

PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATO SULFATASA HUMANA SIN PÉPTIDO SEÑAL EN *Pichia pastoris*

JHONNATHAN ALEXANDER SÁNCHEZ LADINO

TRBAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar al título de

MICROBIOLOGO INDUSTRIAL

BACTERIOLOGO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

INSTITUTO DE ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO

BOGOTÁ D.C.

2013

PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATO SULFATASA HUMANA SIN PÉPTIDO SEÑAL EN *Pichia pastoris*

JHONNATHAN ALEXANDER SÁNCHEZ LADINO

Ingrid Schuler. PhD.

Decana Académica

Facultad de Ciencias

Janeth del Carmen Arias Palacios. M.Sc. M.Ed.

Directora Carreras de Microbiología

Facultad de Ciencias

Diana Patiño, Bacterióloga. M. Sc

Directora Carrera de Bacteriología

Facultad de Ciencias

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos
Por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no
Se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y
Porque las tesis no contengan ataques personales contra
Persona alguna, antes bien, se vean en ellas el anhelo
De buscar la verdad y la justicia”

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todo lo realizado hasta este momento.

A mis padres Raúl y Myriam por su apoyo incondicional, ya que por ellos soy quien soy y estoy logrando uno de los tantos sueños de la vida.

A mi hermana Milena porque siempre ha sido una guía en mi camino.

Al Instituto de Errores Innatos del Metabolismo por depositar la confianza de un trabajo realizado por años en mí.

A mis directores Javier y Alexander por todo los conocimientos enseñados, por la paciencia, compañía y por los tantos momentos de alegría en el IEIM.

A Angelita que además de ser una gran compañera, ha sido una gran profesora, por la paciencia y por todos los conocimientos brindados.

A mis compañeros del laboratorio Joko, Nata, Dennis, Natalia Garzón por la colaboración amabilidad y alegría compartida.

A Laura, Michelle, Laura Cáceres, Carolina por todos los buenos consejos y consejo del momento.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN	11
JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
REFERENTES CONCEPTUALES	12
OBJETIVOS	16
Objetivo general	16
Objetivo específico	16
METODOLOGÍA.....	17
<i>Pichia pastoris</i>	17
Vector de expresión Ppic9 GALNSNSP	17
Transformación de células de <i>P. pastoris</i> por medio de electroporación.....	17
PCR de confirmación.....	18
Evaluación de clones a escala de 10 mL	18
Evaluación de clones a escala de 100 mL	19
Evaluación de clon a escala de 1.65 L	19
Determinación de biomasa	20
Determinación de proteínas extracelulares	20
Determinación actividad específica GALNS	20
Determinación de proteína específica GALNS por medio de ELISA.....	20
Determinación de proteína extracelular	20
SDS PAGE Y Western blot	21
Purificación de la proteína recombinante	21

Protocolo pre-tratamiento	21
Métodos cromatográficos	21
Ensayos de efecto de la temperatura	22
Evaluación IN VITRO de la enzima recombinante	22
RESULTADOS	23
Plásmido Ppic9 GALNS	23
Evaluación de clones a escala de 10 mL	24
Evaluación de clones a escala de 100 mL	27
GALNS intracelular	29
Evaluación clon 1 a escala de birreactor 1.65L	30
Purificación de la enzima recombinante GALNS	32
Protocolo pre tratamiento	32
Métodos cromatográficos	32
Western Blot	37
Análisis de estabilidad de la proteína recombinante GALNS	38
Evaluación IN VITRO de la enzima recombinante	40
ANÁLISIS DE RESULTADOS	41
CONCLUSIONES	46
RECOMENDACIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48

INDICE FIGURAS

FIGURA 1: Plásmido PPIC9 GALNS NSP	23
FIGURA 2: PCR confirmación	24
FIGURA 3. Evaluación a 10 mL <i>P. pastoris</i> GS115 GALNS NSP	27
FIGURA 4: Evaluación a 100 mL <i>P. pastoris</i> GS115 GALNS NSP	29
FIGURA 5: Evaluación clon 1 a escala de birreactor 1.65L	30
FIGURA 6: SDS PAGE condiciones no reductoras	31
FIGURA 7: SDS PAGE condiciones reductoras	31
FIGURA 8: Proteína y actividad específica pre tratamiento	33
FIGURA 9: Cromatograma, cromatografía de intercambio catiónico	33
FIGURA 10: Concentración de proteína columna de intercambio catiónico	34
FIGURA 11: Actividad específica y volumétrica de la columna de intercambio catiónico	35
FIGURA 12: Concentración de proteína columna de exclusión molecular	36
FIGURA 13: Actividad específica y volumétrica de la columna de exclusión molecular	36
FIGURA 14: Western Blot condiciones no reductoras	37
FIGURA 15: Western Blot condiciones reductoras	38
FIGURA 16: Actividad relativa de la enzima recombinante GALNS en diferentes condiciones de pH	38
FIGURA 17: Actividad relativa de la enzima recombinante GALNS en diferentes condiciones de temperatura	39
FIGURA 18: Actividad específica para los lisados celulares de HEK 293 en contacto con la enzima purificada	40

FIGURA 19: Actividad específica para el medio de cultivo de las células HEK 293 en contacto con la enzima purificada	41
---	-----------

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: Clasificación de las mucopolisacaridosis	13
TABLA 2: Parámetros cinéticos clon 1 a escala de birreactor 1.65 L	32
TABLA 3: Purificación de la enzima recombinante GALNS producida en <i>P. pastoris</i>	37

1. RESUMEN

La mucopolisacaridosis IV A (enfermedad de Morquio A) es causada por la deficiencia de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS). Actualmente no se cuenta con un tratamiento específico para este desorden y una de las principales opciones de tratamiento es la terapia de reemplazo enzimático, empleando una enzima recombinante. En este estudio se realizó la producción y purificación de la enzima recombinante GALNS en *Pichia pastoris* GS115. El gen de GALNS, sin la secuencia codificante para el péptido señal (GALNS_{nsp}), fue insertado en el plásmido pPIC9 y usado para transformar *P. pastoris* GS115. Los clones obtenidos fueron evaluados a 10 mL y aquellos con mejor actividad fueron escalados a 100 mL y 1,65 L. La inducción de la expresión se realizó con 0,5% v/v de metanol y el seguimiento de la enzima se realizó por actividad enzimática específica, cuantificación de proteínas, ELISA y SDS-PAGE y Western-Blot. La máxima actividad enzimática a escala de 10 y 100 mL se obtuvo a las 48 horas con 0,13 U mg⁻¹, mientras que a 1,65 L la actividad máxima se observó alrededor de las 24 h de inducción con un valor de 0,16 U mg⁻¹. El análisis por SDS-PAGE en condiciones no reductoras mostró bandas aproximadamente de 120 KDa, peso molecular esperado para la proteína GALNS. La proteína fue purificada mediante filtración, ultrafiltración, liofilización, diálisis, cromatografías de intercambio iónico y de exclusión molecular, obteniendo un valor de 16,69 U mg⁻¹ al final de la purificación. El rendimiento y las veces de purificación fueron de 9,7% y 645,57, respectivamente. La enzima purificada fue estable a 4°C, con un pH de máxima actividad a 5,0. Finalmente; se evaluó la capacidad de ser capturada por las células empleando cultivos de células HEK293. Estos resultados muestran por primera vez la purificación y caracterización de una sulfatasa humana producida en *Pichia pastoris* GS115, mostrando el potencial de esta enzima para su futuro uso en terapia de reemplazo enzimático para la enfermedad de Morquio A.

2. INTRODUCCIÓN

La mucopolisacaridosis IV A (enfermedad de Morquio A) es producida por la deficiencia de la enzima N-acetil-galactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS). Es un desorden autosómico recesivo; presenta una incidencia estimada de 1 por cada 200.000 nacidos vivos (1). En la actualidad esta enfermedad no cuenta con un tratamiento específico, por esto, la terapia de remplazo enzimático, que consiste en administrar al paciente una enzima funcional, se presenta como la principal alternativa de tratamiento para estos pacientes.

En estudios previos realizados en el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM) de la Pontificia Universidad Javeriana se demostró la posibilidad de producir la enzima GALNS recombinante en dos microorganismos: *E. coli* y en *Pichia pastoris*. En cuanto a la producción de la enzima en *E.coli* BL21 se evaluó a escala de 100 mL y 3L, empleando diferentes estrategias de cultivo (lote y lote alimentado), mientras que en *P. pastoris* se evaluó la producción de la enzima a 10, 100 y 1650 mL.

En la actualidad se adelanta la evaluación clínica de una enzima GALNS recombinante producida en células de ovario de hámster chino. A pesar que los resultados muestran un efecto positivo de la terapia, una vez sea aprobada los pacientes requerirán administraciones semanales de la enzima recombinante con costos que pueden superar los US\$ 500.000 por paciente al año. Con miras a desarrollar nuevas alternativas de producción de esta enzima, el objetivo de este trabajo es la purificación y caracterización de la estabilidad y captura celular de la enzima humana recombinante GALNS producida en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*.

3. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Las mucopolisacaridosis son errores innatos del metabolismo producidos por la deficiencia de alguna de las enzimas encargadas del catabolismo de los glicosaminoglicanos (9). Las alternativas terapéuticas para este grupo de enfermedades incluyen trasplante de médula ósea, terapia de remplazo enzimático, terapia génica, terapia de reducción de sustrato y uso de chaperonas farmacológicas. En el caso de la enfermedad de Morquio A, producida por la deficiencia de la enzima GALNS, no existe una terapia específica, por lo que en la actualidad el tratamiento de la enfermedad es de tipo paliativo sin cambiar el progreso de la enfermedad (9).

Los ensayos preclínicos y clínicos de la terapia de remplazo enzimático para Morquio A han mostrado la posibilidad de tratar los pacientes con esta enfermedad utilizando una enzima recombinante producida en células eucariotas (30). Debido a los altos costos asociados a la producción de proteínas en células eucariotas y al riesgo de contaminación

con patógenos que puedan afectar la salud de los pacientes (12). Por lo cual es importante la búsqueda de nuevas alternativas para la producción de esta enzima.

Durante los últimos años en el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo de la Pontificia Universidad Javeriana se ha demostrado la posibilidad de producir la enzima GALNS de forma activa tanto en *E. coli* (2, 22, 28) como en *Pichia pastoris* (3). En *P. pastoris*, el trabajo desarrollado por Moreno J, en 2012 conservó, dentro de casete de expresión, la secuencia de ADN codificante para el péptido señal nativo de GALNS, adicional a la señal de secreción del alfa-factor presente en el plásmido de expresión. Debido a que la presencia de dos señales de secreción pueden afectar la producción de la enzima recombinante (4), y que el alfa factor es reconocido por la levadura como señal de direccionamiento extracelular, en este trabajo se realizó la expresión de la proteína GALNS sin hacer uso del péptido señal nativo (GALNS_{nsp}), empleando exclusivamente la secuencia del alfa-factor, con lo que se espera aumentar los niveles de producción de la enzima. Adicionalmente, se realizó la purificación y caracterización de la enzima GALNS_{nsp} como una alternativa para el futuro tratamiento de la enfermedad de Morquio A mediante terapia de reemplazo enzimático.

4. REFERENTES CONCEPTUALES (MARCO TEÓRICO):

Los errores innatos del metabolismo son enfermedades de base genética en las que se altera la degradación de carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos (1). Entre este gran grupo de enfermedades se encuentran las mucopolisacaridosis, las cuales son trastornos producidos por la alteración en la degradación de los glicoaminoglicanos (GAG) por parte de las enzimas presentes en los lisosomas. Los GAG se caracterizan por tener cadenas largas y no ramificadas de heteropolisacaridos, principalmente: N-sulfonilglucosamina, N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina. Los GAG más relevantes son ácido hialurónico el cual se encuentra ubicado en tejido conjuntivo, cordón umbilical, líquido sinovial, entre otros; mientras que el heparán sulfato está en tejidos óseos, pulmón y piel; condroitin sulfato presente en tejido óseo y cartilagosos y por último queratán sulfato en cornea, discos intervertebrales (9). Estos compuestos cumplen varias funciones entre las cuales se encuentran mantener unidas a las células individuales en los tejidos, debido a que son tejidos de protección, forma y soporte a células, tejidos y órganos. Además a esto cumplen un papel importante como reservorio de agua, también funcionan como “filtros” biológicos debido a que captura grandes estructuras impidiendo el acceso a otros tejidos, lubricante biológico entre otras. Hasta el momento se han descrito 11 mucopolisacaridosis, las cuales pueden ser clasificadas de acuerdo a la enzima que se encuentra deficiente (Tabla 1)

Mucopolisacaridosis	Enzima alterada	Nombre
MPS IH	α - L- iduronidasa	Enfermedad de Hunter
MPS IS	α - L- iduronidasa	Enfermedad de Scheie
MPS II	Iduronato sulfatasa	Enfermedad de Hunter grave
MPS IIIA	Heparán N-sulfatasa	Enfermedad de Sanfilippo A
MPS IIIC	Acetil CoA: α - glucosaminidotransferasa	Enfermedad de Sanfilippo C
MPS IIID	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa	Enfermedad de Sanfilippo D
MPS IV A	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa	Enfermedad de Morquio A
MPS IV B	B-galactosidasa	Enfermedad de Morquio B
MPS VI	N-acetilglucosamina-4-sulfatasa	Enfermedad de Marotaux-Lamy
MPS VII	B-D-glucoronidasa	Enfermedad de Sly
MPS IX	Hialorunidasa	Deficiencia de hialuronidasa

Tabla 1: Clasificación de mucopolisacaridosis (22)

La enfermedad de interés para este trabajo es la enfermedad de Morquio A, o mucopolisacaridosis IV A (MPS IV A), producida por la deficiencia de enzima lisosomal (GALNS) (6). La enfermedad fue descrita por primera vez en 1929 por el pediatra Uruguayo Luis Morquio y presenta un carácter autosómico recesivo (7).

