

**EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO HUMANO (hEGF)
EN *PICHIA PASTORIS*.**



VALERIA DUQUE CLAVIJO

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2015**

**EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO HUMANO (hEGF)
EN *PICHIA PASTORIS*.**

VALERIA DUQUE CLAVIJO

Proyecto de Grado para el Título de Químico Farmacéutico

**Tutor
Federico Odreman, Ph D.**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2015**

Contenido

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 7 |
| SUMMARY | 8 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 10 |
| 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO | 12 |
| 2.1. Justificación del proyecto | 12 |
| 2.2. Marco teórico y estado del arte | 14 |
| 2.2.1. Generalidades de la producción de Proteínas Recombinantes. | 14 |
| 2.2.2. Relevancia Terapéutica y Cosmética del Factor de Crecimiento Epidérmico humano (hEGF). | 14 |
| 2.2.3. <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión de Proteínas Recombinantes..... | 15 |
| 2.2.4. Producción de proteínas Recombinantes bajo la regulación del <i>P-AOX1</i> en <i>P. pastoris</i> , a una elevada densidad celular. | 16 |
| 2.2.5. Herramientas empleadas en la determinación y caracterización de Proteínas Recombinantes..... | 17 |
| 2.3. Objetivos. | 20 |
| 2.3.1. Objetivo general..... | 20 |
| 2.3.2. Objetivos específicos. | 20 |
| 2.4. Metodología. | 21 |
| 2.4.1. Preparación de reactivos. | 21 |
| 2.4.2. Establecimiento de las condiciones para el crecimiento de <i>P. pastoris</i> | 22 |
| 2.4.3. Reconocimiento de levaduras recombinantes de <i>P. pastoris</i> por antibióticos de selección..... | 23 |
| 2.4.4. Detección de las proteínas nativas en <i>P. pastoris</i> secretadas al medio extracelular por SDS-PAGE..... | 24 |
| 2.4.5. Inmunotransferencia de Western blot en la detección de estándares hEGF. | 25 |
| 2.4.6. Inducción de la expresión del hEGF en <i>P. pastoris</i> | 26 |
| 2.4.7. Optimización de la expresión del hEGF en <i>P. pastoris</i> | 26 |
| 2.4.8. Análisis de datos por Minitab 17, Stat Graphics Centurion, MATLAB 8.5. y Microsoft Excel 2010..... | 29 |
| 2.4.9. Caracterización del hEGF por LC-MS..... | 29 |
| 2.4.10. Matriz del marco lógico..... | 30 |
| 2.5. Resultados. | 33 |
| 2.5.1. Reconocimiento de levaduras recombinantes de <i>P. pastoris</i> por antibióticos de selección..... | 33 |
| 2.5.2. Detección de las proteínas nativas en <i>P. pastoris</i> secretadas al medio extracelular por SDS-PAGE..... | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 2.5.3. Inmunotransferencia de Western blot en la detección de estándares hEGF. | 34 |
| 2.5.4. Inducción de la expresión del hEGF en <i>P. pastoris</i> . | 35 |
| 2.5.5. Optimización de la producción del hEGF en <i>P. pastoris</i> . | 37 |
| 2.5.6. Caracterización del hEGF por LC-MS. | 50 |
| 2.6. Discusión. | 56 |
| 2.7. Conclusión. | 62 |
| 2.8. Recomendaciones. | 63 |
| 2.9. Referencias | 63 |
| 3. Anexos. | 65 |

Contenido de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Ensayos realizados en los estudios iniciales de crecimiento de <i>P. pastoris</i> . | 23 |
| Tabla 2. Ensayos realizados en la detección del gen de selección en levaduras recombinantes de <i>P. pastoris</i> . | 23 |
| Tabla 3. Estándares de hEGF empleados para su detección por Western blot. | 25 |
| Tabla 4. Ensayos realizados en la determinación de la curva de crecimiento de <i>P. pastoris</i> a 28°C y 150 RPM. | 26 |
| Tabla 5. Ensayos realizados en la determinación de las curvas de crecimiento de <i>P. pastoris</i> a diferentes pH y temperaturas, con una tasa de agitación de 280 RPM. | 27 |
| Tabla 6. Concentraciones del estandar hEGF empleadas para su detección por transferencia de Western blot. | 28 |
| Tabla 7. Matriz del marco lógico. | 30 |
| Tabla 8. Resultados obtenidos en el desarrollo de cultivos de <i>P. pastoris</i> con antibiótico de selección G418 en agar YPD a 28°C. | 33 |
| Tabla 9. Modelo lineal general diseñado en Minitab 17 para determinar los tratamientos que maximizan la densidad celular de <i>P. pastoris</i> , luego de 16 horas de incubación. | 39 |
| Tabla 10. ANOVA diseñado en Minitab 17 para determinar los tratamientos que afectan la densidad celular de <i>P. pastoris</i> , luego de 16 horas de incubación. | 39 |
| Tabla 11. Comparación por parejas de las medias de Fisher, para estimar la dependencia de la concentración celular con la sub-división de <i>P. pastoris</i> , el pH y la temperatura de incubación. | 41 |
| Tabla 12. Desviaciones estandar de cada tratamiento empleado para la construcción de las curvas de crecimiento de <i>P. pastoris</i> . | 43 |
| Tabla 13. ANOVA adicional para variables según el orden de introducción. | 45 |
| Tabla 14. Comparación estadística de pendientes para estimar la influencia de cada tratamiento descrito, sobre la tasa de división celular de <i>P. pastoris</i> . | 46 |
| Tabla 15. Evaluación de los niveles de expresión del hEGF recombinante en <i>P. pastoris</i> y su dependencia con las condiciones de crecimiento descritas. | 49 |
| Tabla 16. Resultados relevantes de la caracterización del hEGF por LC-MS. | 55 |

Contenido de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Desarrollo de los cultivos de <i>P. pastoris</i> con antibiótico de selección en agar YPD a 28°C. | 33 |
| Figura 2. Determinación de las proteínas de <i>P. pastoris</i> nativas que son secretadas al medio extracelular, por SDS-PAGE. | 34 |
| Figura 3. Determinación del hEGF en el medio extracelular de <i>P. pastoris</i> , luego de la inducción con 0.5% de metanol (%v/v) en BMMY por SDS-PAGE. | 35 |

| | |
|---|----|
| Figura 4. Transferencia de Western blot en membrana de PVDF para la detección del hEGF en el medio extracelular de <i>P. pastoris</i> luego de la inducción con 0.5% de metanol (%v/v) en BMMY.. | 36 |
| Figura 5. Transferencia de Western blot en membrana de PVDF para la detección del hEGF en el medio extracelular de <i>P. pastoris</i> luego de la inducción con 0.5% de metanol (%v/v) en BMMY.. | 36 |
| Figura 6. Transferencia de Western blot en membrana de PVDF para la detección del hEGF durante la optimización de su expresión en <i>P. pastoris</i> . | 47 |
| Figura 7. Transferencia de Western blot en membrana de PVDF para la detección del hEGF durante la optimización de su expresión en <i>P. pastoris</i> . | 47 |
| Figura 8. Inconvenientes obtenidos en la transferencia de Western blot sobre membrana de PVDF para la realización de la curva del estandar hEGF. | 48 |
| Figura 9. Secuencia de aminoácidos del EGF. (Lazzarini, Duarte, & Ferreira, 2013). | 65 |
| Figura 10. Receptor del EGF (EGRF). Ligandos y fisiología celular. Algunos procesos clave. (Martinez, 2003). | 66 |

RESUMEN

El Factor de Crecimiento Epidérmico humano, es un polipéptido con actividad mitogénica sobre la mayoría de las células epiteliales y fluidos biológicos del organismo, tales como el plasma y la orina. Recientemente, esta macromolécula ha adquirido gran relevancia en la Industria Farmacéutica y Cosmética. Por tal motivo, resulta conveniente estudiar las estrategias de optimización en la producción de este polipéptido recombinante, enfocadas en la Ingeniería Genética, el manejo del medio de cultivo y el empleo de diferentes organismos hospederos.

El sistema de expresión empleado en este trabajo fue *Pichia pastoris* ya que en comparación con otros organismos hospederos, ofrece altos niveles de expresión, secreta las proteínas heterólogas al medio extracelular, excreta bajas concentraciones de proteínas nativas, posee una alta tasa de división celular, crece en medios de cultivo relativamente simples y es un sistema de expresión económico.

En este trabajo, se empleó la técnica SDS-PAGE para visualizar las proteínas extracelulares nativas de *Pichia pastoris* y enfocar los procedimientos de producción del Factor de Crecimiento Epidérmico humano. Luego de la inducción del polipéptido recombinante, se ejecutó la misma herramienta, seguida de una inmunotransferencia de Western blot para su respectiva detección.

Posteriormente se estudiaron algunas estrategias de optimización en la producción del Factor de Crecimiento Epidérmico humano Recombinante en *Pichia pastoris*. Inicialmente, se determinó que la acumulación de biomasa, se favorecía con la inclusión de las levaduras en medio YPD a pH 6. Posteriormente, al evaluar las tasas de crecimiento en función del pH y la temperatura de incubación, se evidenció que *Pichia pastoris*, crece rápidamente en medio YPD a pH 6 y 30°C. Al incrementar las tasas de agitación de los cultivos líquidos, se favorecía el crecimiento celular, al promover el consumo uniforme de nutrientes.

En la inducción del Factor de Crecimiento Epidérmico humano Recombinante bajo las condiciones ambientales descritas, se obtuvo una inhibición de la expresión a pH 8 y 25°C. Sin embargo, no se pudo estimar una relación directa del pH y la temperatura, sobre los niveles de expresión del polipéptido, considerando que la estimación semi-cuantitativa empleada por Western blot, no emitió resultados concretos debido a la falta de reproducibilidad del método a escala de laboratorio.

Finalmente, se realizó una caracterización estructural del Factor de Crecimiento Epidérmico humano con Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas y aplicando un algoritmo de deconvolución para optimizar las señales relevantes del polipéptido y eliminar el ruido. Los resultados obtenidos, sustentan la presencia de la macromolécula en el medio extracelular de *P. pastoris*.

Palabras clave: Factor de Crecimiento Epidérmico Humano, *Pichia pastoris*, optimización.

