Ikehara, M. (1987). Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from *Escherichia coli*. *Gene*. **54**(2-3):197-202.

**Kaufman, D.L.,** Evans, G.A. (1990). Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *Biotechniques*. **9**(3):304-306.

**Kerr, D.E.,** Liang, F., Bondioli, K.R., Zhao, H., Kreibich, G., Wall, R.J., Sun, T.T. (1997). The bladder as a bioreactor: Urothelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nature Biotechnology*. **16**:75-78.

**Keshet, E.,** Rosner, A., Bernstein, Y., Gorecki, M., Aviv, H. (1981). Cloning of bovine growth hormone gene and its expression in bacteria. *Nucleic Acids Res.* **9**(1):19-30.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**Klindt, J.,** Buonomo, F.C., Yen, J.T. (1992). Administration of porcine somatotropin by sustained-release implant: growth and endocrine responses in genetically lean and obese barrows and gilts. *J. Anim. Sci.* **70**(12):3721-3733.

**Klindt, J.,** Buonomo, F.C., Yen, J.T. (1995). Administration of porcine somatotropin by sustained-release implant: growth, carcass, and sensory responses in crossbred white and genetically lean and obese boars and gilts. *J. Anim. Sci.* **73**(5):1327-1339.

**Klinger, I.,** Rosenthal, I. (1997). Public health and the safety of milk and milk products from sheep and goats. *Rev. Sci. Tech.* **16**(2):482-488.

**Knight, C.H.** (1992). Milk yield responses to sequential treatments with recombinant bovine somatotropin and frequent milking in lactating goats. *J. Dairy Res.* **59**(2):115-122.

**Kostyo, J.L.,** Cameron, C.M., Olson, K.C., Jones, A.J., Pai, R.C. (1985). Biosynthetic 20-kilodalton methionyl-human growth hormone has diabetogenic and insulin-like activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **82**(12):4250-4253.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Kuri-Harcuch, W.,** Green, H. (1978). Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **75**(12):6107-6109.

**Larson, B.L.** (1978). The dairy goat as a model in lactation studies. *J. Dairy Sci.* **61**(7):1023-1029.

**Lawson, D.M.,** Sensui, N., Haisenleder, D.H., Gala, R.R. (1982). Rat lymphoma cell bioassay for prolactin: observations on its use and comparison with radioimmunoassay. *Life Sci.* **31**(26):3063-3070.

**Leal-Klevezas, D.S.,** Martinez-Vazquez, I.O., Cuevas-Hernandez, B., Martinez-Soriano, J.P. (2000). Antifreeze solution improves DNA recovery by preserving the integrity of pathogen-infected blood and other tissues. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**(6):945-946.

**Leal-Klevezas, D.S.,** Martinez-Vazquez, I.O., Lopez-Merino A, Martinez-Soriano, J.P. (1995). Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* **33**(12):3087-3090.

**Lee, J.,** Choi, S.I., Jang, J.S., Jang, K., Moon, J.W., Bae, C.S., Yang, D.S., Seong, B.L. (1999). Novel secretion system of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using an N-terminus residue of human IL-1 beta as secretion enhancer. *Biotechnol. Prog.* **15**(5):884-890.

**Lewis, U.J.,** Peterson, S.M., Bonewald, L.F., Seavey, B.K., VanderLaan, W.P. (1977). An interchain disulfide dimer of human growth hormone. *J. Biol. Chem.* **252**(11):3697-3702.

**Lewis, U.J., Singh, R.N., Tutwiler, G.F. (1981).** Hyperglycemic activity of the 20,000-dalton variant of human growth hormone. *Endocr. Res. Commun.* **8(3):155-164.**

**Llobes, R., Vita, N., Bernadac, A., Shire, D., Leplatois, P., Geli, V., Frenette, M., Knibiehler, M., Lazdunski, C., Baty, D. (1993).** Colicin A lysis protein promotes extracellular release of active human growth hormone accumulated in *Escherichia coli* cytoplasm. *Biochimie.* **75(6):451-458.**

**Loewenstein, M., Speck, S.J., Barnhart, H.M., Frank, J.F. (1980).** Research on goat milk products: a review. *J. Dairy Sc.* **63:1631-1648.**

**Lothe, L., Lindberg, T., Jacobson, I. (1982).** Cow's milk formula as a cause of infantile colic. A double-blind study. *Pediatrics* **70:7-10.**

**Marchuk, D., Drumm, M., Saufino, A., Collins, F.S. (1991).** Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* **19(5):1154.**

**Martial, J.A., Hallewell, R.A., Baxter, J.D., Goodman, H.M. (1979).** Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science.* **205(4406):602-607.**

**Merril, C.R.** (1990). Gel Staining Techniques. *Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology* (Methods in Enzymology Series, Vol 182). Murray P., Deutscher John N. y Abelson. pp. 477.