El gen que codifica para la proteína está localizado en el brazo largo del cromosoma 16 en la posición 24.3, el cual codifica para una proteína de 522 aminoácidos incluyendo los 25 aminoácidos del péptido señal (8). Es una enzima homodimérica de 120KDa con monómeros de 60 kDa que se procesan en polipeptidos de 40 y 15 KDa (8).

GALNS participa en la degradación de los GAG condroitin-6-sulfato y del queratán sulfato mediante la eliminación de los grupos sulfato presentes en el extremo de la porción N-acetilgalactosamina y glucosamina respectivamente; permitiendo así que las otras enzimas presentes en el lisosoma puedan seguir con la degradación de los azúcares que componen estos GAGs. La acumulación de estos compuestos se relacionan con las características clínicas que presentan los pacientes que principalmente incluyen displasia esquelética; opacidad cornea y aumento de la excreción urinaria de queratán sulfato (9). Los individuos afectados parecen sanos al nacer y los primeros signos y síntomas aparecen generalmente en los tres primeros años. Como aspectos relevantes los pacientes MPS IVA muestran tronco corto (enanismo), hipoplasia del odontoides, escoliosis, hiperlaxitud de y marcha anormal, compromiso pulmonar, enfermedades cardíacas, pérdida de la audición y hepatomegalia leve. (13)

La epidemiología de esta enfermedad no está bien descrita, debido a que no se encuentran estudios que muestra la frecuencia del síndrome de Morquio A. Sin embargo, en un estudio británico se evidenció que se presenta 1 caso por cada 200.000 nacidos vivos (10). Para el caso de Colombia no se cuentan con cifras sobre la incidencia de la enfermedad, pero algunos estudios sugieren que es una de las mucopolisacaridososis con mayor número de individuos (11).

El diagnóstico de la enfermedad se lleva a cabo por un examen físico por parte del clínico en donde evalúa la curvatura anormal de la columna, la opacidad de la cornea, alteraciones cardíacas, hepatoesplenomegalias, pérdidas de la función nerviosa y la baja talla. A partir de estas evidencias clínicas se remite una serie de paraclínicos que se basan en la determinación de la actividad enzimática en leucocitos, fibroblastos o vellosidades coriónicas; el análisis de glicosaminoglicanos en orina y ecocardiogramas y radiografías (12).

Actualmente esta enfermedad no cuenta con un tratamiento específico y el manejo de los pacientes se realiza de forma paliativa principalmente mediante fisioterapias, administración de antiinflamatorios no esteroideos para controlar el dolor articular, y antibióticos para evitar infecciones pulmonares (4). El trasplante de médula ósea ha sido evaluado como una alternativa para el tratamiento de la enfermedad, pero no ha mostrado efectos importantes sobre las alteraciones óseas, cardíacas y oculares, adicional al riesgo de morbi-mortalidad asociado a este procedimiento (13). Al igual que otras mucopolisacaridososis la terapia génica representa una alternativa para el manejo de la enfermedad, la cual ha mostrado importantes resultados en etapas preclínicas (14). Por su parte, la terapia de remplazo enzimático, que consiste en administrar una enzima activa que supla la función de la enzima alterada, se encuentra en fase clínica III (15), mostrando la posibilidad de tratar algunos síntomas importantes de la enfermedad mediante la administración de una enzima recombinante producida en células de mamífero.

Sin embargo, una vez sea aprobada, esta terapia puede alcanzar costos cercanos o superiores a los US\$500.000 por paciente al año (15), principalmente debido a los costos asociados con la producción de enzimas recombinantes en células CHO (16). Por tanto, es necesario evaluar nuevos sistemas de expresión para esta proteína, que permitan reducir los costos de producción de la enzima.

Una vez la proteína es administrada de por vía intravenosa, esta es capturada por las células mediante el uso de receptores de manosa-6-fosfato que interactúan con las manosas fosforiladas presentes en las glicosilaciones adicionadas postraduccionalmente a la enzima (17). Estudios realizados empleando la enzima producida en *E. coli* mostraron que en ausencia de dichas glicosilaciones la enzima no puede ser capturada por las células en cultivo (18), mostrando las limitaciones de este sistema de expresión y evidenciando la necesidad de estudiar sistemas microbianos que realicen dichas modificaciones similares a las realizadas por células de mamíferos.

Entre los diferentes sistemas de expresión de proteínas recombinantes, *Pichia pastoris* presenta las siguientes ventajas: elevado rendimiento de expresión, producción de modificaciones postraduccionales similares a las encontradas en células humanas, posibilidad de secretar las proteínas recombinantes, fácil manipulación molecular, y posibilidad de utilizar medios de cultivo sencillos (18). En cuanto a las desventajas que tiene este sistema se encuentra la eficiencia de transformación es entre moderada y baja y las glicosilaciones presentan un patrón diferente al de proteínas humanas (12).

Para la expresión de las proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* se utilizan dos promotores denominados AOX1 y AOX2, estos se activan con la presencia de metanol. Dependiendo dónde se inserte el gen es posible obtener tres fenotipos diferentes: crecimiento rápido en metanol (MUT⁺), crecimiento lento en metanol (MUT^s) y las que no son capaces de utilizar el metanol como fuente de carbono (MUT⁻) (12, 19).

El metanol es degradado dentro del peroxisoma por medio de la alcohol oxidasa este sustrato es degradado a formaldehído y peróxido de hidrógeno, estos componentes pueden ser tóxicos para la célula. Sin embargo, *Pichia pastoris* dentro de su maquinaria enzimática tiene enzimas como la catalasa que permite la degradación de estos compuestos que son tóxicos. (20)

En la producción de enzimas recombinantes en el IEIM se ha demostrado desarrollos importantes en la producción de este tipo de moléculas; los estudios se han realizado en *Pichia pastoris* (14) y *E. coli* (15) y muestran la posibilidad de producir enzimas activas en estos sistemas de expresión. Estos autores han reportado la producción de GALNS con péptido señal en *E. coli* (16) y en *Pichia pastoris*.

5. OBJETIVO

5.1. Objetivo General

Producir, purificar y caracterizar la proteína recombinante N-acetil-galactosamina-6-sulfato sulfatasa producida por el clon *Pichia pastoris* GS115/GALNSnsp

5.2. Objetivos específicos

- Obtener clones de *Pichia pastoris* GS115 portando el gen humano de GALNS sin el péptido señal nativo de la enzima (GALNSnsp)
- Caracterizar la producción de la enzima a escalas de 10 y 100 mL y de bioreactor (1,65 L)
- Caracterizar la estabilidad y captura celular de la enzima recombinante GALNS purificada.

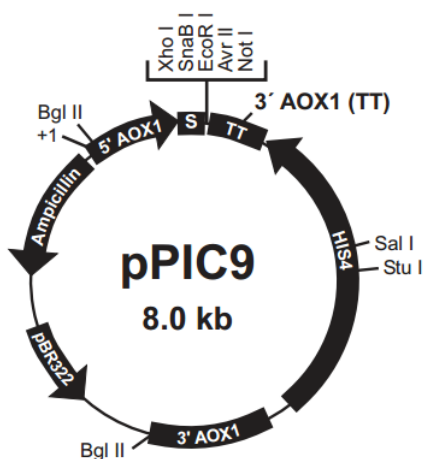
6. METODLOGÍA

6.1. *Pichia pastoris*

El sistema de expresión de proteínas heterologas se realizó mediante el uso de la cepa *Pichia pastoris* GS115 (Life Technologies Corporation).

6.2. Vector de expresión pPIC9-GALNSnsp

El vector de expresión Ppic9 GALNS nsp; previamente construido en el IEIM, porta el ADNc de GALNS sin péptido señal (GALNSnsp) insertado en el sitio múltiple de clonación del vector pPIC9 (Life Technologies Coporation). Este vector posee en el promotor AOX1, una secuencia de ADN que codifica para la señal de secreción de la proteína (alfa-factor), el gen *HIS4*, y el gen de resistencia a ampicilina (21).



6.3. Transformación de células *P. pastoris* por medio de electroporación

El vector pPic9-GALNSnsp fue extraído de *E. coli* DH5 α transformada con el vector, mediante protocolo de maxiprep (20). El plásmido purificado fue linealizado con la enzima *Pme I* por 16 horas a 37°C. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, se extrajo la banda de interés y se purificó mediante el estuche Silica Bead DNA Gel Extraction Kit de Fermentas®. El ADN extraído se cuantificó mediante NanoDrop (Thermo Scientific).

El proceso de transformación se realizó por electroporación siguiendo las instrucciones del fabricante (Life Technologies Corporation). 20 μ L de células competentes fueron transformadas con 20 μ g de ADN bajo las siguientes condiciones: 1200 Voltios y 200 Ω . El producto de transformación se sembró en cajas que contenían medio mínimo con dextrosa y se incubó a 30°C hasta la aparición de colonias.

6.4. PCR de confirmación

La confirmación de la transformación de cada uno de los clones se realizó mediante PCR. Para esto, se extrajo el DNA genómico de cada uno de los clones, a partir de la biomasa de un cultivo de 100 mL en medio YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa). Inoculado con un vial incubando 24h a 280rpm y 30°C. Después, se centrifugó el cultivo a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante. La extracción de ADN genómico se realizó con 500 mg de biomasa la cual fue macerada en nitrógeno líquido; y lisada con 500 µL de buffer de lisis (100mM Tris HCL, 100nM NaCl, 10mM EDTA). Posteriormente, se adicionaron 500µL de fenol-cloroformo-isoamilalcohol (proporción 24:1:1), mezclando por inversión e incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla fue separada por centrifugación a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C; recuperando la fase acuosa. El ADN genómico se precipitó mediante la adición de un volumen de isopropanol y 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M. El ADN se recuperó mediante centrifugación 12000 rpm por 30 minutos a 4°C y el pellet de ADN fue lavado con 1 mL de etanol al 70% y posteriormente se resuspendió en 100 µL de buffer TE. El ADN fue analizado en gel de agarosa y se cuantificó por espectrofotometría utilizando NanoDrop (Thermo Scientific).

La PCR se realizó empleando cebadores TOMF23 5'-ACAGGGCCATTGATGGCCTCAACCTCCT-3' y TOMF34R 5'-GCTTCGTGTGGTCTTCCAGATTGTGAGTTG-3', los cuales amplifican un fragmento de 250pb del gen GALNS. La reacción se realizó de la siguiente manera dNTPs 10mM (1µL), GALNS forward primer (1µL), GALNS reverse primer (1µL), Mg²⁺ (1µL), Buffer de reacción PCR 10X (5µL), Taq polimerasa (0.5µL), DNA (1 µg) y agua MilliQ (csp. 50 µL). Se realizó una PCR con 30 ciclos de denaturación a 94°C/1 min, anillamiento a 60°C/1 min y elongación a 72°C/30 s. El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% p/v.

6.5. Evaluación de clones a escala de 10 mL.

Los clones obtenidos se evaluaron inicialmente a escala de 10 ml. Para esto, se tomó un vial de cada clon y se inoculó en 10 ml de medio líquido YPD, incubando por 24 h a 30°C y 290 rpm. Posteriormente, se tomó 1 ml del cultivo y se transfirió a 9 ml de medio líquido BMG, incubando a 30°C y 290 rpm. Pasadas 24h se centrifugó el cultivo a 3500 rpm a 4°C y la biomasa se resuspendió en 10 ml de medio líquido BMM con un porcentaje de metanol de 0,5% v/v (21). El cultivo se incubó a 30°C y 290 rpm durante 120 h, tomando alícuotas de 200 µl cada 24h y adicionando 50µl de metanol filtrado para obtener una concentración final de metanol de 0,5% v/v. Los clones fueron evaluados mediante medición de biomasa, concentración de proteína y actividad específica GALNS (22). Los cultivos se realizaron por triplicado y como control negativo se utilizó una cepa de *Pichia pastoris* sin transformar.

6.6. Evaluación de clones a escala de 100 mL

Los clones que mostraron los mejores valores de actividad a escala de 10 mL fueron evaluados a escala de 100 mL. Para este procedimiento se tomó un vial y se inocularon a 10 mL de medio líquido YPD, incubando por 24 h a 30°C y 290 rpm. Luego, el cultivo se transfirió a 90 mL de medio líquido BMG, incubando por 24 h a 30°C y 290 rpm. Posteriormente, se centrifugó a 3500 rpm a 4°C y la biomasa resultante se resuspendió en 100 mL de medio líquido BMM, con una concentración de metanol de 0,5% v/v. El cultivo se incubó a 30°C y 290 rpm durante 120 h, y cada 24 h se tomaron alícuotas de 200 µL y se adicionaron 500 µL de metanol para mantener una concentración de metanol de 0,5% v/v. Los clones fueron evaluados mediante medición de biomasa, concentración de proteína y actividad específica GALNS. Los cultivos se realizaron por triplicado y como control negativo se utilizó una cepa de *Pichia pastoris* sin transformar.

6.7. Evaluación de clon a escala de 1,65 L.

El clon que mostró los mayores valores de actividad a escala de 100 mL fue evaluado a escala de 1,65 L en un bioreactor Bioengineering® a KFL2000 de 3,7 L. Para esto se descongeló dos viales del clon y se inocularon en 20 mL de medio YPD incubando a 30°C a 280 rpm por 48 h. Este cultivo, se adicionó a 180 mL de medio MGli, (21), incubando por 24 h, al cabo de las cuales se adicionó a 1450 mL de medio salino básico (glicerol 66g, sulfato de calcio deshidratado 0,99g, fosfato de potasio deshidratado 42,47g, sulfato de amonio 4,95 g, sulfato de potasio 14,15 g, y sulfato de magnesio deshidratado 11, 58g) para obtener un volumen de trabajo de 1650 mL. Por último, se adicionó 1 mL de trazas de minerales, 1mL de antiespumante y 1,5 mL de biotina (0,02%). Durante el cultivo el pH se reguló a 5,0 usando hidróxido de amonio al 7%, el oxígeno disuelto cercano al 10% durante la etapa de inducción.