SUMMARY

The human Epidermal Growth Factor is a polypeptide that has a mitogenic activity on most epithelial cells and biological fluids in the body. Recently, this macromolecule has acquired great relevance in the Pharmaceutical and Cosmetic Industries. Therefore, it is advisable to study the optimization strategies in the production of this recombinant polypeptide, focused on Genetic Engineering, management of culture medium and use of different host organisms.

The expression system used in this study was *Pichia pastoris* as compared to other host organisms, provides high levels of expression of heterologous proteins secreted into the extracellular medium, excreted low concentrations of native proteins, has a high rate of cell division, growing in culture media relatively simple and is an economical expression system.

In this paper, initially the SDS-PAGE technique was used to visualize proteins native in extracellular medium of *Pichia pastoris*, in order to focus the human Epidermal Growth Factor purification procedures. However, macromolecules wasn't detected in this section. Moreover, the same technique was used to visualize the human Epidermal Growth Factor after his induction, but it was not possible to detect any signal using this technique because low expression levels. However, it was possible to detect the recombinant polypeptide with Western blot.

Subsequently some optimization strategies were studied in the production of Recombinant human Epidermal Growth Factor in *Pichia pastoris*. Initially, it was determined that the accumulation of biomass, is favored by including the yeast in YPD medium at pH 6. Subsequently, the growth rates were evaluated, according to pH and incubation temperature. The result showed that *Pichia pastoris* grows rapidly in YPD medium at pH 6 and 30 ° C. By increasing agitation rates of liquid cultures, cell growth is favored, to promote uniform nutrient consumption.

In induction of recombinant hEGF described under ambient conditions, an expression inhibition at pH 8 and 25 ° C it was obtained. Moreover, it couldn't determine a direct correlation of pH and temperature on the expression levels of the polypeptide, whereas the semi-quantitative estimate used by Western blot, issued no concrete results due to the lack of reproducibility of the method at laboratory.

Finally, a structural characterization human Epidermal Growth Factor with Liquid Chromatography coupled Mass Spectrometry was performed and using an deconvolution algorithm to optimize polypeptide relevant signals and remove noise.

The obtained results support the presence of human Epidermal Growth Factor in extracellular medium of *Pichia pastoris*.

Key Words: human Epidermal Growth Factor, *Pichia pastoris*, optimization.

1. INTRODUCCIÓN

El Factor de Crecimiento Epidérmico humano, hEGF por sus siglas en inglés, (human Epidermal Growth Factor) es un polipéptido de relevancia en la industria Farmacéutica y Cosmética, que se obtiene con herramientas de la tecnología del ADN recombinante enfocadas en la Ingeniería Genética. El interés terapéutico sobre esta macromolécula, radica en su capacidad para estimular la proliferación y regeneración de células epiteliales y tejidos epidérmicos. Además, posee una actividad inhibitoria sobre la secreción ácida gástrica en los seres humanos.

En años recientes, se han desarrollado productos terapéuticos innovadores que contienen hEGF. Entre estos, Heberprot® (CIHB), Hebermin® y Cimavaz EGF® (CIM), cuya actividad radica en la regeneración de tejidos epidérmicos y en la cicatrización óptima de úlceras, quemaduras y heridas profundas. Heberprot® ofrece una efectividad mayor al 65% en pacientes con Diabetes mellitus, al prevenir amputaciones consecuentes por el síndrome de Pie Diabético. Entre los cosméticos que contienen hEGF en su matriz, Bioeffect EGF Serum y el dispositivo Wrinkle Pen Eraser, promueven el rejuvenecimiento de la piel y evitan la progresión de los signos de la edad. Actualmente, el crecimiento de la demanda por el hEGF, ha contribuido a la ejecución de estrategias enfocadas en la optimización del rendimiento de esta macromolécula (Valdés, Mantilla, Márquez, Bonilla & otros, 2009).

El hEGF se ha producido en bacterias y levaduras como sistemas de expresión. Esta macromolécula, ha sido secretada eficientemente por levaduras hospederas como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Yarrowia lipolytica*. (Hyung, Soon, Kang, Rhee & Chung, 2005). Sin embargo, el hEGF que alcanza el mercado, normalmente se sintetiza en bacterias como *Escherichia Coli* (Ferrer, Domingo, Corchero, Vázquez, & Villaverde, 2009).

En este proyecto, inicialmente se evaluaron algunas estrategias que optimizan el crecimiento de una cepa CS115 de *P. pastoris*, cuyo genoma contenía inserto el gen que expresa el hEGF. Las variables a analizar durante este apartado fueron tasa de agitación (150 y 280 RPM), temperatura (25, 28 y 30°C) y pH (6, 7 y 8). Posteriormente, se realizó una inducción de la expresión del polipéptido recombinante con diferentes concentraciones de metanol (0.5 y 1%) para analizar los niveles de expresión obtenidos en cada ensayo. La determinación del polipéptido, se ejecutó por las técnicas SDS-PAGE, Western blot y LC-MS. Finalmente, los resultados obtenidos permitieron desarrollar criterios enfocados en el manejo del medio de cultivo de la levadura, que permitiera optimizar los procesos de producción del hEGF.

Como sistema de expresión, se utilizó *P. pastoris*, ya que en comparación con otros microorganismos hospederos, posee gran facilidad de manipulación, brinda

una relación favorable costo-beneficio durante la producción de Proteínas Recombinantes y ofrece mecanismos postransduccionales adecuados para el producto final, en caso que este sea destinado para uso humano. Además, proporciona altos rendimientos de proteínas heterólogas, secreta las macromoléculas de interés al medio extracelular en su forma soluble, posee una alta tasa de división celular y un índice bajo de secreción de proteínas nativas; lo que facilita la purificación de la proteína de interés. Estas características pueden aprovecharse para optimizar el rendimiento de un polipéptido recombinante de alta calidad (Invitrogen, 2010).

Este proyecto podría brindar una guía que permita el desarrollo de un protocolo a nivel de planta piloto que emplee a *P. pastoris* como sistema de expresión del hEGF y que garantice altos rendimientos del polipéptido recombinante.

Es necesario estandarizar y validar el procedimiento durante un posible escalamiento, considerando que no necesariamente los resultados que se obtienen durante la expresión de Proteínas Recombinantes a escala de laboratorio, son equivalentes en los protocolos a nivel de planta piloto.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1. Justificación del proyecto

Actualmente, los medicamentos Biotecnológicos son los más costosos que existen en el mercado Colombiano debido a regulaciones que hasta hace poco, impedían a la Industria Farmacéutica local desarrollar y producir muchos de ellos. Para suplir la demanda de este tipo de medicamentos, era necesario importarlos con un costo 10 veces mayor al invertido en desarrollo y producción. Como resultado, el sistema de Salud Pública estaba experimentando un deterioro económico, considerando que los Biotecnológicos son cubiertos con los recursos vía POS (PLAN obligatorio de salud) o vía recobros a través del Fosyga (Dirección de Medicamentos y Tecnologías, 2014).

En condiciones de competencia, los costos de los medicamentos Biotecnológicos podrían disminuir, en promedio, entre un 30% y un 60%. Si existieran por lo menos, dos competidores por cada uno de los 8 medicamentos más recobrados, el sistema se ahorraría alrededor de \$600.000.000 (Dirección de Medicamentos y Tecnologías, 2014).

El 18 de Septiembre del 2014, el Presidente Juan Manuel Santos y el Ministro de Salud Alejandro Gaviria presentaron el decreto de regulación de los Biotecnológicos en Colombia, donde se definen los lineamientos de registro y comercialización de estos medicamentos y de sus futuros competidores dentro del mercado: Los Fármacos Biosimilares (Ministerio de Salud y Protección Social, 2014).

Dado el inevitable aumento de competencia que se avecina por el vencimiento de patentes, el desarrollo y la producción de medicamentos Biotecnológicos en Colombia, contribuiría a la estabilización económica del Sistema de Salud Pública e incluso, se tendría la oportunidad de exportar a precios razonables para competir en el mercado con grandes Multinacionales Farmacéuticas (Dirección de Medicamentos y Tecnologías, 2014).

Por tal motivo, es necesario explorar las estrategias de Biología Molecular implicadas en la expresión y producción de Proteínas Recombinantes e impulsar la investigación para aportar conocimientos enriquecedores en la Industria Biotecnológica. Durante la producción de polipéptidos heterólogos se deben optimizar los costos, los beneficios ofrecidos por el sistema de expresión, la calidad de la macromolécula obtenida, su rendimiento y el tiempo invertido en los procesos de fabricación.

En este proyecto se plantea un protocolo para la producción del polipéptido hEGF en *P. pastoris*, que pueda ser adoptado y profundizado en futuras investigaciones para la producción en planta piloto.

2.2. Marco teórico y estado del arte

2.2.1. Generalidades de la producción de Proteínas Recombinantes.

Las Proteínas Recombinantes son macromoléculas que se obtienen por medio de la Ingeniería Genética, que involucra las técnicas del ADN Recombinante en organismos hospederos. Estos polipéptidos han adquirido gran importancia en las Ciencias Biológicas y Biomédicas, debido a su aplicación en la Biocatálisis, la Biorremediación, la Industria Farmacéutica y Alimentaria, entre otros campos (Gräslund, Nordlund, Weigelt, Hallberg, Bray & otros, 2011).

Debido al interés que se ha adquirido sobre las Proteínas Recombinantes y al elevado costo en el que actualmente se encuentran en el mercado, es de gran importancia ejecutar un proceso viable de producción de estas macromoléculas para disminuir los costos del producto final. Los inconvenientes que puedan surgir durante la producción de péptidos heterólogos se pueden resolver aplicando técnicas de Biología Molecular, manipulando el medio de cultivo del sistema de expresión y seleccionando un organismo hospedero alternativo (Palomares, Estrada & Ramírez, 2004).

Los niveles de producción de Proteínas Recombinantes en organismos hospederos dependen de variables que proporciona el ambiente de fermentación, como el pH, la temperatura, la velocidad de agitación, la cantidad de nutrientes y el flujo de aire, entre otros (Valdés, Mantilla, Márquez, Bonilla & otros, 2009).

2.2.2. Relevancia Terapéutica y Cosmética del Factor de Crecimiento Epidérmico humano (hEGF).

El Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), es un pequeño polipéptido de 53 aminoácidos con un peso molecular de 6.3 kDa que está presente en los mamíferos (Ver figura 9) (Martínez, 2003).