**Miller, W.L., Martial, J.A., Baxter, J.D.** (1980). Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. *J. Biol. Chem.* **255**:7521-7524.

**Millis, D.L., Wilkens, B.E., Daniel, G.B., Hubner, K., Mathews, A., Buonomo, F.C., Patell, K.R., Weigel, J.P.** (1998). Radiographic, densitometric, and biomechanical effects of recombinant canine somatotropin in an unstable osteotomy gap model of bone healing in dogs. *Vet. Surg.* **27**:85-93.

**Mole, S.E., Iggo, R.D., Lane, D.P.** (1989). Using the polymerase chain reaction to modify expression plasmids for epitope mapping. *Nucleic Acids Res.* **17**(8):3319.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Morelle, G.** (1989). A plasmid extraction procedure on a miniprep scale. *Focus.* **11**:7-8.

**Morikawa, M., Green, H., Lewis, U.J.** (1984). Activity of human growth hormone and related polypeptides on the adipose conversion of 3T3 cells. *Mol. Cell Biol.* **4**(2):228-231.

**Morikawa, M.,** Nixon, T., Green, H. (1982). Growth hormone and the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell*. **29**(3):783-789.

**Mosmann, T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. **65**(1-2):55-63.

**Mount, R.C.,** Jordan, B.E., Hadfield, C. (1996). Transformation of lithium-treated yeast cells and the selection of auxotrophic and dominant markers. *Methods Mol. Biol.* **53**:139-145.

**Mukhija, R.,** Rupa, P., Pillai, D., Garg, L.C. (1995). High-level production and one-step purification of biologically active human growth hormone in *Escherichia coli*. *Gene*. **165**(2):303-306.

**Muller, G.H.** Kirk, R.W. Scott, D.W. (1989). *Small animal dermatology*. Philadelphia, WB. Saunders. 4th Edition. 575-657.

**Nestle, W.** (1987). Allergy to cow milk proteins. *Med. Enfance*. **9**:163-166.

**Niall, H.D.,** Hogan, M.L., Sayer, R., Rosenblum, I.Y, Greenwood, F.C. (1971). Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **68**:866-869.

**Niimi, S.,** Hayakawa, T., Oshizawa, T., Uchida, E., Yamaha, T., Terao, T., Ohtsuka, E., Ikehara, M. (1987). Purification and characterization of the product of chemically synthesized human growth hormone gene expression in *Escherichia coli*. *Chem. Pharm. Bull.* **35**(10):4221-4228.

**Nixon, T.,** Green, H. (1984). Contribution of growth hormone to the adipogenic activity of serum. *Endocrinology.* **114**(2):527-532.

**Olson, K.C.,** Fenno, J., Lin, N., Harkins, R.N., Snider, C., Kohr, W.H., Ross, M.J., Fodge, D., Prender, G., Stebbing, N. (1981). Purified human growth hormone from *E. coli* is biologically active. *Nature.* **293**(5831):408-411.

**Ouyang, J.,** Wei, P.H., Yang, L., Xie, M.Q., Yang, J., Long, Q.X., Wang, X.Z. (2000). Expression of porcine growth hormone gene in baculovirus vector system. *Clin. Virol.* **15**:285-290.

**Ouyang, J.,** Long, Q.X., Yang, L., Wang, X.Z. (2002). Secretion expression of porcine growth hormone gene in insect cells. *Acta Vet. Zool. Sin.* **33**:482-485.

**Ouyang, J.,** Wang, J., Deng, R., Long, Q., Wang, X. (2003). High-level expression, purification, and characterization of porcine somatotropin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification.* **32**(1):28-34.

**Ouyang, J.,** Yang, L., Long, Q.X., Wang, X.Z., Xing, K., Wei, P.H. (2001). High level secretion expression of porcine somatotropin gene in *Pichia pastoris* and N-glycosylation analysis of products. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* **17**(5):520-525.

**Palma-Nicolás, J.P.** (2001). Clonación molecular del DNAC de la hormona variante del crecimiento humano y su expresión en *Pichia pastoris*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UANL, México.