El cultivo en biorreactor se presenta en 3 etapas: -la primera consistió en cultivo en lote hasta alcanzar una biomasa de 40 g/L; la segunda consistió en un lote alimentado con glicerol al 50% por 1 hora. Cuando la biomasa alcanzó 60 g/L se inició la tercera etapa con un cultivo en lote alimentado con metanol manteniendo una concentración de 0,5% v/V en el bioreactor. Esta última etapa, que constituye la fase de inducción, se mantuvo hasta durante las 96 h de cultivo.

En todos los casos se realizaron mediciones de biomasa, proteína total y actividad específica de GALNS y se evaluó la cinética de crecimiento; mediante el cálculo de velocidad específica de crecimiento(μ) (h^{-1}), tiempo de duplicación t_d (h), y rendimientos $P(x)$.

6.8. Determinación de biomasa.

La determinación de biomasa se realizó mediante espectrofotometría por medición de la absorbancia a 610nm, y empleando la siguiente ecuación

$$X = \frac{(0,619 \times 610 \text{ Do nm})}{0,528} * \text{Factor de dilución}$$

A partir de estos datos se calcularon los parámetros de velocidad específica de crecimiento $\mu(x)$ (h^{-1}) y el tiempo de duplicación t_d (h)

6.9. Determinación de concentración de proteínas.

La concentración de proteínas totales de cada una de las muestras tomadas se realizó mediante el método de Lowry (23). Empleando una curva patrón de albúmina sérica humana entre 0,2 hasta 3,3 mg mL⁻¹.

6.10. Determinación de actividad específica GALNS.

La actividad enzimática se evaluó empleando el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil β -D-Galactopiranosido-6-sulfato bajo la metodología descrita por van Diggelen et al (15). Una unidad de actividad enzimática se definió como los nmoles de 4-metilumbeliferona liberados por hora; calculada con la siguiente:

$$= \text{nmol 4MU} // \text{tiempo incubación (h)} * \text{Factor de dilución}$$

En donde nmol 4MU liberados por la acción de de la β Galactosidasa después de que la enzima GALNS ha removido los grupos sulfato del carbono 6 del piranosido La actividad específica GALNS fue expresada como U mg⁻¹ de proteína.

6.11. Determinación de proteína específica GALNS por medio de ELISA.

Para la cuantificación de la proteína recombinante -GALNS se realizó una ELISA indirecta previamente descrita (22). La cual utiliza un anticuerpo Ig G policlonal desarrollado en conejos inmunizados. -Para la curva de calibración se utilizó una proteína recombinante GALNS₇ producida en células CHO, la cual fue donada por la Dra. Adriana Montañó de la Universidad de Saint Louis (USA).

6.12. Determinación de proteínas intracelulares

Con el objetivo de establecer si parte de la proteína era retenida intracelularmente. Se realizó la medición de la actividad específica GALNS en el lisado celular. Para este fin se tomó el clon con los mejores valores de actividad específica GALNS extracelulares se realizó el procedimiento anteriormente descrito a escala de 100 mL, tomando alícuotas cada 24h por una fermentación de 120h. La lisis celular se realizó de cada una de las alícuotas por acción mecánica empleando perlas de vidrio y 15 ciclos de 1 min de vortex

y 1min en hielo. Luego de este procedimiento las células se sonicaron mediante 8 ciclos de 15 s y 45 de descanso, con una amplitud 20% y un tiempo efectivo de 4 min. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación a 14000 rpm por 10 min a 4°C, y la actividad enzimática GALNS y la concentración de proteína se determinaron como se describió previamente

6.13. SDS- PAGE y Western blot.

Las muestras fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras. Los geles fueron teñidos con plata (24). Para el análisis por Western-blot las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente se colocó sobre esta el anticuerpo policlonal IgG anti-GALNS previamente descrito para la ELISA y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se incubó con el anticuerpo secundario (anti-rabbit) durante 1 h, y finalmente se reveló con diaminobenzidina.

6.14. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE

6.14.1. Protocolo pre tratamiento

El medio de cultivo se centrifugó a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C, para obtener extracto crudo libre de células. Este extracto se colocó a pH 5,5 y se filtró por papel filtro Whatman No 1 y membranas de 0,45 µm y 0,22 µm (PALL Life Science, respectivamente. Posteriormente, 500 mL y se ultrafiltraron a través de una membrana de 30 KDa (Milipore) hasta llegar a un volumen de 15 mL en el retentato, el cual fue concentrado por liofilización. Por último, el Liofilizado fue reconstituido en 10 mL de buffer acetato de potasio 25 mM pH 5.5.

6.14.2. Métodos cromatográficos

El proceso cromatográfico se realizó empleando el sistema de baja presión BioLogic LP (Bio-Rad). Para esto se emplearon las columnas S High Support (Biorad) y Sephacryl TM S-200 High Resolution (Amersham Biosciences). El tamaño de las columnas fueron de 3mL y 20mL respectivamente.

Con el liofilizado obtenido se realizó una diálisis con buffer acetato de potasio 25 mM a pH 4,5. 3 mL de muestra fueron inyectados en la columna de intercambio catiónico High S Support (Biorad), (tamaño de columna 3 mL), previamente equilibrada con el mismo buffer de diálisis. La proteína no unida fue recolectada en una sola fracción, mientras que la proteína retenida fue eluída con un gradiente lineal de acetato de potasio 25mM pH 4,5 con NaCl 0,5M. La proteína unida fue recolectada en fracciones de 1 mL. La proteína fue monitoreada a 280 nm, y la purificación se llevó a cabo a 4 °C con un flujo de 5 mL/min.

Las muestras con mayor actividad GALNS fueron mezcladas y concentradas mediante liofilización y posteriormente se resuspendió en 1 mL de buffer acetato de potasio 25 mM pH 5,5 para su posterior purificación mediante cromatografía de exclusión molecular empleando la columna Sephacryl™ S-200 High Resolution (Amersham Biosciences, tamaño de columna 20 mL), equilibrada con el mismo buffer acetato. Se inyectó la muestra en el sistema y se recolectaron fracciones de 1 mL. La proteína fue monitoreada a 280 nm, y la purificación se llevó a cabo a 4 °C y un flujo de 0,2 mL/ min.

Todas las muestras fueron analizadas por la concentración de proteína mediante el método de acidobicinconílico (25) y actividad GALNS, por el método descrito anteriormente.

6.15. Efecto de Temperatura y pH en la enzima recombinante.

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la enzima purificada, 20 µL de la proteína fueron incubados a 4°C (Nevera); 37°C (Baño serológico) y 45°C (Termociclador), durante 1, 2, 4, 6, 12, 24 y 48 horas. Pasado el tiempo de incubación se realizó determinación de la actividad enzimática. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

Para evaluar el efecto del pH sobre la enzima purificada; 10 µL de la enzima fueron incubados con 10 µL de buffer citrato de sodio 50 mM pH 3; buffer acetato de sodio 50 mM pH 4, 5, solución pH 6 y buffer Tris- HCL 50 mM pH 7 y 8. Las muestras fueron incubadas por 1 hora a 37°C. Terminado este proceso se realizó determinación de actividad enzimática. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

6.16. Evaluación *in-vitro* de captura celular.

La capacidad de la enzima GALNS recombinante de poder ser capturada por células en cultivo fue evaluada empleando células HEK293. Las células fueron cultivadas en medio DMEM con suero fetal bovino al 15% v/v, L-glutamina 2 mM, 100 ng/mL de estreptomycin/ penicilina; a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5% v/v.

El día previo a la realización el experimento, se sembraron 50.000 células por pozo en placas de 12 pozos con 1 mL de medio fresco. Al día siguiente, el medio fue reemplazado por medio fresco 2 horas antes de adicionar la enzima recombinante. Pasadas las 2 horas se adicionó la proteína recombinante purificada en cada uno de los pozos para lograr una concentración de 10, 50 y 100 nM. Al cabo de 6 horas de incubación se recolectó el medio de cultivo y las células fueron lavadas 4 veces con PBS 1X. Las células fueron lisadas con 100 µL de desoxicolato de sodio 1%. La actividad enzimática en el medio de cultivo y el lisado celular fue determinada como se describió previamente. La determinación de proteína en el lisado celular se realizó por el método de Lowry (23).

7. RESULTADOS

7.1. Plásmido Ppic9 GALNS nsp

La linealización del plásmido pPIC9-GALNSnsp se realizó por medio de la enzima de restricción *Pme I*, para poder hacer la inserción en el genoma de *Pichia pastoris* por medio de recombinación homóloga. Esta enzima hace el corte en la porción 5' del promotor AOX 1 (Figura 1A). Adicionalmente, se corroboró la integridad del plásmido mediante digestión con la enzima *Stu I*, con la que se generan dos bandas, una a la altura de 7052 pb y otra de 2178 pb.

-Luego de haber realizado la transformación de las células de *P. pastoris*, se obtuvieron tres clones, los cuales fueron evaluados para confirmar la presencia del gen GALNSnsp, mediante PCR. La Figura 2 muestra los resultados de la electroforesis de los productos de PCR, en donde se observa una banda de 250pb para los tres clones, confirmado la inserción del vector pPIC9-GALNSnsp.

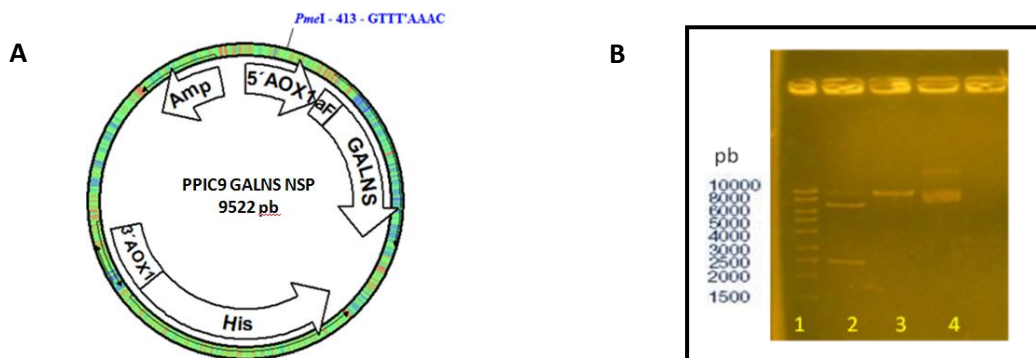


Figura 1: Plásmido Ppic9- GALNS NSP (A) Representación del plásmido indicando el corte de la enzima *Pme I* **(B)** Electroforesis en gel de Agarosa con el ADN obtenido de la extracción en *E.coli*. (1) Peso molecular, (2), *Stu I* (3) *Pme I*, (4) Plásmido sin digerir.



Figura 2: PCR de confirmación del gen GALNSnp. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para un fragmento del gen GALNS humano. (PM) Marcador de peso molecular (1) clon 1, (2) blanco, (3) clon 2, (4) clon3.

7.2. Evaluación de clones obtenidos a escala de 10mL.

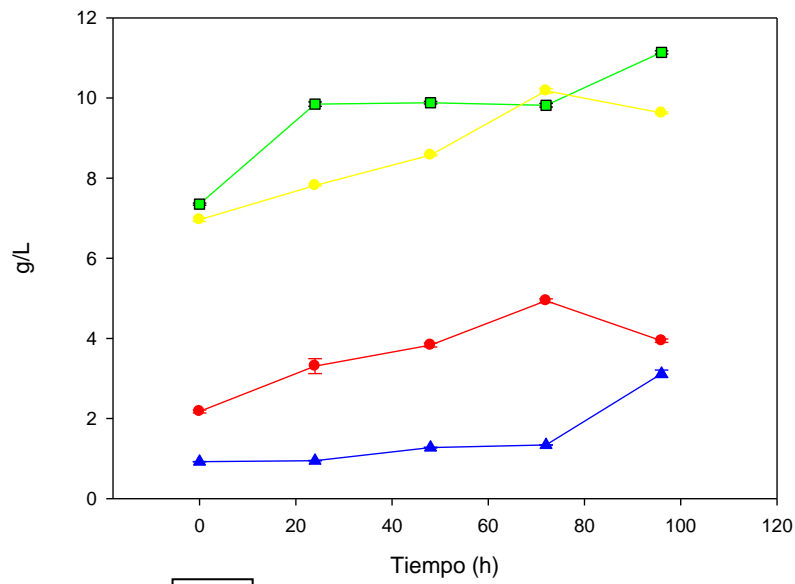
Los clones obtenidos luego de la transformación fueron evaluados a escala de 10 mL. La Figura 3A muestra los resultados del crecimiento celular de los 3 clones evaluados y el control (*P. pastoris* sin transformar). Durante las 96 horas de inducción, la cinética de crecimiento tuvo un comportamiento similar en los tres clones y el control, con un crecimiento promedio para los cuatro microorganismos de 6,58 g/L de biomasa.

La Figura 3B muestra la proteína extracelular en los extractos crudos libres de células de cada uno de los clones y control negativo a 10 mL. En la figura se observa que el clon 2 y 3 tienen un comportamiento similar y que la proteína se mantiene estable a lo largo del experimento, mientras que el clon 1 muestra un comportamiento diferente ya que presenta un valor de proteína similar a la observada en el control. El clon que obtuvo la mayor concentración de proteína fue el 2 con un valor de 0,78 mg/mL a las 24 h de cultivo.