El EGF forma parte de una familia de péptidos relacionados, como el TGF- α , la anfirregulina y el factor similar al EFGF que se une a la heparina (HBEGF). Todos se caracterizan por tener una secuencia homóloga, por unirse al mismo receptor (EGFR) y por llevar a cabo funciones biológicas similares. Esta familia se sintetiza como propéptidos integrados en la membrana plasmática, con un dominio citoplasmático, una secuencia de transmembrana y un dominio extracelular, que contiene la secuencia del péptido maduro y que es liberado al medio por escisión proteolítica. La estructura madura de todos los péptidos relacionados con el EGF presenta una total conservación de 6 posiciones de cisteína que contribuyen al mantenimiento de la estructura terciaria de la proteína mediante la formación de 3 puentes disulfuro (Martínez Carpio, 2003).

El EGF fue aislado por primera vez en 1962 a partir de la glándula parótida de un ratón adulto por Cohen y Levi-Montalcini. Posteriormente, estos personajes

purificaron el hEGF proveniente de la orina humana (Hyung, Soon, Kang, Rhee & Chung, 2005). Cohen recibió en 1986 el premio Nobel de la Medicina en reconocimiento al descubrimiento de esta molécula y a la trascendencia de su estudio en las décadas de 1970 y 1980 (Martínez, 2003).

La actividad biológica del hEGF está mediada por uniones específicas al receptor EGF de membrana que posee una actividad tirosin kinasa intrínseca (Ver figura 10). Inicialmente, el rEGF se dimeriza y autofosforila, lo que conduce a la activación de algunas proteínas intracelulares reguladoras, entre las que se destacan fosfolipasas, proteincinasas y fosfatasas. La fosforilación de la fosfolipasa C-II, conduce a la activación de la proteincinasa C, que a su vez, activa la vía del inositol fosfato. El EGF podría inducir la diferenciación de las células de la granulosa por un mecanismo en el que está implicado el adenosín-monofosfato cíclico (AMPC) (Martínez Carpio, 2003).

La unión específica del hEGF a su receptor de membrana, conduce a la proliferación de células integradas en tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico, como queratinocitos, células musculares lisas de los vasos sanguíneos, condrocitos, hepatocitos, células foliculares de la tiroides, células de la granulosa, diferentes estirpes celulares de tejido mamario, glándulas lacrimales, glándulas de Brunner, células epiteliales y megacariocitos, así como en la mayoría de fluidos biológicos como el plasma, la saliva y la orina (Topczewska & Bolewska, 1993).

2.2.3. *Pichia pastoris* como sistema de expresión de Proteínas Recombinantes.

La mayoría de los sistemas de expresión usados para producir los 151 medicamentos recombinantes que hasta el año 2009 habían sido aprobados para uso humano por la Food and Drug Administration (FDA) y/o por la European Medicines Agency, (EMA) son bacterias o levaduras (Ferrer, Domingo, Corchero Vázquez & Villaverde, 2009).

Las levaduras son capaces de secretar proteínas recombinantes al medio extracelular y de realizar procesamientos postransduccionales típicos de las células presentes en los mamíferos. Sin embargo, las proteasas extracelulares y las diferencias en las glicosilaciones de las proteínas expresadas en levaduras comparadas con las de los mamíferos, limitan su uso (Ferrer, Domingo, Corchero Vázquez & Villaverde, 2009).

P. pastoris es una levadura metilotrófica, capaz de metabolizar metanol como su única fuente de carbono. El promotor del gen Alcohol Oxidasa I (*P-AOX1*) es el utilizado comúnmente para inducir la expresión de Proteínas Recombinantes en las levaduras de este género (Invitrogen, 2010). El *P-AOX1* ofrece altas tasas de transcripción y es un gen fácilmente regulable (Serrano González, 2005).

Phillips Petroleum, junto con su empresa subsidiaria Provesta, postularon a *P. pastoris* como sistema de expresión de proteínas heterólogas en 1983, debido a que en diferentes ensayos realizados con las levaduras, obtuvieron más de 150 g de peso seco de proteínas recombinantes por litro (Serrano González, 2005)

P. pastoris posee ventajas fundamentales con respecto a otros sistemas eucariotas de expresión. Como organismo hospedero, sobresale por su capacidad de plegar adecuadamente Proteínas Recombinantes y por ejecutar modificaciones postransduccionales útiles en el ámbito Farmacéutico. Además, es un sistema de expresión fácil de manipular, rápido, económico y ofrece altos niveles de expresión. Como levadura, comparte las ventajas de *S cerevisiae* con respecto a las manipulaciones moleculares y en algunos casos, ofrece niveles de expresión de proteínas heterólogas de 10 a 100 veces mayores (Invitrogen, 2010).

La principal ventaja de expresar proteínas heterólogas secretadas al medio extracelular en *P. pastoris*, es que esta levadura secreta niveles muy bajos de proteínas nativas. Por lo tanto, la macromolécula recombinante comprende la mayor porción proteica del medio (Sreekrishna, Brankamp, Kropp, Blankenship & otros, 1997).

Una potencial desventaja de este sistema de expresión, es que los transgenes son situados bajo el *P-AOX1*, el cual requiere de metanol para inducir la expresión de la proteína recombinante. Esto tiene tres implicaciones para el proceso.

1. Se requieren grandes tanques de metanol inflamable para facilitar la producción.
2. El metanol, que es tóxico, tiene que ser removido totalmente del producto final.
3. Se deben tener consideraciones especiales de alimentación con respecto al metanol para garantizar su continuo suplemento durante la etapa de inducción, pero evitando su acumulación hasta niveles inhibitorios de crecimiento.

Una alternativa para esta problemática, es el uso del promotor del gen *MEOX1*, que puede ser inducido por metanol o por glicerol (Invitrogen, 2010). Sin embargo, en este proyecto se utilizará el *P-AOX1* para inducir la expresión del hEGF en *P. pastoris*.

2.2.4. Producción de proteínas Recombinantes bajo la regulación del *P-AOX1* en *P. pastoris*, a una elevada densidad celular.

Muchos investigadores prestan especial atención a la optimización del entorno fisicoquímico para la producción eficiente de Proteínas Recombinantes, ajustando variables de gran impacto como lo son la concentración del agente inductor, la temperatura y el pH (Zhang, Hywood Potter, & Plantz, 2003).

La producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris* bajo el *P-AOX1*, requiere de una etapa inicial donde ocurre la acumulación de biomasa celular, alcanzando la fase de crecimiento estacionaria a través de la utilización de fuentes de carbono que poseen un efecto represor sobre la transcripción del *P-AOX1* como la glucosa. Posteriormente, se induce la expresión del polipéptido recombinante por la inclusión de metanol en el sistema (Serrano González, 2005).

Sin embargo, en el año 2011 Zhang, Wu y otros colaboradores; durante la producción del interferón alfa humano (cIFN) recombinante en *P. pastoris*, descubrieron que la alta tasa de crecimiento y la elevada densidad celular estaban relacionadas con la posible formación de cuerpos de inclusión por el incorrecto plegamiento de las Proteínas Recombinantes y con la reducción en los niveles de expresión (Wu, Chu, Wang, & Zhang, 2012).

Este inconveniente se presenta con mayor probabilidad en proteínas que para adquirir su estructura terciaria, requieren de la formación de puentes disulfuro, como es el caso del hEGF (Xu, Raden, Doyle, & Robinson, 2005).

Por lo anterior, durante la estandarización de una metodología de expresión de una Proteína Recombinante en *P. pastoris*, debe establecerse un equilibrio entre el nivel de expresión, la tasa de crecimiento y la densidad celular, que permita optimizar el protocolo empleado y garantice la calidad del producto final.

Para optimizar el tiempo invertido en esta investigación, se estudiaron los niveles de expresión del hEGF una vez se alcanzaba la fase de crecimiento estacionario; es decir, a una elevada densidad celular.

2.2.5. Herramientas empleadas en la determinación y caracterización de Proteínas Recombinantes.

Electroforesis en gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE).

Constituye uno de los métodos experimentales más potentes en la separación e identificación de proteínas. Esta técnica se usa ampliamente en campos como la Bioquímica, Genética, Biología Molecular y Ciencia Forense para separar polipéptidos de acuerdo a su movilidad electroforética, en función de su longitud, masa molecular y carga (Luo, 2004).

En esta técnica, se incorpora el SDS en la muestra que contiene a las proteínas, lo que promueve la denaturalización de sus estructuras secundarias y algunas terciarias. Además, el SDS constituye complejos con los polipéptidos, otorgándoles cargas negativas. Posteriormente, las macromoléculas se someten a campos eléctricos que promueven su movilidad a lo largo del gel de poliacrilamida. La distancia recorrida, depende del tamaño de la proteína blanco (Brunelle & Green, 2000).

El Sistema que compone al SDS-PAGE, es un coloide discontinuo con un gel de apilamiento en la parte superior y un gel de resolución en la fracción inferior. Ambos poseen diferentes pH y proporciones de poliacrilamida, permitiendo que las proteínas se movilizan desde una menor concentración, hacia una mayor, donde se lleva a cabo la separación. Los porcentajes de poliacrilamida se pueden optimizar con respecto al tamaño de las moléculas presentes en la muestra. Con proteínas estándar y marcadores peso molecular, se determinan las longitudes de los polipéptidos analizados (Brunelle & Green, 2000).

Inmunotransferencia de Western blot.

Constituye una poderosa herramienta semi-cuantitativa para estudiar la presencia, cantidad, masa molecular, interacción específica y las modificaciones postraduccionales de las proteínas (Kurien & Scofield, 2009). Esta técnica, combina la separación proteica de la electroforesis, con la inmunoespecificidad de los anticuerpos (Jin & Kennedy, 2015).

En una transferencia de Western, las proteínas inicialmente se separan por una electroforesis. Luego, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o PVDF activada, donde se incorpora una solución de bloqueo que evita el reconocimiento inespecífico de los anticuerpos. Posteriormente, se ejecuta la detección de las proteínas en un proceso de dos pasos. El primero consiste en la adición de un anticuerpo primario sobre la membrana, lo que conduce a su unión específica con el polipéptido. Tras retirar el anticuerpo primario residual, se añade un anticuerpo secundario, que reconoce una región específica del anticuerpo primario (Jin & Kennedy, 2015).