**Panda, A.K.** (2003). Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **85**:43-93.

**Patra, A.K.,** Mukhopadhyay, R., Mukhija, R., Krishnan, A., Garg, L.C.,

Panda, A.K. (2000). Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*.

*Protein Expr. Purif.* **18**(2):182-192.

**Pavlakís, G.N.,** Hizuka, N., Gorden, P., Seburg, P.H., Hamer, D.H. (1981). Expression of two human growth hormone genes in monkey cell infected by simian virus 40 recombinants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**:7398-7402.

**Peel, C.J.,** Bauman, D.E. (1987). Somatotropin and Lactation. *J. Dairy Sci.* **70**:474-486.

**Peel, C.J.,** Bauman, D.E., Gorewit, R.C., Sniffen, C.J. (1981). Effect of exogenous growth hormone on lactational performance in high yielding dairy cows. *J. Nutr.* **111**(9):1662-1671.

**Peel, C.J.,** Fronk, T.J., Bauman, D.E., Gorewit, R.C. (1983). Effect of exogenous growth hormone in early and late lactation on lactational performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **66**(4):776-782.

**Pinkerton, F.** (1991). Marketing and processing goat milk and its products. Langston Univ., E.(Kika) de la Garza Inst. Goat Res., Langston, OK, Fact Sheet No. D-01, 12 pp.

**Reyes-Ruiz, J.M.** (2000). Hormona del crecimiento caprino: construcción de un DNA que la codifica y su expresión en *Pichia pastoris*. Tesis de maestría. Facultad de Medicina. UANL.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**Ringuet, H.,** Petitclerc, D., Sorensen, M.T., Gaudreau, P., Pelletier, G., Morisset, J., Couture, Y., Brazeau, P. (1989). Effect of human somatotropin-releasing factor and photoperiods on carcass parameters and mammary gland development of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* **2**(11):2928-2935.

**Romanos, M.A.,** Scorer, C.A., Clare, J.J. (1992). Foreign gene expression in yeast: A review. *Yeast.* **8**:423-488.

**Romanos, MA,** Clare Beeseley, KM, Rayment, FB, Ballantine, SP, Makoff, AJ, Dougan, G, Fairweather, NF, Charles, IG. (1991). Recombinant Bordetella pertussis pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high level production and immunological properties. *Vaccine*, **9**:901-906.

**Rosner, A.,** Keshet, E., Gutstein, R., Aviv, H. (1982). Expression of a cloned bovine growth hormone gene in *Escherichia coli* minicells. *Can. J. Biochem.* **60**(5):521-524.

**Saad, I.,** Castañón, R., Solleiro, J.L., Orte, P., Morales, V. (2000). Hormonas del crecimiento: Clonación y evaluación de sus propiedades en la biotecnología médica, veterinaria, pecuaria y piscícola. Justificación Socioeconómica, Cambiotec, S.A. de C.V.

**Salazar-Olivo, L.A.,** Castro-Munozledo, F., Kuri-Harcuch, W. (1995). A preadipose 3T3 cell variant highly sensitive to adipogenic factors and to human growth hormone. *J. Cell Sci.* **108**(5):2101-2107.

**Sambrook, J.,** Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Segunda Edición. Cols. Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.

**Sánchez-Domínguez, C.N.** (1998). Construcción de cepas de *Pichia pastoris* productoras de hormona del crecimiento humana recombinante y evaluación de esquemas de purificación. Tesis de maestría. ULIEG, Facultad de Medicina, UANL., México.

**Schoner, B.E.,** Hsiung, H.M., Belagaje, R.M., Mayne, N.G., Schoner, R.G. (1984). Role of mRNA translational efficiency in bovine growth hormone expression in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **81**(17):5403-5407.

**Secchi, C.,** Berrini, A., Gaggioli, D., Borromeo, V. (2001). Amino acid modifications in canine, equine and porcine pituitary growth hormones, identified by peptide-mass mapping. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. **757**(2):237-245.

**Seeburg, P.H.,** Shine, J., Martial, J.A., Ivarie, R.D., Morris, J.A., Ullrich, A., Baxter, J.D., Goodman, H.M. (1978). Synthesis of growth hormone by bacteria. Nature. **276**(5690):795-798.

**Seeburg, P.H.,** Sias, S., Adelman, J., de Boer, H.A., Hayflick, J., Jhurani, P., Goeddel, D.V., Heyneker, H.L. (1983). Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormones. DNA. **2**(1):37-45.