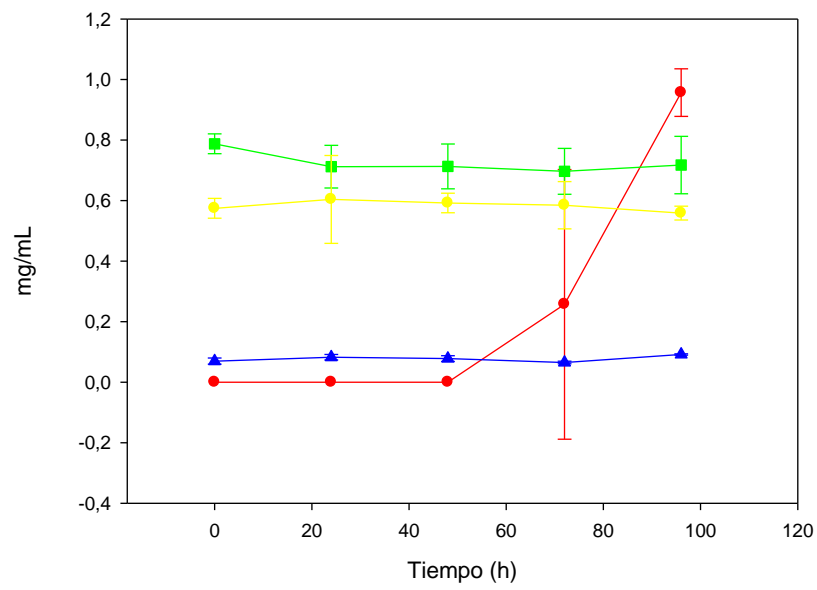
Por último, en la Figura 3C se muestran los valores de actividad específica de cada uno de los clones y del control. Se puede observar que los clones 2 y 3 tienen valores bajos de actividad muy similares a los del control mientras que el clon 1 muestra valores elevados de actividad desde el paso a medio BMG, debido a que la concentración de la actividad específica se ve aumentada desde la hora 0 de inducción. El valor más alto de

actividad específica GALNS lo tiene el clon 1 con un valor de $0,39 \text{ U mg}^{-1}$ a las 24 h de inducción. Debido al comportamiento observado a escala de 10 mL se decidió escalar al clon 1 y 2 a un volumen de 100 mL.

(A) Biomasa a escala de 10 mL



(B) Proteína en cultivos de 10 mL



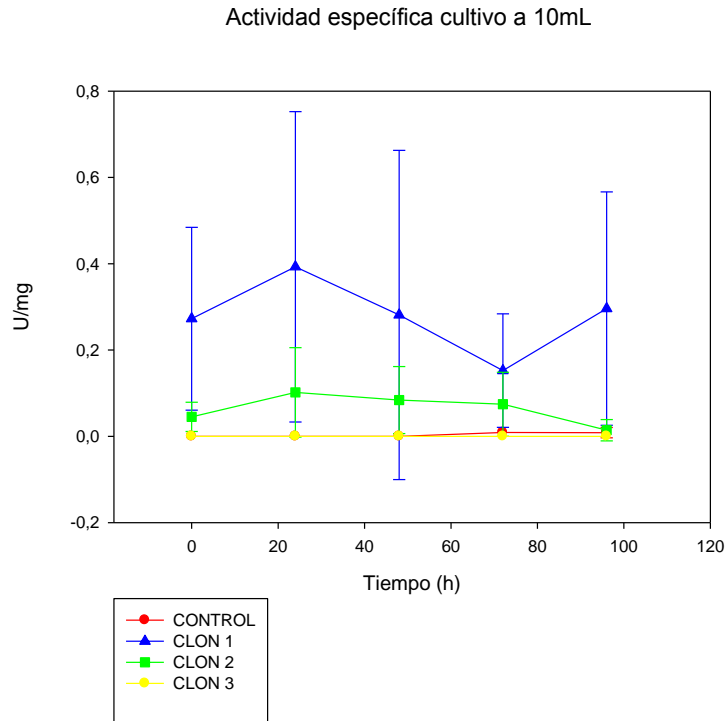


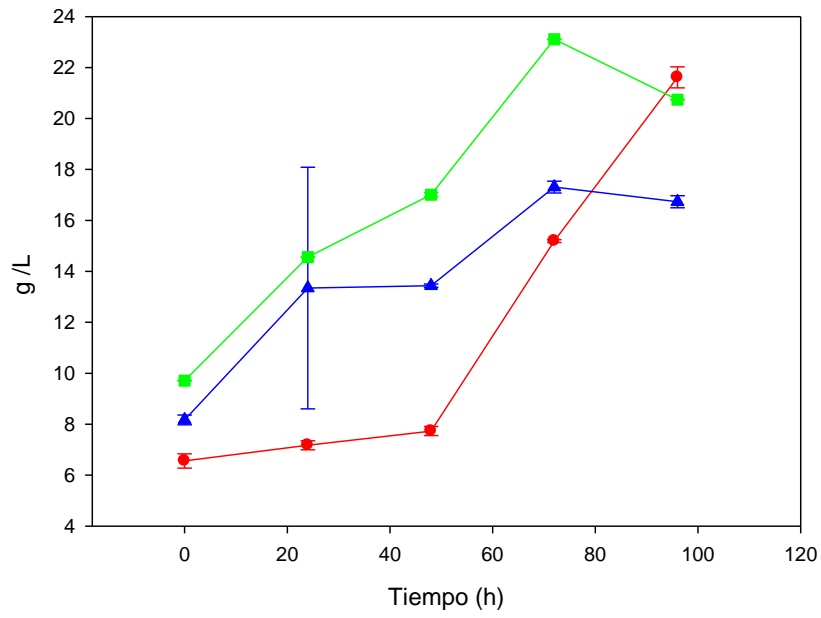
Figura 3: Evaluación a 10 mL *P. pastoris* GS115 GALNS. (A) Biomasa a escala de 10 mL de control y clones 1,2 y 3. (B) Proteína a escala de 10 mL de control y clones 1,2 y 3. (C) Actividad específicas a escala de 10 mL de control y clones 1,2 y 3.

7.3. Evaluación de clones a 100 mL

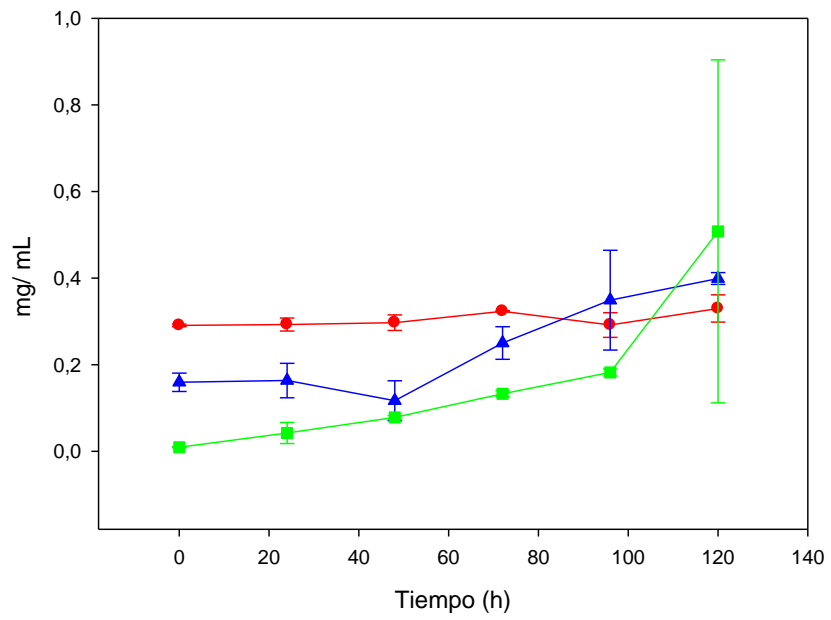
Los clones 1, 2 y el control fueron evaluados a escala de 100 mL. En la figura 4A se puede observar un patrón de crecimiento similar en todos los ensayos destacando que el control tuvo un crecimiento más alto con un valor de 21,6 g/L, clon 1 de 16,7 g/L y clon 2 de 20,74 g/L.

En la figura 4B se observa que los tres microorganismos evaluados presentaron un perfil de concentración de proteínas extracelulares similares con un valor máximo entre 0,069 y 0,78mg/mL. Finalmente, la Figura 4C muestra los valores de actividad específica GALNS así como los resultados de la cuantificación de la enzima por ELISA para los dos clones evaluados y el control negativo. Se observa que el clon 1 es el que presenta mayores valores de actividad con $0,10 \text{ U mg}^{-1}$, pero muestra menores valores de concentración de GALNS (2225,05 ng GALNS/mg proteína) recombinante que los observados para el clon 2 (6649,16 ng GALNS/mg proteína). Debido a estos resultados se decidió escalar a bioreactor al clon 1.

(A) Biomasa cultivos de 100 mL



(B) Proteína cultivos de 100 mL



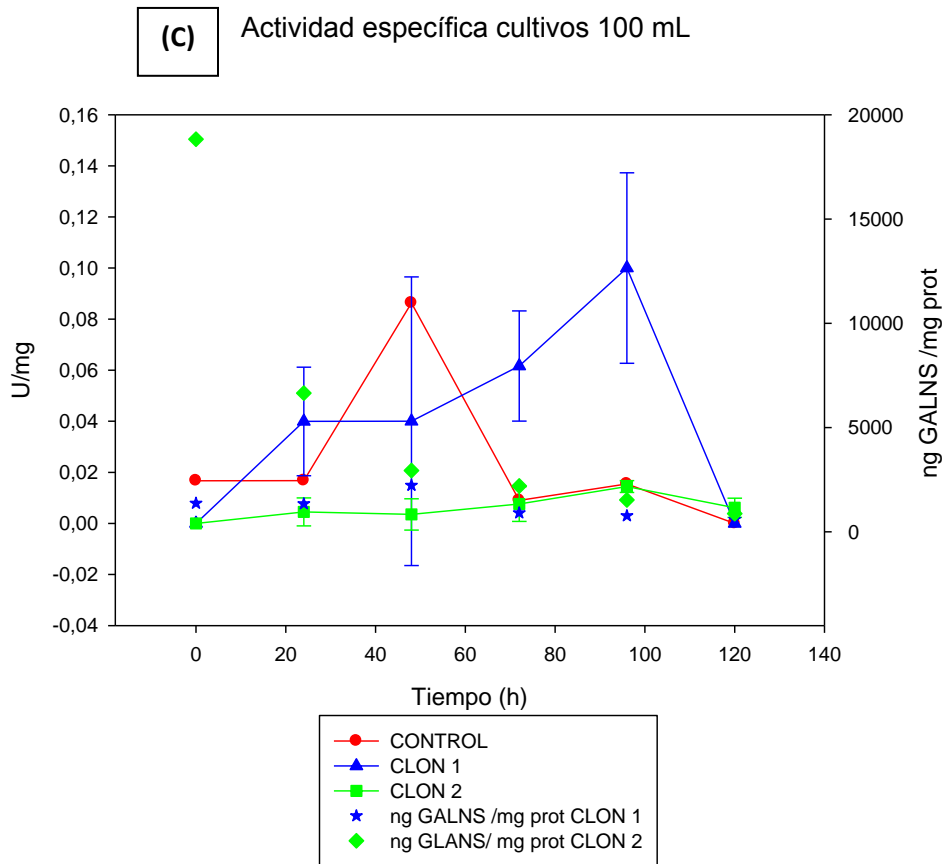


Figura 4: Producción de GALNS a escala de 100 mL con los clones 1 y 2 de *P. pastoris* GS115 GALNSnsp (A) Biomasa a escala de 10 mL de control y clones 1,2 y 3. (B) Proteína a escala de 10 mL de control y clones 1,2 y 3. (C) Actividad específicas a escala de 10 mL de control y clones 1,2 y 3.

7.4. GALNS intracelular.

Con el objetivo de evaluar si parte de la proteína GALNS recombinante permanecía intracelularmente, se evaluó la actividad enzimática en los lisados celulares de los clones 1 y 2 a escala de 100 mL. Para los dos clones no se observó actividad GALNS en los lisados celulares, sugiriendo que la proteína recombinante es procesada y secretada de forma adecuada.

7.5. Evaluación Clon 1 en escala de bioreactor.

La figura 5 muestra los resultados obtenidos en la fase de inducción de biomasa, concentración de proteína, %OD, concentración de metanol, actividad específica GALNS y cuantificación de GALNS por ELISA. La biomasa se incrementó durante la fermentación hasta alcanzar un valor máximo de 269,34 g/L a las 76 h de cultivo. La actividad específica de GALNS máxima fue de 0,16 U/mg alcanzada a las 20 h de cultivo, mientras que la máxima producción de la enzima recombinante, medida por ELISA fue de 2097, 08 ng GALNS/mg alcanzada a las 31 h de cultivo.

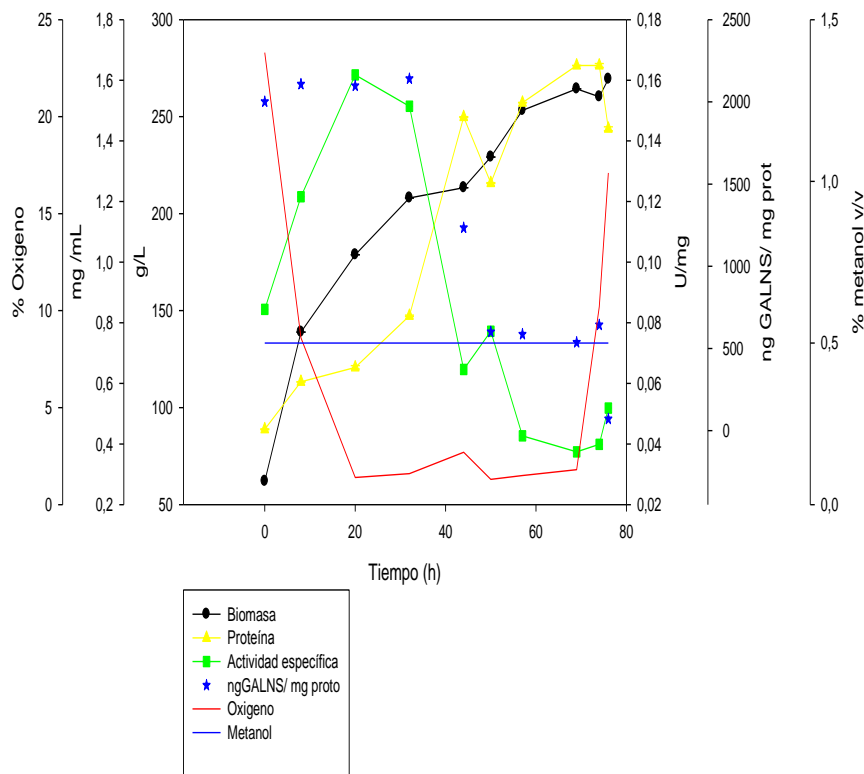


Figura 5: Producción de GALNS recombinante a escala de 1,6 L

Adicionalmente, la producción de la proteína en el cultivo se analizó por SDS-PAGE. La Figura 6 muestra los resultados bajo condiciones no reductoras, en donde se observa una banda de 120 kDa, correspondiente a la masa molecular para el homodímero de GALNS, mientras que en condiciones reductoras se observa una banda de aproximadamente 50 kDa (Figura 7), la cual puede corresponder a una de los péptidos presentes en la enzima GALNS madura.