El anticuerpo secundario normalmente posee un indicador que le permite detectarse visualmente. Entre estos, las enzimas reporter, como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa del rábano (HRP), pueden revelarse por quimioluminiscencia (Jin & Kennedy, 2015).

La luz emitida por la quimioluminiscencia, es captada por una película fotográfica, donde se evidencia la presencia de las proteínas blanco. El espesor de la banda obtenida, es proporcional a la cantidad de proteína detectada (Jin & Kennedy, 2015).

Separación y detección de macromoléculas por LC-MS.

Un LC-MS consiste en un sistema de Cromatografía Líquida acoplado con un espectrómetro de masas. En esta técnica, inicialmente se separan los analitos en una matriz líquida, se obtienen los tiempos de retención inherentes a su polaridad y a su afinidad con la fase móvil y estacionaria. Posteriormente, los analitos se transfieren en una operación automatizada al espectrómetro de masas, donde se desolvatan y se ionizan. Los iones se filtran por su relación masa/carga (m/z) a

través de un detector, comúnmente un cuadrupolo. Luego, el sistema fotomultiplicador de detección los localiza para que la señal sea amplificada y digitalizada. Por el ajuste del voltaje en cada uno de los polos, se pueden filtrar y analizar una amplia gama de especies químicas con diferentes masas moleculares (Waters, 2006).

Esta técnica ofrece una fragmentación óptima de especies químicas, proporciona cromatogramas precisos que facilitan la cuantificación de los analitos, examina rápidamente muestras complejas y posee niveles de detección excepcionales (Waters, 2006).

El sistema acoplado UPLC-MS resulta de gran utilidad en la separación, detección y cuantificación de proteínas (Shafi & Shrivastava, 2013). Sin embargo, es difícil optimizar esta técnica en el estudio de polipéptidos por inconvenientes que se presentan durante su ionización, a sus complejas estructuras coloidales, a las matrices multiprotéicas robustas en las que normalmente se encuentran y a sus grandes tamaños moleculares (Berg, Axel, & Pettersen, 2006).

2.3. Objetivos.

2.3.1. Objetivo general.

Estandarizar una metodología que permita optimizar la producción del hEGF Recombinante en *Pichia pastoris*.

2.3.2. Objetivos específicos.

- Obtener un medio de cultivo óptimo para el crecimiento de la levadura *Pichia pastoris* Recombinante e inducir la expresión del hEGF con la inclusión de metanol en el sistema.
- Optimizar la producción del hEGF Recombinante con diferentes estrategias aplicadas al medio de cultivo de *Pichia pastoris*.
- Caracterizar el hEGF Recombinante, aplicando las técnicas de SDS-PAGE, Western blot y Espectrometría de Masas.

2.4. Metodología.

El procedimiento experimental se desarrolló en las instalaciones de la Universidad Icesi; específicamente, en los Laboratorios de la Doctora Zaida Lentini y del Doctor Federico Odreman. Además, se requirió acceso al cuarto oscuro y al Laboratorio de Instrumentación Química.

Durante los procesos de siembra, manipulación y toma de muestras, se debía garantizar la esterilidad del material que tuviera contacto directo con los medios de cultivo y con los microorganismos empleados, para evitar posibles interferencias en los resultados. Es por esto que se usó una cabina de flujo laminar tipo II para garantizar la esterilidad de las muestras durante su manipulación y una autoclave para esterilizar los reactivos y materiales de partida.

2.4.1. Preparación de reactivos.

Agar YPD: 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de glucosa, 2% de agar y 1M de sorbitol.

BMMY: 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, fosfato de potasio 100 mM a pH 6, 1% de biotina y 0.5 o 1% de metanol.

Caldo YPD: 1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa. Completar volumen con agua purificada y esterilizar en autoclave.

Destaining Solution: 50% de metanol y 10% de ácido acético glacial en agua purificada.

Loading Buffer: 400 μ L de DTT y 100 μ L de β -mercaptoetanol.

PBS 1X: Para elaborar 2 L, inicialmente se adicionan 16 g de NaCl en 1.6 L de agua purificada, con 0.4 g de KCl, 2.88 g de Na_2HPO_4 , 0.4 de KH_2PO_4 , se ajusta a pH 7.4, se completa el volumen a 2 L y finalmente se esteriliza por autoclave.

Resolving gel: Para elaborar 5 mL con una concentración de poliacrilamida del 10%, se adicionan 1.66 mL de acrilamida al 30%, 1.98 mL de agua purificada, 1.25 mL de Tris 1.5M a pH 8.8, 50 μ L de SDS al 10%, 50 μ L de APS al 10% y por último se incorporan 5 μ L de TEMED para iniciar la reacción de polimerización.

Running Buffer 5X a pH 8.35: Para elaborar 500 mL se adicionan 7.5 g de Tris, 36 g de glicina y 5 g de SDS en 400 mL de agua purificada. Finalmente, se ajusta el pH con NaOH 1N o HCL 1N.

Solución de bloqueo: 3% de BSA y 0.2% de Tween 20 en PBS 1X.

Solución de anticuerpo primario: 0.3% de BSA y 0.2% de Tween 20 en PBS 1X, luego, se incorpora el anticuerpo “Anti Rabbit IgG” hasta una concentración final de 1:2000. Este producto se encuentra disponible en BIO-RAD, en el catálogo Immun-Star™ AP Chemiluminescence Kits.

Solución de anticuerpo secundario: 0.3% de BSA y 0.2% de Tween 20 en PBS 1X, luego se incorpora el anticuerpo “Anti-Rabbit IgG (Whole molecule)-Peroxidase antibody produced in goat”, con actividad peroxidasa y capacidad de detección colorimétrica o quimioluminiscente. La dilución final es 1:5000. Este producto se encuentra disponible en BIO-RAD, en el catálogo Immun-Star™ AP Chemiluminescence Kits.

Stacking gel: Para elaborar 2 mL con una concentración de poliacrilamida del 4%, se adicionan 340 µL de acrilamida al 30%, 1.36 mL de agua purificada, 250 µL de Tris 0.5M a pH 6.8, 20 µL de SDS al 10%, 20 µL de APS al 10% y por último se incorporan 2 µL de TEMED para iniciar la reacción de polimerización.

Staining: 0.1% de azul de Coomassie R-250, 50% de metanol y 10% de ácido acético glacial en agua purificada.

Transfer Buffer 1X: En 1.6 L de agua purificada se incorporan 28.8 g de glicina, 6.04 g de Tris base, 200 mL de metanol y finalmente se completa el volumen a 2 L.

Tris 0.5 M a pH 6.8: Para elaborar 50 mL, se incorporan 3 g de Tris en el volumen correspondiente de agua purificada y se ajusta el pH con NaOH 1N o HCL 1N.

Tris 1.5M a pH 8.8: Para elaborar 150 mL, se incorporan 27 g de Tris en el volumen correspondiente de agua purificada y se ajusta el pH con NaOH 1N o HCL 1N.

2.4.2. Establecimiento de las condiciones para el crecimiento de *P. pastoris*.

Las levaduras empleadas como material de partida, se encontraban refrigeradas a 4°C. Se trataba de *P. pastoris* GS115, en una sub clasificación B 4.4. y B 5.1.

Luego de la esterilización del material, se adicionaron 20 mL de caldo YPD en Erlenmeyers de 100 mL y se incorporó una pequeña muestra de *P. pastoris*. Además, se inoculó un blanco para sustentar el control aséptico del proceso. Los recipientes fueron incubados en un agitador Shaker a 28°C y 150 RPM durante 30 horas. A continuación se presenta el número de ensayos realizados para cada muestra.

Tabla 1. *Ensayos realizados en los estudios iniciales de crecimiento de P. pastoris.*

| Ensayo | Muestra |
|---------------|----------------|
| 1 | B 4.4. |
| 2 | B 4.4. |
| 3 | B 4.4. |
| 4 | B 5.1. |
| 5 | B 5.1. |
| 6 | B 5.1. |

2.4.3. Reconocimiento de levaduras recombinantes de *P. pastoris* por antibióticos de selección.

Se prepararon diferentes diluciones del antibiótico de selección G418 (Geneticina) en caldo YPD y se transfirieron 9 mL a tubos Falcon estériles de 15 mL. En cada uno de los recipientes, se incorporó una pequeña muestra de *P. pastoris*.

Posteriormente, se realizaron frotis en las diluciones realizadas y se sembraron por el método de estría sobre Cajas Petri que contenían agar YPD.

Las Cajas Petri fueron incubadas a 28°C durante 30 horas. A continuación se presenta el número de ensayos realizados para cada muestra.

Tabla 2. *Ensayos realizados en la detección del gen de selección en levaduras recombinantes de P. pastoris.*

| Ensayo | Muestra | Concentración de G418 |
|---------------|----------------|------------------------------|
| 1 | B 4.4. | 0.2 mg/ml |
| 2 | B 4.4. | 0.4 mg/mL |
| 3 | B 5.1. | 0.2 mg/mL |

| | | |
|---|--------|-----------|
| 4 | B 5.1. | 0.4 mg/mL |
|---|--------|-----------|

2.4.4. Detección de las proteínas nativas en *P. pastoris* secretadas al medio extracelular por SDS-PAGE.

Para garantizar confiabilidad de los resultados obtenidos, este apartado se realizó por triplicado. En primera instancia, se realizaron algunos cultivos celulares como se describe en la sesión “Establecimiento de los cultivos iniciales para el crecimiento de *P. pastoris*” para contar con material de partida durante este análisis.

Elaboración de los geles de poliacrilamida.

Inicialmente, se instaló el sistema SDS-PAGE disponible en Bio-Rad. Al comprobar que no existían fugas en el montaje, se incorporó el Resolving Gel al 10%. Una vez polimerizado el gel, se retiró el agua destilada con papel adsorbente y se adicionó el Stacking Gel al 4%. Inmediatamente, se ubicó el peine en la parte superior del montaje para moldear los pozos de las muestras. Al alcanzar la polimerización del gel de apilamiento, se trasladó el sistema hacia la fuente de poder Bio-Rad.

Preparación y siembra de las muestras.

Se tomaron alícuotas con 500 μ L de las muestras y se incorporaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Los recipientes fueron introducidos en una centrífuga PowerSpin™ MX 8624, donde se realizó una separación a 5000 RPM durante 10 minutos.