**Shin, C.S.,** Hong, M.S., Kim, D.Y., Shin, H.C., Lee, J. (1998a). Growth-associated synthesis of recombinant human glucagon and human growth hormone in high-cell-density cultures of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **49(4):**364-370.

**Shin, N.K.,** Kim, D.Y., Shin, C.S., Hong, M.S., Lee, J., Shin, H.C. (1998b). High-level production of human growth hormone in *Escherichia coli* by a simple recombinant process. *J Biotechnol.* **62(2):**143-151.

**Siegel, R.S.,** Brierley, R.A. (1989). Methylotrophic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentation with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnol. Bioeng.* **34:**403-404.

**Smal, J.,** Closset, J., Hennen, G., De Meyts, P. (1987). Receptor binding properties and insulin-like effects of human growth hormone and its 20 kDa-variant in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **262(23):**11071-11079.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Stewart, F.,** Tuffnell, P.P. (1991). Cloning the cDNA for horse growth hormone and expression in *Escherichia coli*. *J. Mol. Endocr.* **6:**189-196.

**Sun, M.** (1989). Market sours on milk hormone. *Science.* **246(4932):**876-877.

**Tanaka, T.,** Shiu, R.P., Gout, P.W., Beer, C.T., Noble, R.L., Friesen, H.G. (1980). A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **51**(5):1058-1063.

**Tokunaga, T.,** Iwai, S., Gomi, H., Kodama, K., Ohtsuka, E., Ikehara, M., Chisaka, O., Matsubara, K. (1985). Expression of synthetic human growth hormone gene in yeast. *Yeast.* **39**:117-120.

**Towin, H.,** Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure on some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**:4350-4354.

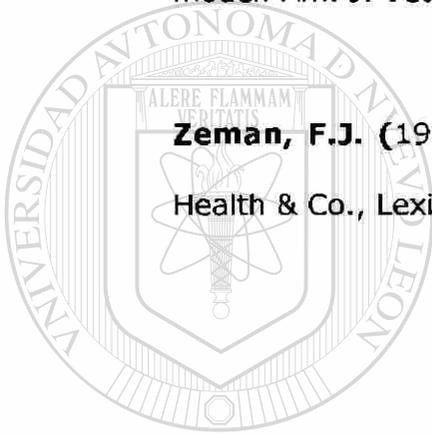
**Towns, R.,** Kostyo, J.L., Vogel, T., Sakal, E., Tchelet, A., Maher, R., Gertler, A. (1992). Evidence that the N-terminus of human growth hormone is involved in expression of its growth promoting, diabetogenic, and insulin-like activities. *Endocrinology.* **130**(3):1225-1230.

**Uchida, H.,** Naito, N., Asada, N., Wada, M., Ikeda, M., Kobayashi, H., Asanagi, M., Mori, K., Fujita, Y., Konda, K., Kusuvara, N., Kamioka, T., Nakashima, K., Honjo, M. (1997). Secretion of authentic 20-kDa human growth hormone (20K hGH) in *Escherichia coli* and properties of the purified product. *J. Biotechnol.* **55**(2):101-112.

**Vassileva, A.,** Chugh, D.A., Swaminathan, S., Khanna, N. (2001). Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **21**(1):71-80.

**Wilkins, B.E.,** Millis, D.L., Daniel, G.B., Munson, L., Patel, K.R., Buonomo, F.C. (1996). Metabolic and histologic effects of recombinant canine somatotropin on bone healing in dogs, using an unstable osteotomy gap model. *Am. J. Vet. Res.* **57**:1395-1401.

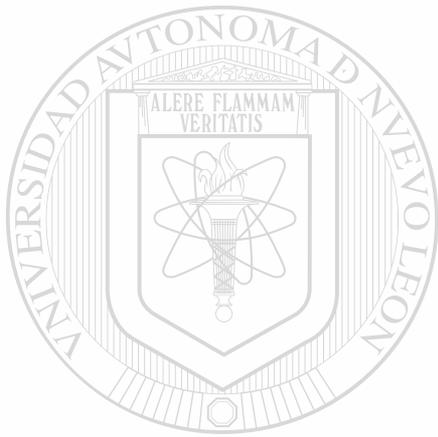
**Zeman, F.J.** (1982). *Clinical nutrition and dietetics*. Callamore Press, D.C. Health & Co., Lexington, Massachusetts.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