Figura 6: SDS PAGE condiciones no reductoras; Las muestras fueron tomadas luego de 1) 0 h de inducción, 2) 8 h, 3) 20 h, 4) 32 h, 5). 44 h, 6). 50 h, 7). 57 h, 8). 69 h, 9). 74 h, 9) 76 h y 10) **80 h** de inducción

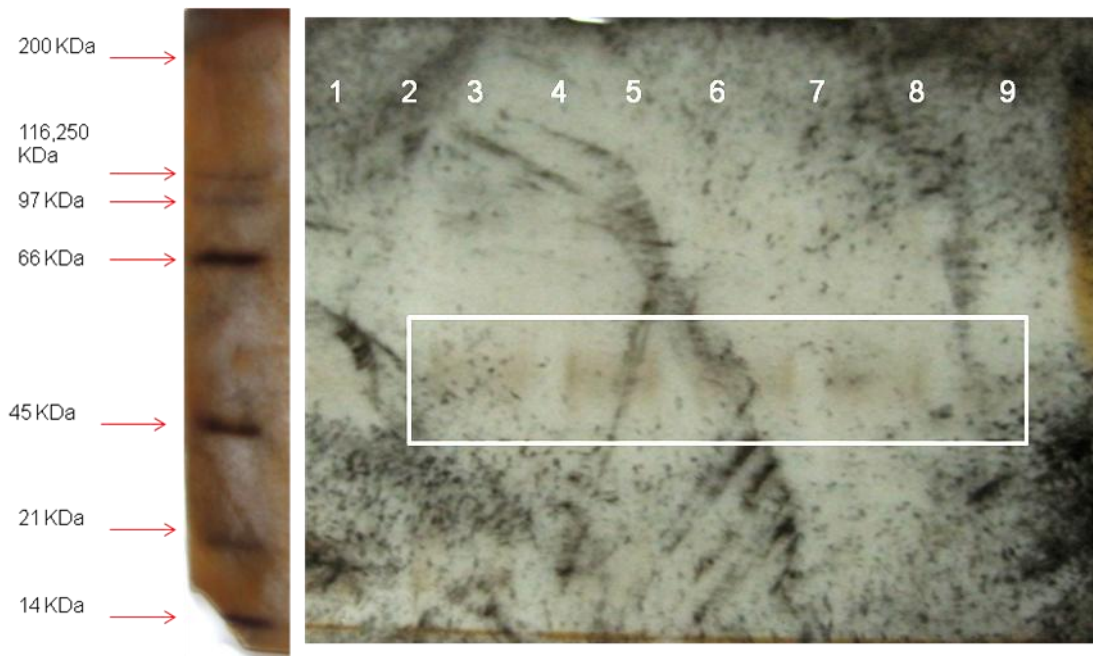


Figura 7: SDS PAGE condicione reductoras; Las muestras fueron tomadas luego de 1) 0 h de inducción, 2) 8 h, 3) 20 h, 4) 32 h, 5). 44 h, 6). 50 h, 7). 57 h, 8). 69 h, 9). 74 h y 9) 76 h

Tabla 2: Parámetros cinético clon 1 a escala de bioreactor 1,65 L

HORA	Tasa de crecimiento (h-1)	Tasa de producción (mg prot/h/g Biomasa)	Rendimiento X/S	Productividad (g Biomasa/h)	Productividad (mg prot/h)
8	0	0	0	77,84799169	128618,4211
20	0,03040487	0,016678249	7,532818432	36,23408787	55496,82396
32	0,10826762	0,031353363	45,33092098	35,98738816	43724,47822
44	0,02454743	0,006729616	77,9155555	84,47764247	57130,63026
49	0,00750388	0,000771089	10,03745193	55,15777698	43745,13871
56	0,02550127	0,004538602	40,25899104	70,72121092	46334,58647
68	0,00794869	0,001092622	18,6685487	67,96521174	41220,50817
74	ND	ND	ND	62,4545189	37878,3048

Los resultados de la tabla 2 muestran la cinética de crecimiento calculada como tasa de crecimiento y productividad de biomasa. Se observa que en el momento de inducción la levadura tiene un tiempo de adaptación, pero luego se recupera. En cuanto a la producción de proteínas se observa que llega al momento de inducción con una muy buena concentración pero luego de la inducción se disminuye debido a que solo se empiezan a sintetizar proteínas de interés; ya que la levadura deja de sintetizar las proteínas de crecimiento celular y metabolismo normal.

7.6. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE GALNS

7.6.1. Protocolo de pre tratamiento

Para el pre tratamiento de la purificación se realizó la filtración del extracto crudo con el fin de eliminar cristales y células en suspensión garantizando que el medio se encuentre lo más limpio posible; para esto se pasó el extracto por papel filtro Whatman No. 1 y por membranas de 0,45 y 0,22 μm . Posteriormente se realizó la ultrafiltración a través de una membrana de 30 KDa, lo cual permitió concentrar la muestra 26 veces, pasando de un volumen de 600 mL a 15 mL de retentato. Como se observa en la Figura 8 la actividad específica varió debido a que se eliminaron posibles interferentes en este paso. En el proceso de ultrafiltración se presentó una disminución marcada de actividad específica en el retentato obtenido. La concentración final de proteína en el retentato fue de 20,77 mg/mL con una actividad de 0,006 U/mg.

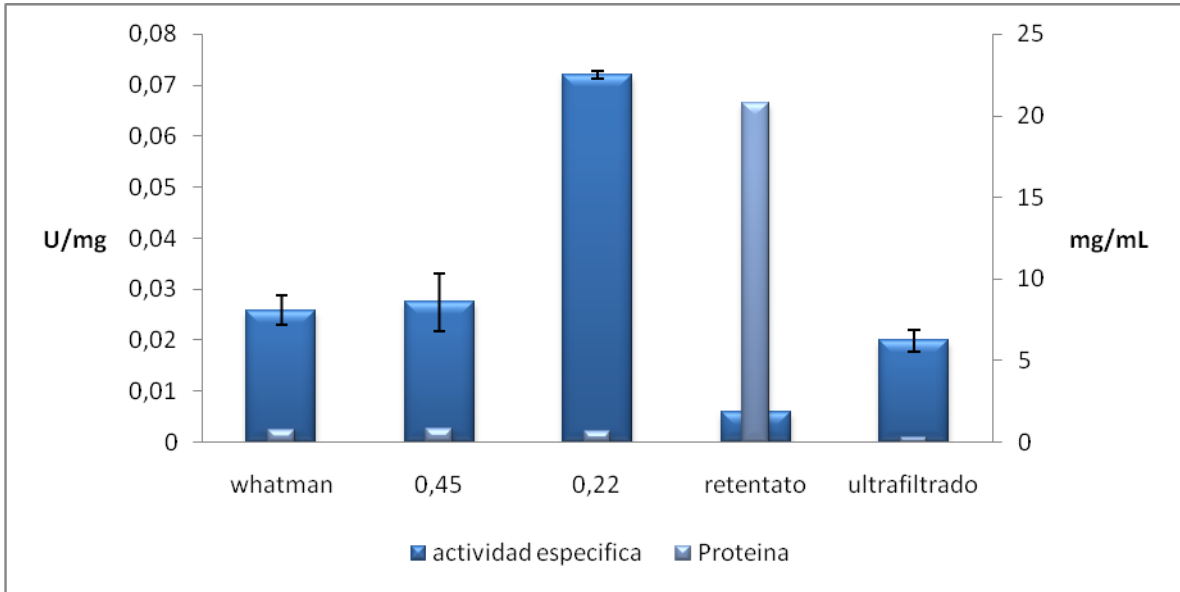


Figura 8: Proteína y actividad específica de alícuotas de cada paso de pre tratamiento.

7.6.2. Métodos cromatográficos Cromatografía de Intercambio catiónico S High Resolution

La Figura 9 muestra el cromatograma obtenido en la columna de intercambio catiónico, en donde el primer pico corresponde a la proteína no unida a la columna y el segundo a la fracción eluida con el gradiente lineal de NaCl 0,5M.

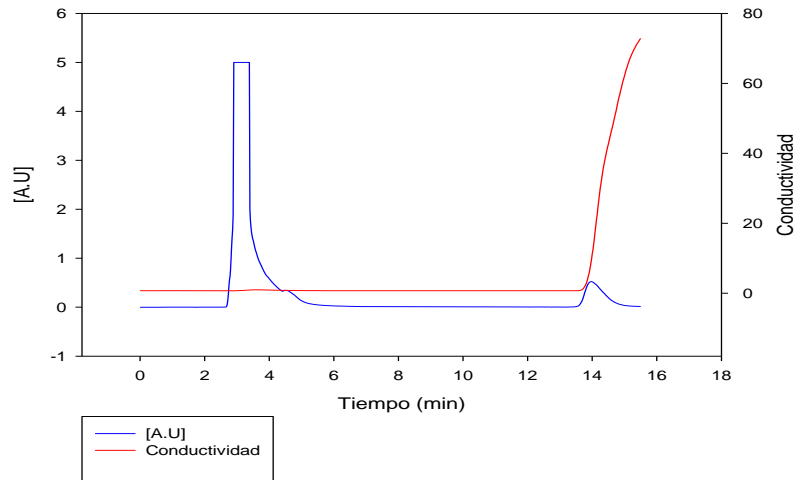


Figura 9: Cromatograma, cromatografía de intercambio catiónico.

Luego de la purificación se determinó la concentración de proteína mediante el método de BCA la cual es mostrada en la figura 10.

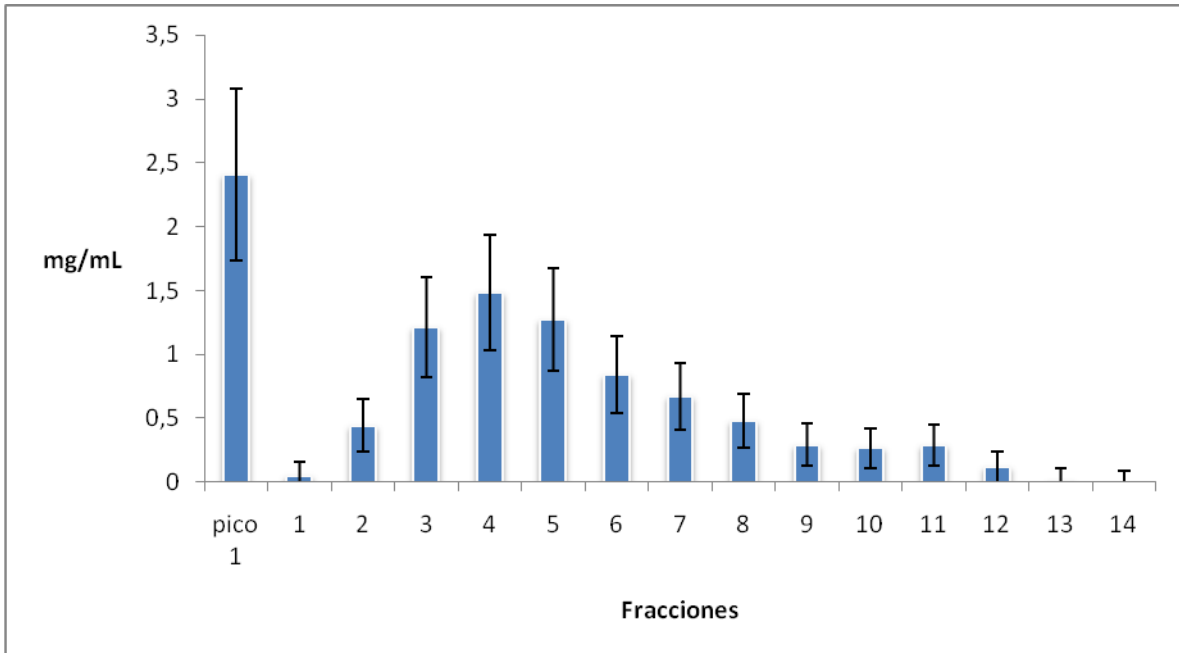


Figura 10: Concentración de proteína Columna de intercambio catiónico High S Support (Biorad)

La actividad específica GALNS se puede observar en la Figura 11, en la cual se observa que las fracciones 7 a 13 son las que presentan los mayores valores de actividad específica y volumétrica; estas fracciones fueron liofilizadas y preparadas para realizar cromatografía de exclusión molecular.