Posteriormente, se colectaron alícuotas de 25 μ L del sobrenadante resultante y se mezclaron con 25 μ L de Loading Buffer en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Estos, se expusieron a una temperatura de 90°C durante 5 minutos y luego, se sembraron las muestras en cada uno de los pozos del sistema SDS-PAGE. Por último, se incorporó un marcador de peso molecular.

Corrido electroforético y revelado.

Inicialmente, se incubó el sistema SDS-PAGE en un baño con Running Buffer 1X y se conectó con su respectiva fuente de poder. Para comenzar con la corrida, se ajustó un voltaje constante de 100 V durante una hora.

Luego de la migración de las proteínas, el SDS-PAGE se incubó con staining solution durante dos horas. Posteriormente, se realizaron tres lavados del por diez minutos con destaining solution. Al finalizar, se incubó el gel obtenido en agua purificada para la visualización de las respectivas bandas.

2.4.5. Inmunotransferencia de Western blot en la detección de estándares hEGF.

Elaboración de los geles de Poliacrilamida, preparación de las muestras, siembra, corrido electroforético y revelado.

Este procedimiento se llevó a cabo de la misma forma mencionada en la sesión “Detección de las proteínas nativas en *P. pastoris* secretadas al medio extracelular por SDS-PAGE”. Sin embargo, el Resolving gel poseía una concentración de poliacrilamida del 15% para optimizar la separación del hEGF.

Además, se tomaron alícuotas con 5 μ L de cada estándar, se suspendieron en 20 μ L de agua purificada y se mezclaron con 15 μ L de Loading Buffer para su posterior siembra en los pozos del sistema SDS-PAGE. A continuación, se presenta el número de ensayos realizados durante este apartado.

Tabla 3. Estándares de hEGF empleados para su detección por Western blot.

| Ensayo | Muestra |
|--------|----------------------------|
| 1 | rhEGF |
| 2 | hEGF a pH 4 |
| 3 | hEGF a pH 7.4 |
| 4 | Marcador de peso molecular |

Transferencia en Western blot.

Luego del corrido electroforético, se retiró el gel del sistema SDS-PAGE y se transfirió a un papel filtro de transferencia Bio-Rad. Este complejo, fue empapado con Running Buffer 1X y sobre la fracción libre del coloide, se situó una membrana de PVDF previamente activada en metanol. Posteriormente, se tomó otro papel filtro, se humedeció en Running Buffer 1X y se incorporó sobre la membrana. Se retiraron las burbujas del sistema multicapa con un rodillo y finalmente se introdujo el ensamblaje en el Sandwich de transferencia Bio-Rad. El montaje se incorporó en un Baño con Transfer Buffer 1X y se conectó con su respectiva fuente de poder, que se ajustó a 60 mA durante 12 horas, para complementar la transferencia.

Revelado por quimioluminiscencia.

Con la inmunotransferencia completa, se retiró la membrana del ensamblaje y se incubó con solución de bloqueo en un agitador Shaker a 150 RPM y temperatura

ambiente durante tres horas. Posteriormente, se retiró la solución de bloqueo y se introdujo el anticuerpo primario anti-hEGF disponible en BIO.RAD; el sistema se incubó durante 12 horas a 150 RPM y temperatura ambiente. Luego de retirar el anticuerpo primario y realizar cinco lavados durante diez minutos con PBS y Tween 20 al 0.2%, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario durante dos horas. Finalmente, se ejecutaron cinco lavados con PBS y Tween 20 al 0.2% y se condujo la membrana de PVDF al cuarto oscuro de la Universidad Icesi.

El revelado consistió en la exposición inicial de la membrana con la solución de fluorescencia. Luego, se mitigó la luz de la habitación para visualizar la reacción de quimioluminiscencia y para exponer la membrana al Film durante 5, 10 o 20 segundos. Por último, se situó el Film en el equipo Revelador SRX-101A, que permitió la visualización de los polipéptidos hEGF.

2.4.6. Inducción de la expresión del hEGF en *P. pastoris*.

Este apartado, se llevó a cabo por duplicado para sustentar la validez de los resultados obtenidos.

En primera instancia, se realizaron algunos cultivos celulares como se describe en la sesión “Establecimiento de los cultivos iniciales para el crecimiento de *P. pastoris*” para contar con material de partida durante este análisis.

Luego, se tomaron alícuotas con 1 mL de muestra y se incorporaron en Erlenmeyers de 25 mL con 5 mL de caldo BMMY. Los recipientes fueron incubados en un agitador Shaker a 150 RPM y 28°C, durante 26 horas.

Posteriormente, se ejecutó el procedimiento descrito en la sesión “Inmunotransferencia de Western blot en la detección de estándares hEGF” para revelar el polipéptido blanco.

2.4.7. Optimización de la expresión del hEGF en *P. pastoris*.

Inicialmente, se ejecutó una curva de crecimiento celular, estimando la densidad óptica de los cultivos líquidos cada hora con un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10S a 600 nm, hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionaria. Las condiciones incubación en el agitador Shaker fueron 28°C y 150 RPM.

A continuación se presenta el número de ensayos realizados durante este apartado.

Tabla 4. *Ensayos realizados en la determinación de la curva de crecimiento de *P. pastoris* a 28°C y 150 RPM.*

| Ensayo | Muestra |
|---------------|----------------|
|---------------|----------------|

| | |
|---|--------|
| 1 | B 4.4. |
| 2 | B 4.4. |
| 3 | B 5.1. |
| 4 | B 5.1. |

Además, se inoculó un blanco para sustentar el control aséptico del proceso. Los cultivos se realizaron en Erlenmeyers de 100 mL con 30 mL de caldo YPD y una alícuota de 2 mL con Levaduras en suspensión.

Posteriormente, se realizaron las curvas de crecimiento de *P. pastoris* a diferentes pH y temperaturas, con una agitación de 280 RPM. Luego que todos los sistemas alcanzaran su fase estacionaria de crecimiento, Se sometieron a una separación en una centrifuga PowerSpin™ MX 8624 a 4000 RPM durante 10 minutos.

Las células fueron suspendidas en 5 mL de caldo BMMY, en este caso, con diferentes concentraciones de metanol como agente inductor. Las 16 muestras y los 2 blancos (a pH 6 y 8), fueron incubados durante 55 horas en un agitador Shaker a 28°C y 280 RPM. A continuación se presenta el número de ensayos realizados durante este apartado.

Tabla 5. *Ensayos realizados en la determinación de las curvas de crecimiento de P. pastoris a diferentes pH y temperaturas, con una tasa de agitación de 280 RPM.*

| Ensayo | Muestra | pH | Temperatura (°C) | Concentración de metanol (%) |
|--------|---------|----|------------------|------------------------------|
| 1 | B 4.4. | 8 | 30 | 0.5 |
| 2 | B 4.4. | 8 | 30 | 1 |
| 3 | B 5.1. | 8 | 30 | 0.5 |
| 4 | B 5.1. | 8 | 30 | 1 |
| 5 | B 4.4. | 6 | 25 | 0.5 |
| 6 | B 4.4. | 6 | 25 | 1 |
| 7 | B 5.1. | 6 | 25 | 0.5 |
| 8 | B 5.1. | 6 | 25 | 1 |

| | | | | |
|----|--------|---|----|-----|
| 9 | B 4.4. | 6 | 30 | 0.5 |
| 10 | B 4.4. | 6 | 30 | 1 |
| 11 | B 5.1. | 6 | 30 | 0.5 |
| 12 | B 5.1. | 6 | 30 | 1 |
| 13 | B 4.4. | 8 | 25 | 0.5 |
| 14 | B 4.4. | 8 | 25 | 1 |
| 15 | B 5.1. | 8 | 25 | 0.5 |
| 16 | B 5.1. | 8 | 25 | 1 |

Posteriormente, se realizó el tratamiento correspondiente a la sesión “Inmunotransferencia de Western blot en la detección de estándares hEGF” para analizar los niveles de expresión en cada muestra de la tabla 5.

Además, se ejecutó una transferencia de Western blot con diferentes concentraciones del estándar hEGF para facilitar la estimación semi-cuantitativa de los analitos. A continuación se presentan las cantidades correspondientes del estandar empleado.

Tabla 6. *Concentraciones del estandar hEGF empleadas para su detección por transferencia de Western blot.*

| Ensayo | Cantidad de hEGF (ng) |
|--------|-----------------------|
| 1 | 357 |
| 2 | 534 |
| 3 | 712 |
| 4 | 1000 |
| 5 | 1400 |

2.4.8. Análisis de datos por Minitab 17, Stat Graphics Centurion, MATLAB 8.5. y Microsoft Excel 2010.

Inicialmente, se desarrolló un diseño experimental con Minitab 17 para estimar las diferencias en la biomasa celular obtenida en la fase de crecimiento estacionaria para cada ensayo presentado en la tabla 5. Se empleó un modelo lineal general 2^3 con dos repeticiones, seguido de una separación de medias por Fisher. Los tratamientos a evaluar fueron pH, temperatura y sub-división (B 4.4. y B 5.1.).

Luego, se determinó la tasa de crecimiento de *P. pastoris* en cada ensayo presentado en la tabla 5, con el Software Stat Graphics Centurion; donde se realizó una equiparación estadística de las pendientes obtenidas en la fase de crecimiento exponencial. Para realizar el estudio, se seleccionó la opción “comparación de las líneas de regresión”.

Con algunos datos, se esquematizaron comportamientos de las variables evaluadas usando Microsoft Excel 2010.

Finalmente, se empleó el Software Mat Lab 8.5., donde se diseñó un gráfico de superficies que relacionara el efecto de la temperatura, el pH y la muestra empleada (B 4.4. y B 5.1.) sobre la densidad óptica en la fase de crecimiento estacionaria.

2.4.9. Caracterización del hEGF por LC-MS.

Inicialmente, se desarrollaron seis cultivos celulares según la sesión “Establecimiento de los cultivos iniciales para el crecimiento de *P. pastoris*”.

Posteriormente, se trasladó 1 mL de cada muestra en tubos Eppendorf de 1.5 mL hacia el Laboratorio de Instrumentación Química para su respectiva separación y caracterización estructural. El tratamiento de las muestras consistió en su homogenización con un Vórtex, seguida de una filtración por un tamaño de poro de 0.2 μm y finalmente una sonicación de 5 minutos.

Las muestras y el estandar se introdujeron en el equipo UPLC. Posteriormente se ajustaron los parámetros de separación cromatográfica. Entre ellos, se emplearon dos fases móviles; acetonitrilo con 0.1% de TFA y agua purificada con 0.1% de TFA. La fase estacionaria consistía en una columna ACQUITY UPLC C18 con 2.1 nm de diámetro, 100 mm de largo y un tamaño de poro de 138 Å. La temperatura de la columna fue 40°C. El gradiente inicial de elución se ajustó 0.35 mL/min. Las longitudes de onda de detección eran 214 y 280 nm y el volumen de inyección de la muestra fue 1 μL .

Las condiciones de ionización del masas fueron ESI⁺, los voltajes del capilar y del cono se ajustaron a 3.50 y 65 V, respectivamente y las temperaturas de desolvatación de la muestra y del cono fueron 650 y 15°C.

2.4.10. Matriz del marco lógico.

Tabla 7. Matriz del marco lógico.

| Objetivo General | | | |
|--|---|---|---|
| Estandarizar una metodología que permita optimizar la producción del hEGF Recombinante en <i>Pichia pastoris</i> . | | | |
| Objetivo específico | Actividades | Indicadores | Supuestos |
| Obtener un medio de cultivo óptimo para el crecimiento de la levadura <i>Pichia pastoris</i> Recombinante e inducir la expresión del hEGF con la inclusión de metanol en el sistema. | <ul style="list-style-type: none"> -Revisión bibliográfica. -Realizar un cultivo con los nutrientes apropiados. -Incorporar las levaduras recombinantes de <i>P. pastoris</i> en el medio de cultivo. -Mantener una aireación, temperatura de incubación y condiciones nutricionales óptimas. -Estudiar las condiciones de crecimiento y expresión. -verificar la presencia del hEGF. | <ul style="list-style-type: none"> -Por densidad óptica se determina la presencia de levaduras en el medio de cultivo. -El péptido hEGF en su forma soluble es detectado en el medio extracelular por medio de las técnica SDS-PAGE y Western blot. | <ul style="list-style-type: none"> -Se dispone de suficiente información de fuentes bibliográficas confiables acerca de la metodología. -Recolectar el péptido en la fase estacionaria de crecimiento de <i>P. pastoris</i>. -Se mantiene una aireación, temperatura y condiciones nutricionales óptimas en el sistema de expresión. |
| Optimizar la producción del | -Seleccionar específicamente las | -Es posible determinar el | -Disponibilidad de reactivos y |

| | | | |
|--|---|--|--|
| <p>hEGF recombinante con diferentes estrategias aplicadas al medio de cultivo empleado.</p> | <p>condiciones bajo las cuales se realizará el estudio.</p> <ul style="list-style-type: none"> -Modificar condiciones ambientales como el pH, la temperatura de incubación y la tasa de agitación. -Estudiar los niveles de expresión con las diferentes condiciones de crecimiento. -Estudiar los niveles de expresión con diferentes cantidades de inductor. | <p>péptido hEGF con SDS-PAGE y Western blot.</p> | <p>servicios.</p> <ul style="list-style-type: none"> -Recolectar el péptido en la fase estacionaria de crecimiento de <i>P. pastoris</i>. -Evitar depleción de nutrientes e inductores de la expresión del péptido hEGF. -Verificar que el crecimiento celular no ocasiona un efecto inhibitorio en la producción del hEGF recombinante. -No se presenta proteólisis del polipéptido hEGF. -Se adiciona la cantidad óptima de inductor en el medio de cultivo. -Se obtiene un rendimiento mayor del hEGF en condiciones ambientales específicas. |
| <p>Caracterizar el hEGF Recombinante, aplicando las técnicas de SDS-PAGE, Western blot y Espectrometría de</p> | <ul style="list-style-type: none"> -Revisión bibliográfica. -Determinar métodos de caracterización. -Ejecutar el procedimiento de | <p>Durante la caracterización, se obtienen resultados que pueden correlacionarse con un estándar</p> | <ul style="list-style-type: none"> -Disponibilidad del servicio. -Disponibilidad de los equipos y reactivos. -Disponibilidad de |

| | | | |
|--------|--|-----------|--------------|
| Masas. | <p>SDS-PAGE para detectar el hEGF.</p> <p>-Ejecutar la determinación del polipéptido con la técnica Western blot.</p> <p>-Detectar el péptido en el medio extracelular con la técnica UPLC-ESI-MS-SQ2.</p> | del hEGF. | un estándar. |
|--------|--|-----------|--------------|

2.5. Resultados.

2.5.1. Reconocimiento de levaduras recombinantes de *P. pastoris* por antibióticos de selección.

Tabla 8. Resultados obtenidos en el desarrollo de cultivos de *P. pastoris* con antibiótico de selección G418 en agar YPD a 28°C.

| Ensayo | Muestra | Concentración de G418 | Resultado |
|--------|---------|-----------------------|-----------|
| 1 | B 4.4. | 0.2 mg/mL | Positivo |
| 2 | B 4.4. | 0.4 mg/mL | Positivo |
| 3 | B 5.1. | 0.2 mg/mL | Positivo |
| 4 | B 5.1. | 0.4 mg/mL | Positivo |

A continuación, se esquematizan los resultados reportados en la tabla 8.

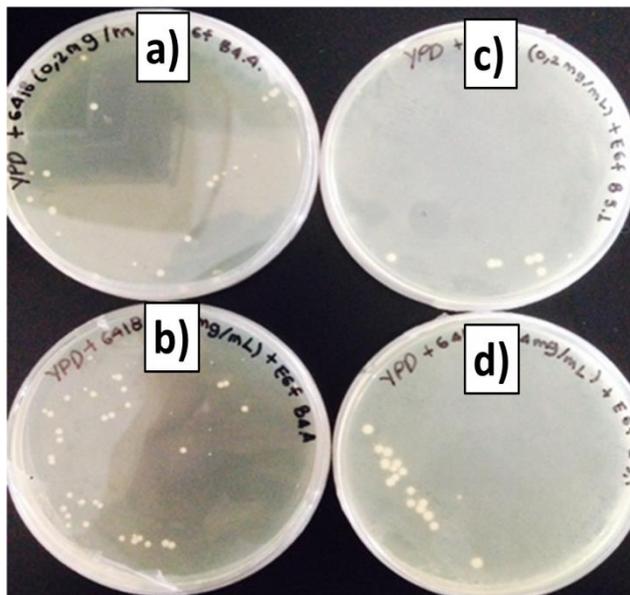


Figura 1. Desarrollo de los cultivos de *P. pastoris* con antibiótico de selección en agar YPD a 28°C. a) B 4.4. con G418 0.2mg/mL. b) B 4.4. con G418 0.4 mg/mL. c) B 5.1. con G418 0.2 mg/mL. d) B. 5.1. con G418 0.4 mg/mL.

Esta sesión, sustenta la presencia de levaduras recombinantes de *P. pastoris*, cuyo genoma contiene inserto el gen que expresa al hEGF.

2.5.2. Detección de las proteínas nativas en *P. pastoris* secretadas al medio extracelular por SDS-PAGE.

A continuación, se presenta uno de los tres geles de poliacrilamida teñidos con coomassie desarrollados para detectar las proteínas de *P. pastoris* secretadas. En todos los ensayos, se obtuvieron resultados idénticos.

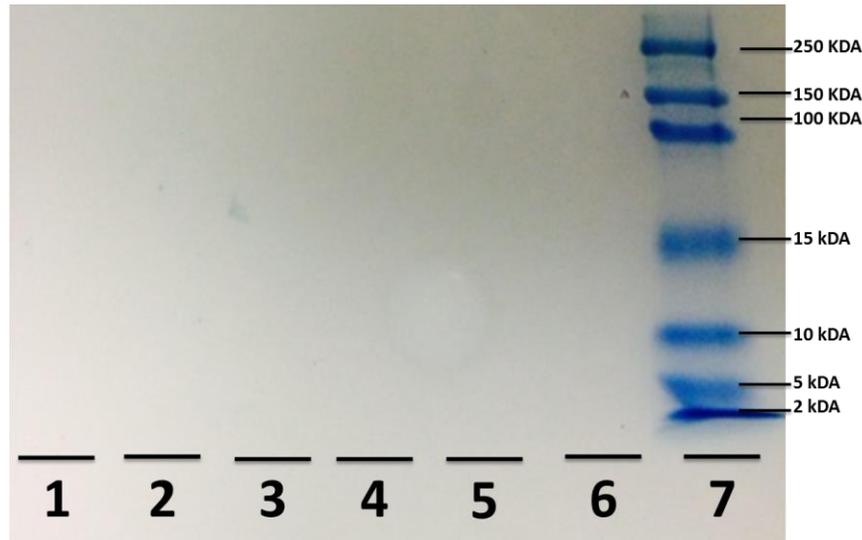


Figura 2. Determinación de las proteínas de *P. pastoris* nativas que son secretadas al medio extracelular, por SDS-PAGE. Los carriles corresponden a: 1) B 4.4., 2) B 4.4., 3) B 4.4., 4) B 5.1., 5) B 5.1., 6) B 5.1. y 7) Marcador de peso molecular.

Como se evidencia en la figura 2, no se detectaron proteínas extracelulares. Más que por la ausencia de polipéptidos extracelulares, este resultado sustenta que la concentración de ellos es demasiado baja y requiere de su determinación por técnicas más sensibles.

2.5.3. Inmunotransferencia de Western blot en la detección de estándares hEGF.

Luego de la transferencia de los estándares del hEGF en membranas de PVDF, se obtuvieron señales positivas que indican la hibridación del anticuerpo primario con el polipéptido recombinante, que posee un tamaño aproximado de 6 kDa. El tiempo de exposición de la membrana con el Film durante el revelado, fue de 5 segundos para optimizar la señal.