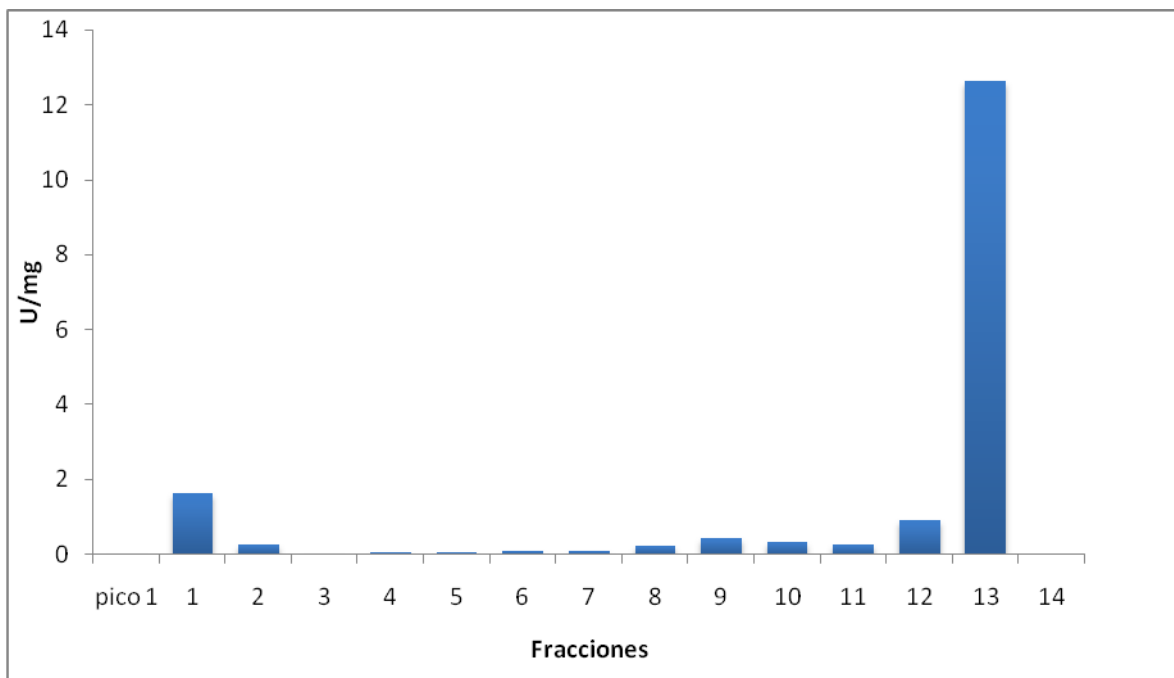


Figura 11: Actividad específica y volumétrica de las fracciones purificadas por columna de intercambio catiónico High S Support (Biorad)

Columna de exclusión molecular Sephacryl™ S-200 High Resolution

La Figura 12 muestra el cromatograma obtenido con la columna de exclusión molecular. La actividad GALNS se evaluó en las fracciones 7 a 23, debido a que fueron las que presentaron mayor concentración de proteína; encontrándose actividad GALNS en las fracciones 7 a 14 (Figura 13). Estas muestras fueron mezcladas y concentradas por liofilización, siendo reconstituidas en 1 mL de buffer acetato de potasio 25mM pH 5,5.

La Tabla 3 resume los resultados del proceso de purificación, donde se observa que se logró concentrar GALNS; adicional a esto se puede observar que se purificación 979,71 veces y se obtuvo un rendimiento de 9,8%.

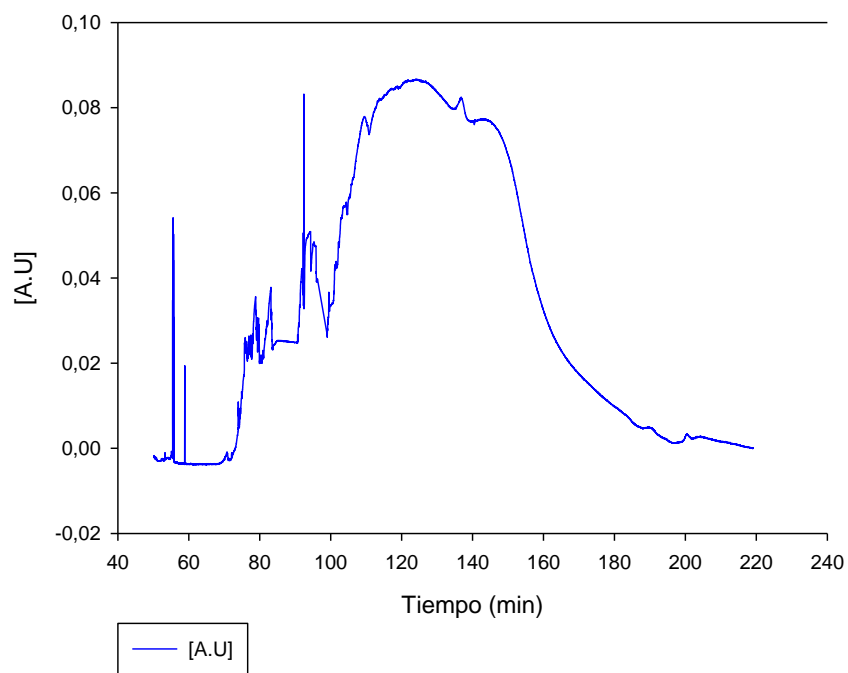


Figura 12: Cromatograma de cromatografía de exclusión molecular

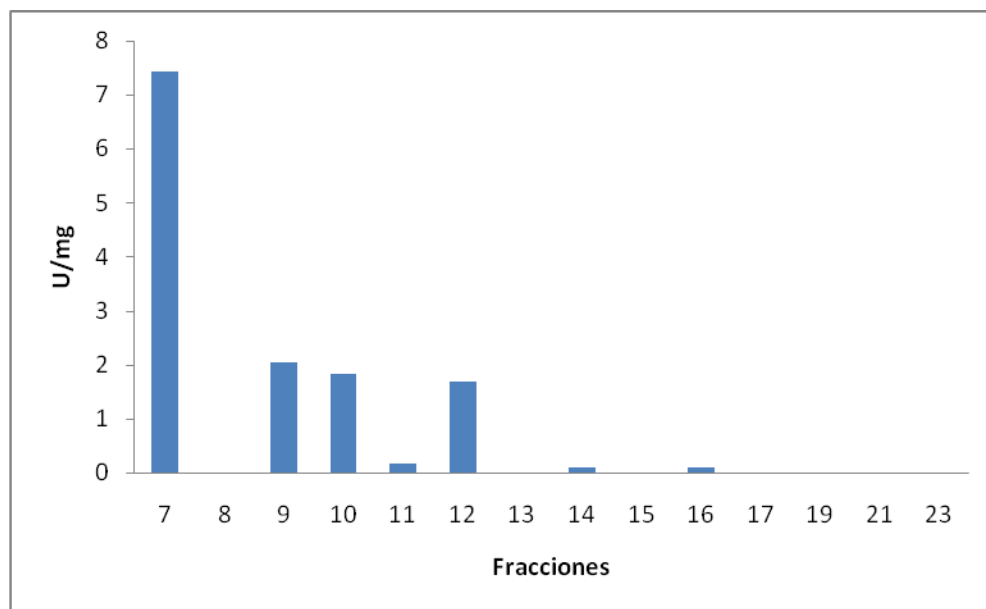


Figura 13: Cromatografía de exclusión molecular Sephacryl™ S-200 High Resolution

Tabla 3. Purificación de la enzima recombinante GALNS producida en *P. pastoris*.

NOMBRE	PROTEÍNA (mg)	Unidades de actividad	Actividad específica (u/mg)	Rendimiento (%)	Coefficiente de purificación
Extracto	391,30	10,12	0,03	100,00	1,00
RET	235,80	1,52	0,01	15,06	0,25
INTERCAMB	0,87	2,13	7,43	21,05	287,40
EXCLUSION	0,20	3,37	25,34	33,31	979,72

7.6.3. Western Blot

La Figuras 14 y 15 se muestran los resultados del análisis por Western-blot de la enzima GALNS purificada. Como control positivo se empleó un lisado de leucocitos de un individuo no afectado por la enfermedad. Bajo condiciones no reductoras se observó una banda de 120 kDa tanto en la proteína purificada como en los leucocitos humanos (Figura 14). Por otro lado, en condiciones reductoras para las dos muestras analizadas se observaron dos bandas de aproximadamente 50 y 30 kDa (Figura 15)

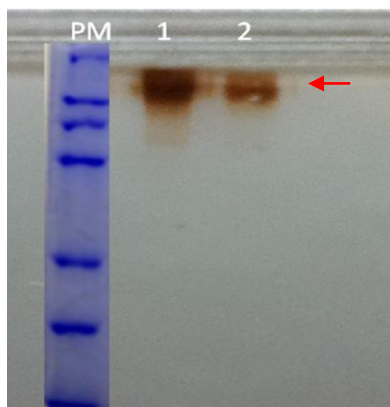


Figura 14: Western blot en condiciones no reductoras. 1) Lisado de leucocitos y 2) Proteína recombinante GALNS

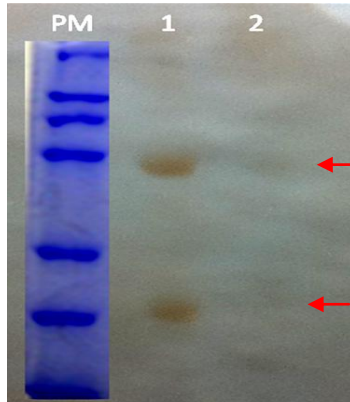


Figura 15: Western blot en condiciones reductoras. 1) Lisado de leucocitos y 2) Proteína recombinante GALNS

7.7. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LA PROTEINA RECOMBINANTE GALNS

7.7.1. Efecto del pH

El producto de la purificación de la enzima recombinante GALNS fue sometido a condiciones de pH entre 3 y 8 con incubaciones de 1 hora a 37°C. La enzima GALNS mostró un valor máximo de estabilidad en pH 5, mientras que su actividad se redujo en aproximadamente 80 y 70% a pHs por encima y debajo de este valor, respectivamente (Figura 16).

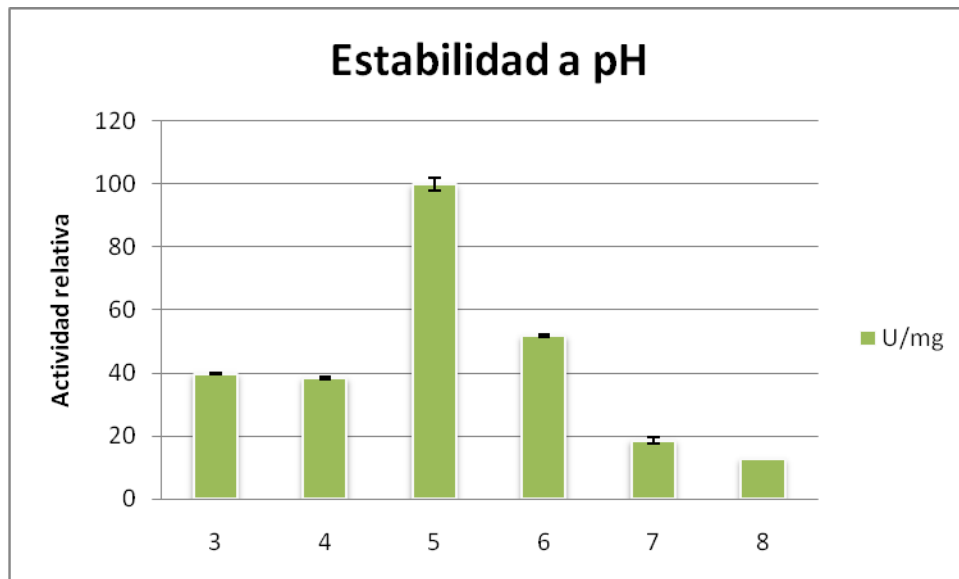


Figura 16: Actividad relativa de la enzima recombinante GALNS en diferentes condiciones de pH.

7.7.2. Efecto de la temperatura.

La enzima recombinante GALNS que fue purificada fue evaluada a tres temperaturas: 4°C, 37°C y 45°C con tiempos de incubación de 1 a 48 horas. A 4°C la enzima GALNS mostró un alto grado de estabilidad, conservando su actividad durante el experimento. Por otro lado, a 37 y 45 °C se observó una disminución de la actividad enzimática siendo más marcada a 45 que a 37 °C (Figura 17).

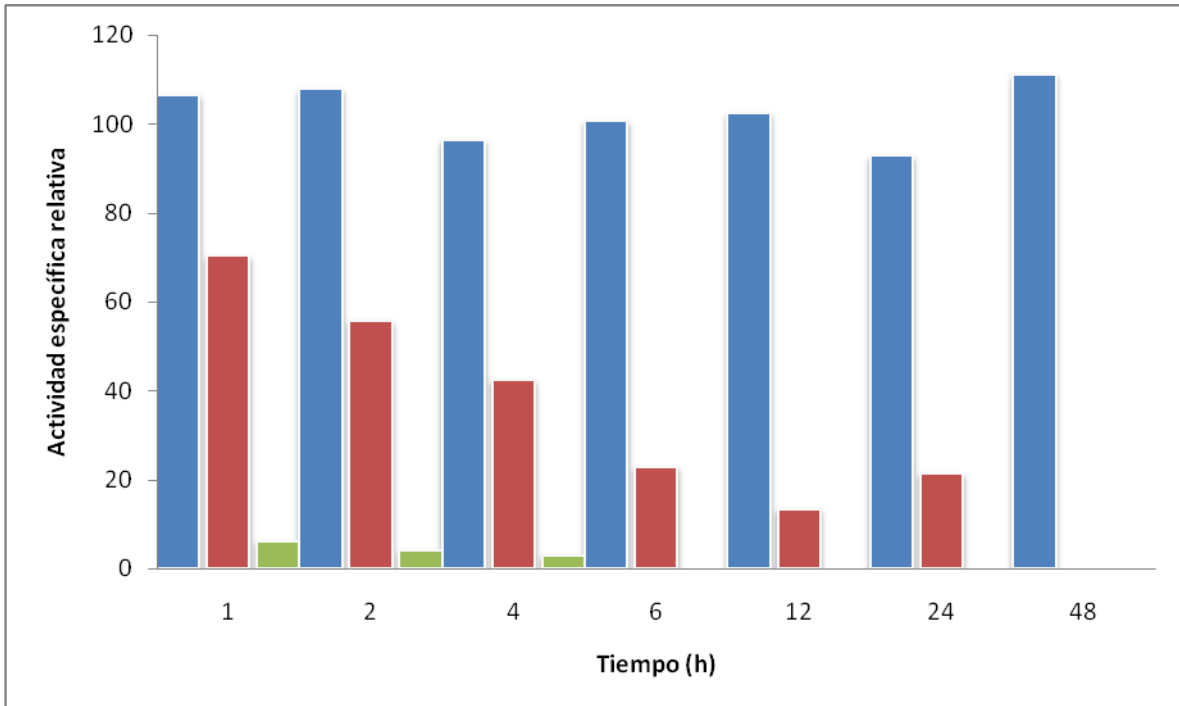


Figura 17: Actividad relativa de la enzima recombinante GALNS en diferentes condiciones de T°.