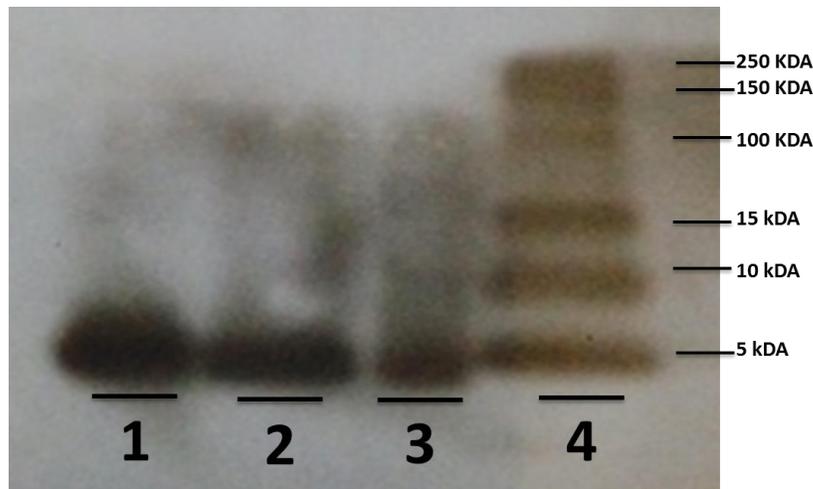


Figura 3. Transferencia de Western blot en membrana de PVDF para la detección de estándares hEGF. Las señales corresponden a: 1) rhEGF, 2) hEGF a pH 4, 3) hEGF a pH 7.4 y 4) Marcador de peso molecular.

2.5.4. Inducción de la expresión del hEGF en *P. pastoris*.

El hEGF en el medio extracelular no pudo detectarse por la técnica SDS-PAGE a pesar que la electroforesis se realizó por triplicado. Esto podría indicar que la concentración del polipéptido recombinante en el medio extracelular es demasiado baja y requiere de su detección por técnicas más sensibles.

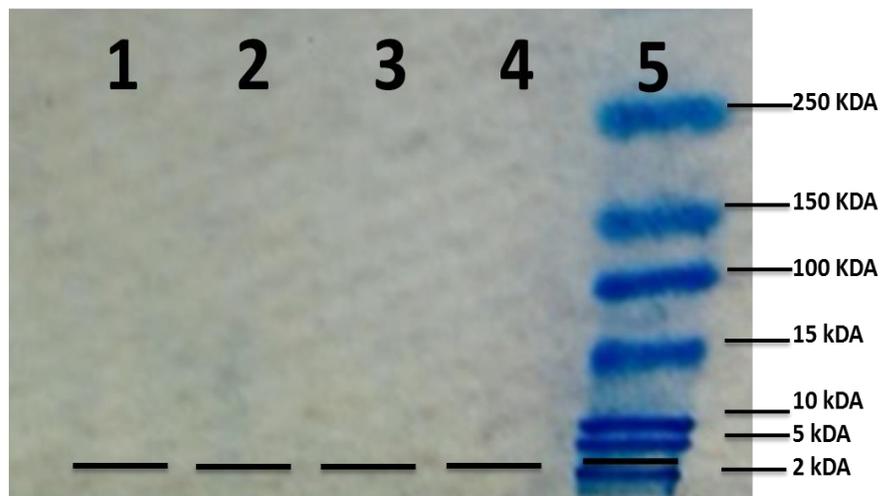


Figura 4. Determinación del hEGF en el medio extracelular de *P. pastoris*, luego de la inducción con 0.5% de metanol (%v/v) en BMMY por SDS-PAGE. Los carriles corresponden a: 1) B 4.4., 2) B 4.4., 3) B 5.1., 4) B 5.1. y 5) Marcador de peso molecular.

Durante la inmunotransferencia por Western blot, se preparó una solución de bloqueo con 0.3% de BSA (%p/v), lo que condujo a la unión inespecífica de los

anticuerpos en la superficie de la membrana de PVDF y al enmascaramiento de las señales correspondientes al hEGF, como se evidencia a continuación.

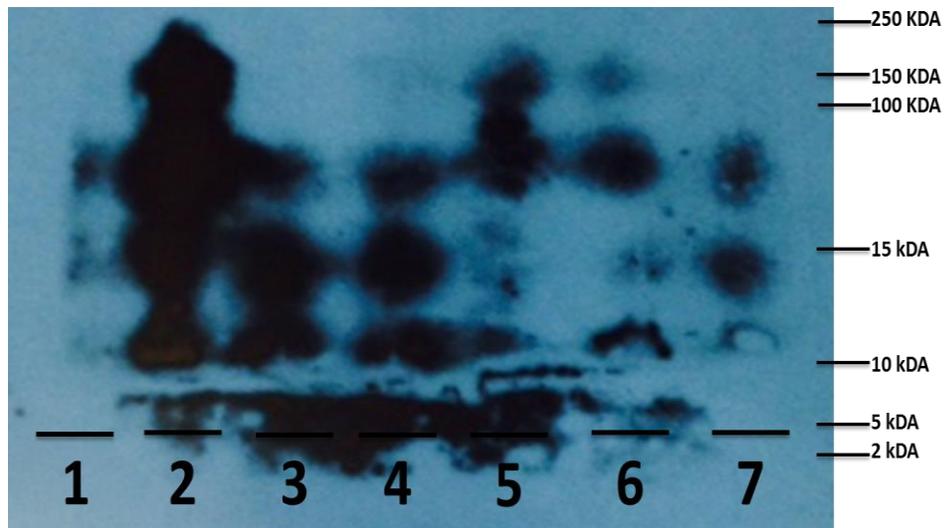


Figura 5. Transferencia de Western blot en membrana de PVDF para la detección del hEGF en el medio extracelular de *P. pastoris* luego de la inducción con 0.5% de metanol (%v/v) en BMMY. La solución de bloqueo empleada contenía 0.3% de BSA (%p/v). Las señales corresponden a: 1) B 4.4., 2) B 4.4., 3) B 4.4., 4) B 5.1., 5) B 5.1., 6) B 5.1. y 7) Marcador de peso molecular.

Posteriormente, se elaboró una solución de bloqueo con 3% de BSA. Luego de la inmunotransferencia, se obtuvo el siguiente resultado.

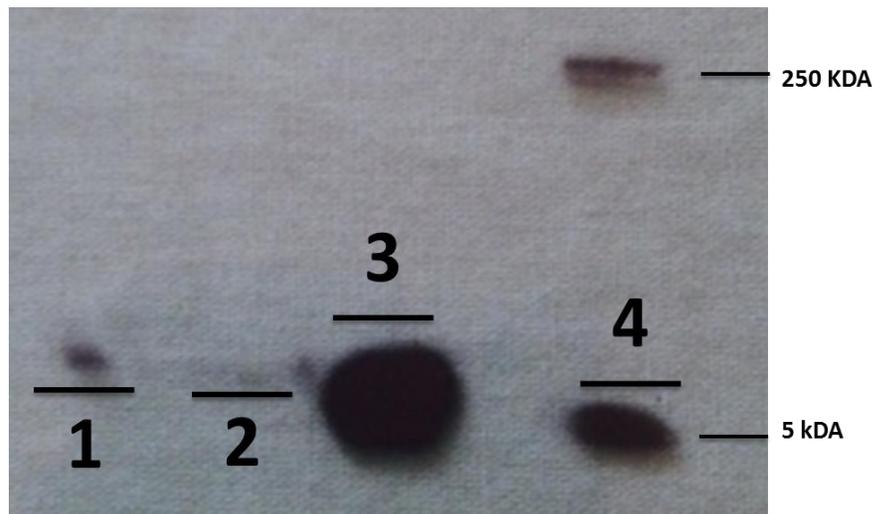
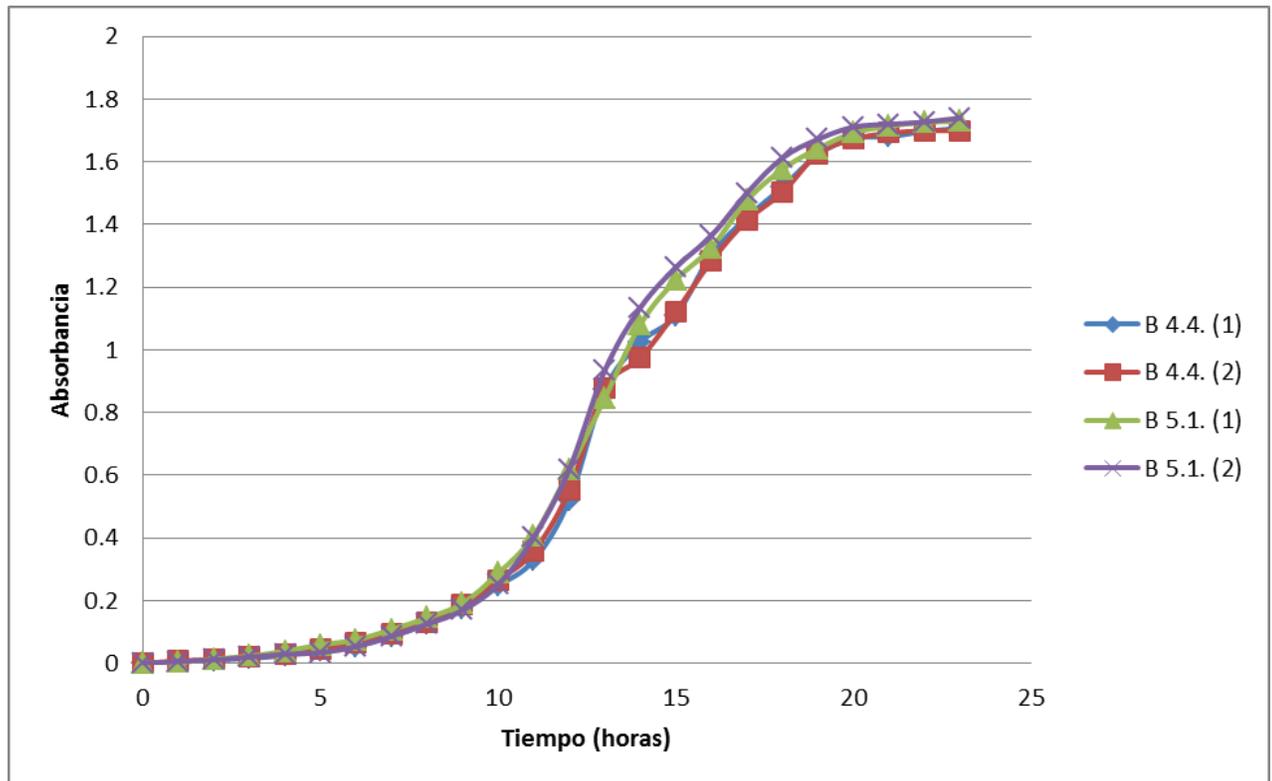


Figura 6. Transferencia de Western blot en membrana de PVDF para la detección del hEGF en el medio extracelular de *P. pastoris* luego de la inducción con 0.5% de metanol (%v/v) en BMMY. La solución de bloqueo empleada contenía 3% de BSA (%p/v). Las señales corresponden a: 1) B 4.4., 2) B 5.1., 3) Estandar hEGF y 4) Marcador de peso molecular.