7.8. Evaluación *in-vitro* de la captura celular de la enzima recombinante GALNS

La captura celular de la enzima GALNS fue evaluada empleando células HEK 293 y concentraciones finales de la enzima de 10, 50 y 100 nM. Los resultados mostraron que en las concentraciones de 10 y 50 nM permitieron un aumento en los valores de actividad intracelular; mientras que en la concentración de 100 nM no se observó dicho aumento (Figura 18). Estos resultados concuerdan con lo observado en el medio de cultivo en donde las concentraciones de 10 y 50 nM mostraron menores valores de actividad enzimática que los observados con 100 nM (Figura 19).

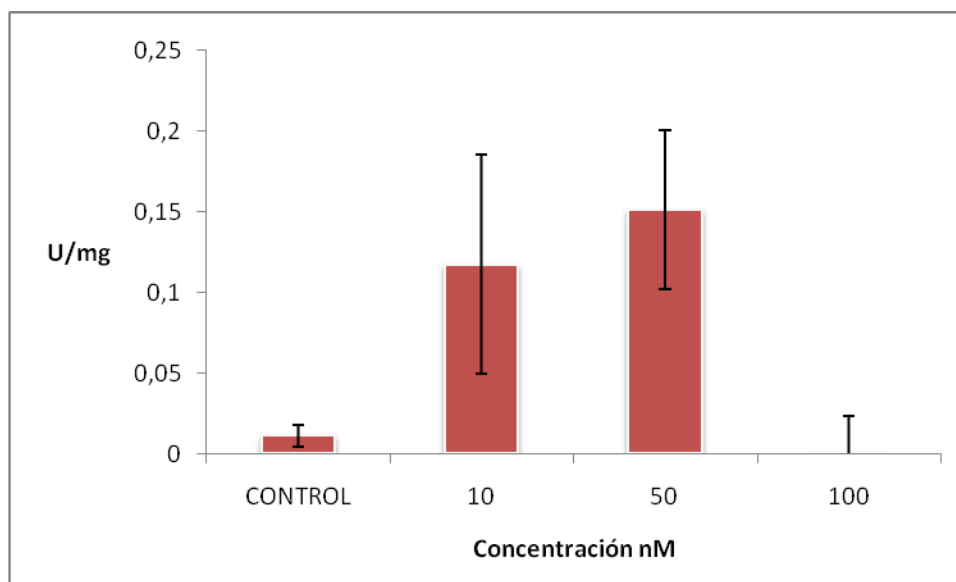


Figura 18: Actividad específica para los lisados celulares de HEK 293 en contacto con la enzima purificada.

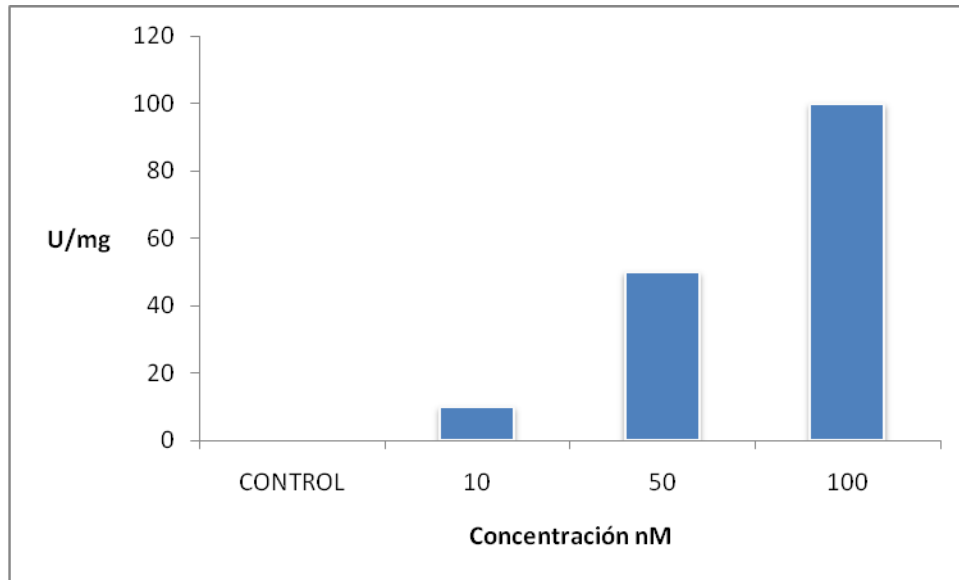


Figura 19: Actividad específica para el medio de cultivo de las células HEK 293 en contacto con la enzima purificada.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Debido a la ausencia de una terapia específica para la enfermedad de Morquio A, un creciente número de alternativas terapéuticas se encuentran en desarrollo para esta enfermedad (35). Entre este grupo de aproximaciones terapéuticas se destaca la terapia de reemplazo enzimático, la cual se encuentra aprobada para el tratamiento de MPS I, II y VI, con importantes efectos sobre la calidad de vida de los pacientes (36). Para el caso de la enfermedad de Morquio A, los ensayos preclínicos y clínicos han demostrado la posibilidad de realizar el tratamiento de esta enfermedad mediante la administración de una proteína recombinante (36). Sin embargo, debido a los altos costos asociados a la producción de estas proteínas en células de mamífero y el riesgo de contaminación con patógenos que puedan afectar a los pacientes (37), es necesario estudiar sistemas alternativos para la producción de la proteína humana recombinante GALNS. Por esto el objetivo de este trabajo fue el de producir la enzima GALNS recombinante en *Pichia pastoris* y realizar una caracterización parcial de la enzima purificada. Es importante aclarar que a diferencia del trabajo realizado por Moreno J (37), quien evaluó por primera vez la producción de GALNS en *P. pastoris*, en este trabajo se empleó el gen de la enzima GALNS sin la secuencia que codifica para el péptido señal de esta proteína.

De los clones obtenidos tras la transformación con el plásmido pPIC9-GALNS_{nsp}, a escala de 10 mL los clones 1 y 2 fueron los que presentaron los mayores valores de actividad GALNS, destacándose el clon 1 con una actividad específica máxima de 0,1 U/mg. Adicionalmente, el clon 1 fue el que presentó menor crecimiento pero mayor actividad específica GALNS, sugiriendo que el metanol ha sido empleado por el

microorganismo preferiblemente para realizar la inducción de la síntesis de la proteína y no como fuente de carbono. Por su parte, a escala de 100 mL se observó que a pesar de que el clon 2 presentó la mayor cantidad de GALNS, con 2935 ng GALNS/mg, esta no se encuentra activa, ya que los valores fueron menores que los observados con el clon 1. Este resultado puede ser debido a que la proteína recombinante no está siendo bien plegada y la estructura tridimensional no es funcional (27). Debido a que el clon 1 mostró los mayores valores de actividad específica a esta escala (0,104 U/mg), se seleccionó este clon para su escalado a bioreactor con un volumen efectivo de trabajo de 1,65 L.

Los valores reportados por Rodríguez *et al* (22) para la enzima GALNS producida en *E. coli* a escala de 100 mL fueron de 0,067 y 0,078 U mg⁻¹ de proteína total a las 2 y 4 h de inducción en la fracción intracelular soluble, mientras que lo reportado por Mosquera, *et al.* (28) en *E. coli* fue de 0,05 y 0,01 U mg⁻¹ de proteína intracelular. Por otro lado Moreno 2012, muestra que la enzima GALNS producida en *P. pastoris* con péptido señal tuvo una actividad específica de 0,037 U mg⁻¹. Lo que indica que la producción de GALNS sin el péptido señal mejora 0,355 veces respecto lo reportado por *P. pastoris* y 0,644 veces más respecto lo reportado en *E. coli*, indicando que es un modelo prometedor para la producción de proteínas recombinantes.

En la Tabla 2 se puede apreciar que el clon 1 a escala de bioreactor presentó una tasa rápida de crecimiento celular a expensas del glicerol de 0,253 h⁻¹; la cual se redujo de forma marcada cuando se inició el proceso de inducción con metanol a valores de 0,03 h⁻¹. Estos resultados sugieren que el microorganismo presentó un tipo de estrés por el cambio de sustrato y tiene que cambiar su metabolismo para poder crecer y generar energía (29). Sin embargo, la levadura logró adaptarse al nuevo sustrato como se observa con la productividad de biomasa, dato que se correlaciona con la tasa de producción de proteínas donde muestra que en condiciones de bioreactor las proteínas producidas están ligadas al crecimiento celular. Al determinar la actividad específica de GALNS y obtener los resultados de ELISA muestra que el pico de producción ocurrió a las 20 horas de cultivo con valores de 0,16 U mg⁻¹ h⁻¹ y una concentración de 210 ng GALNS mg⁻¹ (figura 5). Estos resultados puede ser comparados con los reportados por Moreno J. (37) quien obtuvo un valor de 0,10 U/mg a las 86 h de inducción, indicando que el proceso de producción de la enzima recombinante con la cepa *P. pastoris* GS115-GALNS es mucho más largo que el obtenido con la cepa descrita en el presente trabajo, lo que tendría un impacto importante en los costos de producción y el mantenimiento de condiciones controladas.

Sin embargo, los resultados del presente trabajo son menores que los reportados por Díaz y Beltrán 2012 (38, 39) quienes coexpresaron el gen SUMF1, necesario para la activación de las sulfatasas (40), logrando valores de actividad GALNS de 0,45 U/mg. Al igual que lo reportado por Dvorak-ewell *et. Al* (41) donde se reportan valores de 4,5 U/mg de actividad específica.

En su revisión, Barragán *et al.* (40) menciona la ausencia de estudios del efecto que tiene la presencia de la señal nativa de la levadura sobre la expresión de la proteína

recombinante; es por eso que se quiso comparar la producción de GALNS con péptido señal y sin él. Obteniendo una mayor producción de la enzima sin la señal de secreción nativa; indicando así que el modelo de expresión es mejor.

Teniendo en cuenta los resultados del cultivo en el bioreactor, se decidió realizar un segundo cultivo el cual fue detenido alrededor de las 30 h de cultivo, con el objetivo de obtener la mayor cantidad de proteína activa para el proceso de purificación. En este caso, la cantidad de proteína recombinante aumento a 277,84 ng GALNS/mg, al igual que la actividad específica (0,19 U/mg). Las razones para este aumento en la producción de la proteína recombinante no son claras, pues las condiciones de cultivo fueron las mismas que las empleadas en el primer cultivo.

El SDS-PAGE permitió observar la presencia de una proteína de aproximadamente 120 KDa en todas las horas de muestreo, la que podría corresponder a la proteína de interés (28). En la Figura 7 se observó, que a partir de la hora 32, hay presencia de una banda alrededor de 60 kDa que podría correspondería al monómero que conforma la proteína (28). Datos que se correlacionan con lo reportado por Mosquera et al. (28) donde las electroforesis de proteínas tienen un patrón similar.

A partir del segundo cultivo a escala de bioreactor se realizó la purificación de la enzima recombinante GALNS. Al ultrafiltrar la muestra por membrana de 30 kDa se concentró la proteína de interés 26 veces; debido a que esta membrana permite el paso de proteínas con un peso molecular menor a 30 kDa.

Luego de concentrar la proteína por el método de ultrafiltración se realizó la purificación por columna de intercambio cationico. La proteína eluida, al tener un punto isoeléctrico mayor al pH del buffer de corrido presenta una carga positiva que permite la unión a los grupos funcionales de la columna los cuales se encuentran cargados negativamente .Lo cual es acorde con lo reportado en la bibliografía debido a que se reporta un punto isoeléctrico de 6,5, para GALNS y al bajar el pH a 4,5 por medio del buffer la proteína toma carga positiva. Las fracciones que mostraron actividad luego de la purificación por columna de intercambio iónico fueron concentradas por liofilización y sometidas a un segundo paso de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular. La columna empleada para la purificación fue SephacrylTM S-200 High Resolution la cual permite la separación de proteínas con masa molecular menor a 150 kDa. Debido a que GALNS se presenta como un homodímero de 120 kDa (28), se esperaba que las fracciones activas se encontraran hacia la parte media del cromatograma, lo cual concuerda con lo observado a esta etapa de purificación. Es importante destacar la importancia de este segundo paso de purificación, pues permitió eliminar proteínas contaminantes, lo que llevó a un aumento importante en el valor de actividad específica de GALNS (Tabla_3).

Este trabajo constituye el primer reporte de la purificación de la enzima GALNS recombinante en *P. pastoris*, con un rendimiento de 33.31% y una veces de purificación de 979,72.

Mosquera et al (28) mostraron un porcentaje de recuperación de 1.3% y 1,7 veces de purificación indicando que la metodología utilizada en este trabajo presenta mejores resultados a los obtenidos para la proteína producida de forma recombinante en *E. coli*. ; Por su parte, Tomatsu et al (30), para una enzima GALNS recombinante producida en células CHO, reportaron 37.4% de recuperación y 1317 veces de purificación.

Adicionalmente se puede afirmar que se está produciendo 0.1 mg de proteína GALNS por litro de bioreactor indicando que son valores bajos respecto a lo reportado por Tomatsu et al (30) y Mosquera et al (28) que muestran producción de 1 mg/L y 3mg/L respectivamente.

Luego del proceso de purificación de la enzima recombinante GALNS producida en *P. pastoris* se evaluó el comportamiento de esta a diferentes condiciones de pH y temperatura, observándose que la enzima presenta su mejor actividad a un pH de 5,0 y es estable a 4°C hasta por 48 h, mientras que a 37 y 45 °C se observa una pérdida importante de actividad. Estos datos correlacionan con los reportado por Mosquera et al (28) y Tomatsu et al (30); quienes mostraron que el pH optimo para la proteína es de 5,0.

Adicional a esto se puede evidenciar que la enzima recombinante efectivamente tiene un comportamiento como una enzima lisosomal humana ya que la enzima permanece inactiva a pHs ácidos; al recordar en el lisosoma se mantienen un pH básico.

La evaluación de la captura celular en células en cultivo mostró por primera vez para una sulfatasa humana recombinante producida en *P. pastoris*, la posibilidad de ser internalizada. Este efecto se observó con las concentraciones de de 10 y 50 nM, mientras que con la concentración de 100 nM no se observó la internalización de la enzima, permaneciendo en el medio de cultivo. Las concentraciones que se seleccionaron para el ensayo se determinaron a partir de los resultados reportados por Mosquera et al. (28) quienes evaluó esas concentraciones para estar 10 veces por enzima de la concentración que toma generalmente la célula. A pesar que se desconocen las razones para que la proteína no haya sido internalizada en concentraciones de 100 nM, estos resultados sugieren que la proteína recombinante presenta sitios similares de glicosilación a la humana donde se encuentran residuos de manosa-6-fosfato (M6P) el cual interactúa con el receptor de M6P presente en las células permitiendo así el ingreso de la proteína glicosilada a la célula (42). Este mecanismo hace que sea posible proporcionar terapia de reemplazo enzimático para este tipo de enfermedad (42). Estos resultados son soportados con los del Western-blot, en donde se observan bandas de peso similar a las observadas en leucocitos, sugiriendo un procesamiento postraduccional de la proteína recombinante similar al observado en células humanas. Estos datos correlacionan con lo reportado por Tomatsu et al (30), quien evaluó la captura celular en cultivos de condrocitos de la proteína recombinante producida en células CHO. Por el contrario los resultados reportados por Mosquera et al (28). Muestran que la proteína recombinante producida en *E. coli* no logró ser capturada por células HEK 293 debido a que este microorganismo no realiza procesos de N-glicosilación.

Estos resultados muestran por primera vez la purificación y caracterización de una sulfatasa humana producida en *Pichia pastoris* GS115, mostrando el potencial de esta enzima para su futuro uso en terapia de reemplazo enzimático para la enfermedad de Morquio A.

|

9. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 3 clones transformados de *P. pastoris* GS115 con el plásmido Ppic9 GALNSnsp para la producción de la enzima recombinante N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS), permitiendo evaluar la cinética del microorganismo y la producción de la enzima, obteniendo $0,19 \text{ U mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ GALNS y un rendimiento de $0,19 \text{ U mg}^{-1} \text{ GALNS g}^{-1} \text{ L}^{-1}$ a escala de 1,65 L
- Se evidenció que la proteína estaba siendo secretada al medio del cultivo y no se encontraba acumulada al interior de la célula.
- Se purificó la enzima recombinante GALNS producida en *P. pastoris* mediante procesos de filtración, ultrafiltración, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de exclusión molecular, con una actividad específica de 25,34 U/mg un rendimiento de 33.31 % y unas veces de purificación de 979,72.
- La enzima recombinante es estable a 4°C por 48 h y su máxima actividad fue observada a pH de 5,0.
- La evaluación *in vitro* mostró que la enzima recombinante puede ser capturada por las células HEK 293, sugiriendo que las glicosilaciones generadas por *P. pastoris* son muy parecidas a las realizadas en células humanas.
- Estos resultados muestran por primera vez la purificación y caracterización de GALNS humana producida en *Pichia pastoris* GS115, mostrando el potencial de esta enzima para su futuro uso en terapia de reemplazo enzimático para la enfermedad de Morquio A.

10. RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto de la concentración de metanol sobre la producción de la enzima recombinante.
- Evaluar la coexpresión del gen GALNSnsp con el de la enzima generadora de formilglicina (SUMF1).
- Para caracterizar mejor la proteína recombinante GALNS producida en *P. pastoris* se sugiere evaluar pHs intermedios como lo son 3,5, 4,5, 5,5, 6,5 y 7,5.
- Evaluar la captura celular en otras células como fibroblastos y condrocitos normales y de individuos afectados con la enfermedad de Morquio A, así como concentraciones adicionales y el efecto de la presencia de manosa-6-fosfato.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Barrera, LA.2009. Estudios bioquímicos de los errores innatos del metabolismo en Colombia durante dos décadas. *Rev Acad Colomb Cienc.* 33(128): 377-394.
2. Córdoba-Ruiz HA, Poutou-Piñales R, Echeverri-Peña OY, Algecira-Enciso N, Landázuri P, Sáenz H, Barrera-Avellaneda LA. 2009 Laboratory scale production of the human recombinant iduronate 2-sulfate sulfatase-Like from *Pichia pastoris*. *Afr J Biotechnol* 8, 1786-1792.
3. Poutou-Piñales RA, Vanegas A, Landazuri P, Sáenz H, Lareo L, Echeverri OY, Barrera LA.2010. Human sulfatase transiently and functionally active expressed in *E. coli* K12. *Electron J Biotechnol* 13:DOI:10.2225/vol13-issue3-fulltext-8.
4. Córdoba- Ruíz HA, Poutou R, Algecira N, Barrera LA. *Pichia pastoris*,2003. Una alternativa para la producción de glicoproteínas humanas de uso terapéutico. Estrategias de fermentación. *Revista colombiana de biotecnología*; 2,3 – 84.
5. Muenzer J.2012. The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatr*; 144, 27-35.
6. Salinas H, Preisser J, Astudillo J, Cerda S, Castillo S, Fernandez F, Ide F. 2012. Síndrome de morquio (mucopolisacaridosis tipo IV) y embarazo. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 70(6): 400-403.
7. Pajares S, Alcalde C, Couce ML, Del toro M, Gonzalez A, Guillén E, Pineda M, Pintos G, Gort L, Coll MJ. Molecular analysis of mucopolysaccharidosis IV A (Morquio A) in Spain. *Molecular Genetics and Metabolism*2012; 106 :196-201
8. Montaña AM, Tomatsu S, Gottesman G, Smith M, Orii, T. 2007. International Morquio A registry: Clinical manifestation and natural course of Morquio A disease. *J Inherit Metab Dis*; 30, 165-174.
9. Lankester B, Whitehouse M, Gargan MF. 2006. Morquio Syndrome. *Current Orthopaedics*; 20, 128–131.
10. Barrera, L, Echeverri, O, Espinosa, E. Errores innatos del metabolismo, Fundamentos de pediatría, vol 3. Corporacion para investigaciones Biologicas: Medellin. 2007: 356-96.

11. Tomatsu S, Montaña A, Oikawa H, Smith M, Barrera L, Chunean M, Thhacke M, 2011, Mucopolysaccharidosis Type IVA (Morquio A Disease): clinical Review and Current Treatment: A Special Review. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* , 12, 437-444.
12. Tomatsu, S.; Montaña, A.M.; Dung, V.C.; Ohashi, A.; Oikawa, H.; Oguma, T.; Orii, T.; Barrera, L.2010. Enhancement of drug delivery: enzyme-replacement therapy for murine morquio a syndrome. *Mol. Ther.* 18, 1094-1102.
13. Lemes A, Roselli M, Quadrelli R. 2006. Terapia de reemplazo enzimático para enfermedades de almacenamiento lisosomal: enfermedad de Gaucher tipo I, enfermedad de Fabry y mucopolisacaridosis I. *Clinicas pediátricas del sur*;18:27.
14. J.E. Wraith Enzyme replacement therapy for the management of the mucopolysaccharidoses *Int J Clin Pharmacol Ther*, 47(2009), pp. S63–S65.
15. Mattia M, Hacker D, Baldi L, Wurm, F.2008. Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects. *Drug Discovery Today: Technologies.* vol5: 37-42.
16. Gutierrez M. 2005. Producción de vectores derivados de virus adenoasociados (AVV) como modelo de terapia génica para mucopolisacaridosis. Tesis doctoral, Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana
17. Cordoba H, Algecira N, Poutou R, Barrera A. 2003. *Pichia pastoris*, una alternativa para la producción de glicoproteínas humanas de uso terapéutico. Estrategias de fermentación. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 5, 22-25.
18. Oriol C, Ramón R, Montesinos JL, Valero F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microbial Cell factories.* 2006 5 (17) 1-20
19. Poutou RA. *Expresión de Sulfatasas Humanas en Escherichia coli y Pichia pastoris*, Tesis Doctoral. Instituto de Errores Innatos del Metabolismo. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., 2006, 162p
20. Invitrogen. *Pichia Expression kit* A manual of method for expression of recombinant protein in *Pichia pastoris*. Cat No. K1710-01 California. Invitrogen
21. Rodriguez A, Espejo AJ, Hernandez A, Velasquez OL, Lizaraso LM, Cordoba HA, et al. 2010. Enzyme replacement therapy for Morquio A: an active recombinant

N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in *Escherichia coli* BL21. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 37:1193–201.

22. Mosquera A, 2010. purificación y caracterización de la enzima n-acetilgalactosamina-6-sulfatasa recombinante extracelular producida en *E. coli* bl21/PGEX-GALNS. Tesis de pregrado. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
23. Ausubel FM, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman JG, Smith J, Struhl K. Short protocols in molecular biology. 4ta Ed. Wiley John & Sons Inc: Hoboken 1999.
24. Diaz D, Beltrán L. 2012. Evaluación de la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* mediante estrategia de limitación de oxígeno y sustrato. Tesis de pregrado. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
25. Diaz S, Rodríguez A, Alméciga C, Poutou R, Cordoba H, Barrera A. Avance en la producción de IDS recombinante en *Pichia pastoris*. Efecto de la optimización del gen
26. Braulke, T, Bonifacino, J. Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793. 2009; 605–614
27. Mosquera A, Rodriguez A, Soto C, Leonardi F, Espejo A, Sánchez OF, Almeciga CJ, Barrera L. Characterization of a recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfates produced in *E. coli* for enzyme replacement therapy of Morquio A disease. *Process Biochem* 2012; 1-6
28. Bauman K, Carnicer M, Dragosits M, Graf A, Stadlmann J, Jouhten P, Maaheimo H, Gasser B, Albiol J, Mattanovich D, Ferrer P. A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. *BMC System Biology*. 2010, 4 (141): 1-23.
29. Characterization and pharmacokinetic study of recombinant human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase Landgrebe J, Dierks T, Schamidt B, Figura Kv. The human SUMF1 gene, required for posttranslational sulfatase modification, defines a new gene family which is conserved from pro- to eukaryotes. *Gene*. 2003;316:47-56

30. Pajares S, Alcalde C, Couce ML, Del toro M, Gonzalez A, Guillén E, Pineda M, Pintos G, Gort L, Coll MJ. Molecular analysis of mucopolysaccharidosis IV A (Morquio A) in Spain. *Molecular Genetics and Metabolism* 2012; 106 :196-201
31. Chen H, Chu J, Zhang S, Zhuang Y, Oian J, Wang Y, Hu X. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves S-adenosylmethionine production in a recombinant *Pichia pastoris*. *Microbiol Biotechnol.* 2007, 74 1205-1212..
32. Gasser b, Saloheimo M, Rinas U, Dragosits M, Rodriguez E, Baumann K, Guiliani M, Parrilli E, Branduardi P, Lang C, Porro D, Ferrer P, Tutino ML, Mattanovich D, Villaverde A. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microbial Cell Factories.* 2008, 7 (11): 1-18
33. Harmatz P, Giugliani R, Schwartz I, Guffon N, Leão E, SaMC, Wraith J, Beck M, Arash L, Scarpa M, Yu Z. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: A phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled, multinational study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase (recombinant human arylsulfatase B or RHASB) and follow-on, open-label extension study. *J Pediatric.* 2006; 148 (9): 533-539
34. ange MC, Teive HA, Troiano AR, Bitencourt M, Funke VA, Setubal DC, et al. Bone marrow transplantation in patients with storage diseases: a developing country experience. *Arq Neuropsiquiatr.* 2006 Mar;64(1):1-4.
35. Tomatsu S, Mackenzie W, Theroux M, Mason R, Thacker M, Shaffer T, Montaña A, Rowan D, Sly W, Alméciga-Díaz CJ, Barrera L, Chinen Y, Yasuda E, Ruhnke K, Suzuki Y, Orii T. 2012. Current and emerging treatments and surgical interventions for Morquio A Syndrome: A review. *Research and Reports in Endocrine Disorders* 2009. 2:65-77.
36. Ohashii T. Enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases. *Pediatric Endocrinol Rev.* 2010. 2: 67-71.

37. Moreno J. Producción de N acetil- galactosamina-6-sulfato sulfatasa en *Pichia pastoris*. **Tesis de Pregrado**. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2012, 26, 32, 38 p
38. Díaz S, Rodríguez A, Alméciga C, Pouotu R, Córdoba H, Barrera L. Avance en la producción de IDS recombinante en *Pichia pastoris*: efecto de la optimización del gen.
39. Beltran L, Diaz D. Evaluación de la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* mediante estrategias de cultivo limitado por oxígeno y sustrato. **Tesis de Pregrado**. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2012, 35,59,68p.
40. Barragan, C. Sáenz, H. Poutou R, Cordoba H, Mercado M, Barrera LA. Influencia de un factor sobre la expresión de IDS_{hr} en *P. pastoris*. Revisión sistemática de la literatura y análisis computacional. Revista NOVA. Vol 3 80:92.
41. Andgrebe, J., Dierks, T., Schamdt, B., Figura, K.v., 2003. The human SUMF1 gene, required for posttranslational sulfatase modification, defines a new gene family which is conserved from pro- to eukaryotes. *Gene* 316, 47-56.
42. Dvorak-Ewell M, Wendt D. Hague C, Christianson T. Koppaka V, Crippen D. Kakkis E. Vellard M. Enzyme Replacement in a Human model of Mucopolysaccharidosis IVA in vitro and its biodistribution in the cartilage of wild Type mice. 2010. 16;5(8).