En la figura 6, se evidencian las señales que indican la hibridación específica del anticuerpo primario con el polipéptido recombinante hEGF, de aproximadamente 6 kDA. Sin embargo, sus niveles de expresión son bajos con respecto a la señal emitida por el estándar hEGF, cuya concentración es 5µg/mL.

2.5.5. Optimización de la producción del hEGF en *P. pastoris*.

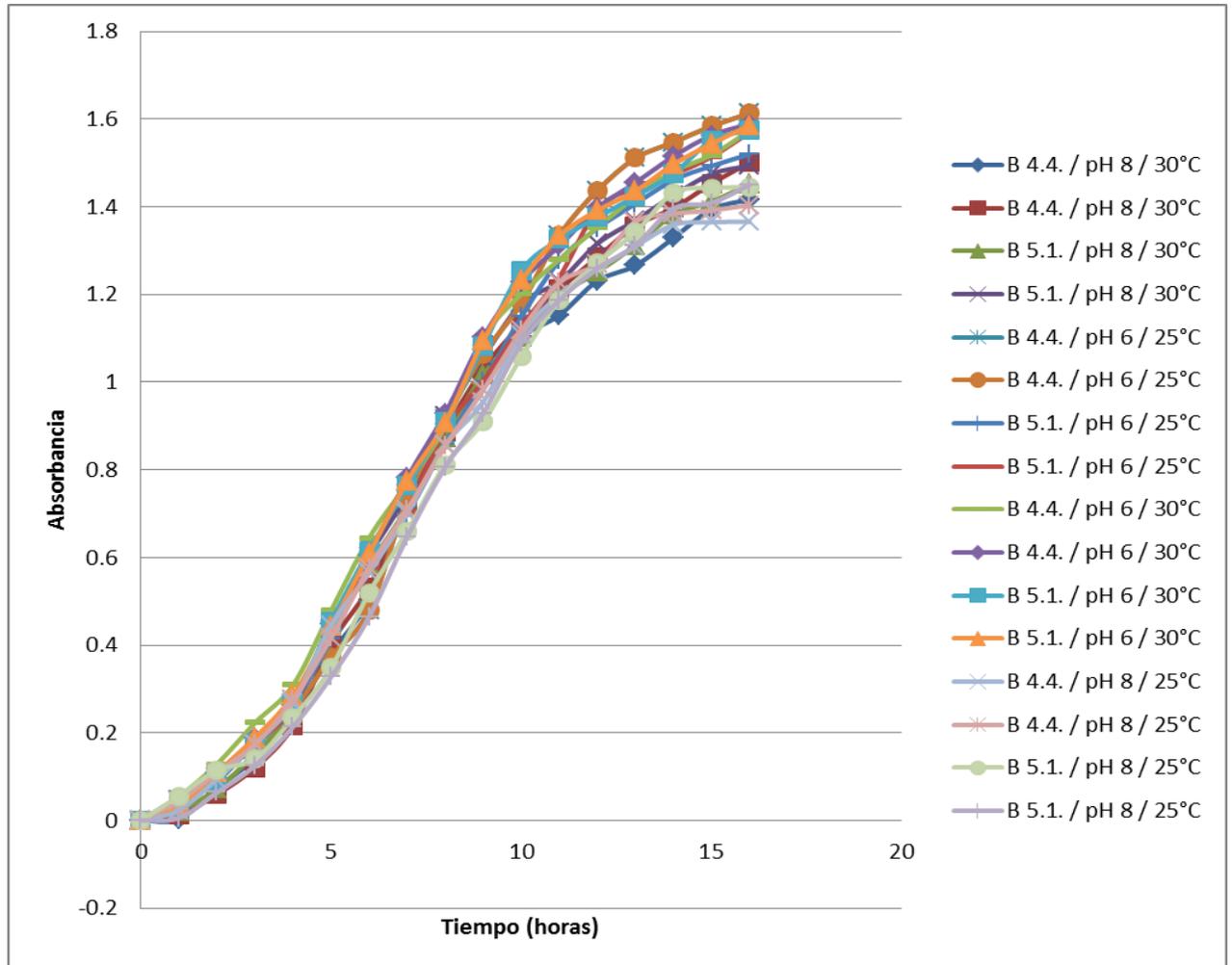
La densidad óptica detectada a 600 nm, es directamente proporcional a la concentración de *P. pastoris* en un tiempo determinado. A continuación se presentan las curvas de crecimiento obtenidas experimentalmente.



Gráfica 1. Curva de crecimiento de *P. pastoris* en caldo YPD a 28°C, pH 7 y 150 RPM. 1) Fase Lag (0-10 horas). 2) Fase exponencial (11-18 horas). 3) Fase estacionaria (19-23 horas).

En la gráfica 1, se presenta una Fase Lag prolongada de aproximadamente 10 horas debido al acoplamiento gradual de *P. pastoris* en el medio de cultivo. Posteriormente, se evidencia una Fase exponencial en un periodo de 7 horas, seguida de una Fase estacionaria que inicia a las 19 horas de incubación, bajo las condiciones ambientales descritas.

Posteriormente, se desarrollaron 16 curvas de crecimiento para encontrar las condiciones ambientales que optimizan la tasa de división y la densidad óptica de *P. pastoris*, aplicando los tratamientos de la tabla 5.



Gráfica 2. Curva de crecimiento de *P. pastoris* en caldo YPD a 25 y 30°C, pH 6 y 8 y 280 RPM.

En la gráfica 2, se presenta una ligera Fase Lag contribuida por la alta tasa de agitación de los sistemas, al favorecer la homogeneidad, la oxigenación y el contacto de *P. pastoris* con los nutrientes del medio. Posteriormente, se alcanza una Fase Exponencial en todos los ensayos luego de 5 o 6 horas de incubación. Después de 16 horas, todos los sistemas habrían alcanzado una Fase Estacionaria de crecimiento.

Con los datos obtenidos en las curvas de crecimiento de la gráfica 2, se desarrolló un diseño experimental con el Software Minitab 17 para determinar si existen

diferencias estadísticamente relevantes en las densidades celulares con respecto a los tratamientos empleados para cada ensayo, luego de 16 horas de incubación.

Optimización de la concentración celular.

Inicialmente se empleó un modelo lineal general 2^3 con dos repeticiones, seguida de una separación de medias por Fisher. Los tratamientos a evaluar fueron pH, temperatura y sub-división de *P. pastoris*.

Tabla 9. Modelo lineal general diseñado en Minitab 17 para determinar los tratamientos que maximizan la densidad celular de *P. pastoris*, luego de 16 horas de incubación.

| Factor | Niveles | Valores |
|--------------|---------|-----------------|
| Sub-división | 2 | B 4.4. y B 5.1. |
| pH | 2 | 6 y 8 |
| Temperatura | 2 | 25 y 30 |

Tabla 10. ANOVA diseñado en Minitab 17 para determinar los tratamientos que afectan la densidad celular de *P. pastoris*, luego de 16 horas de incubación.

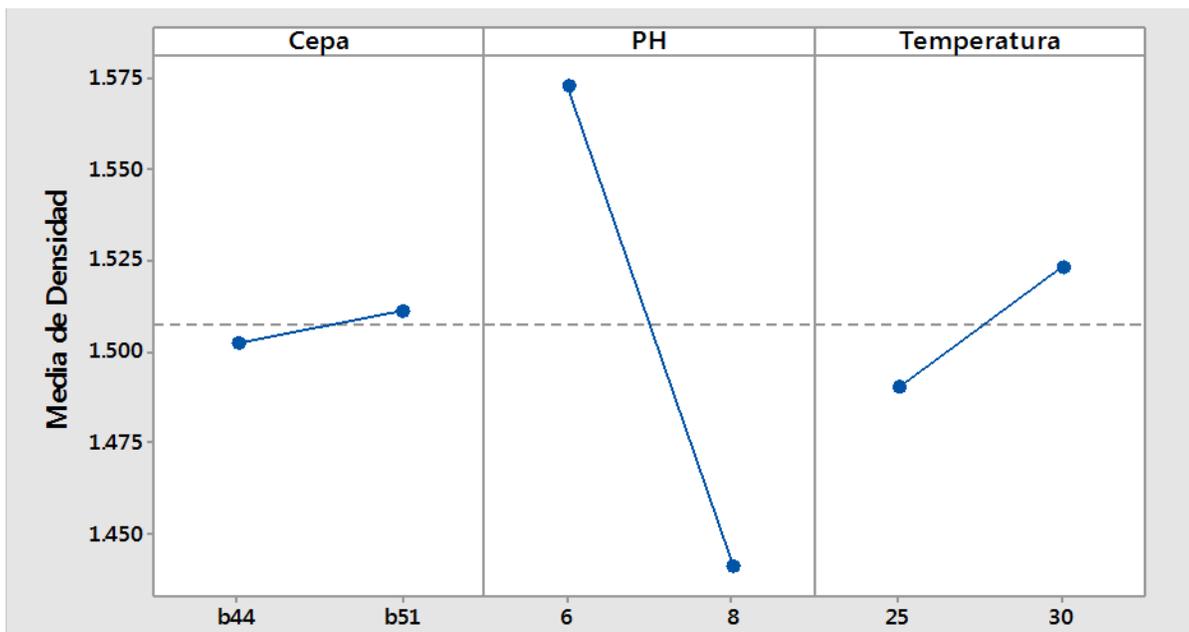
| Factores | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p | Criterio |
|-----------------------------|----|-----------|-----------|---------|---------|-----------|
| Sub-división | 1 | 0.000306 | 0.000306 | 0.31 | 0.595 | Igual |
| pH | 1 | 0.069960 | 0.069960 | 9.83 | 0.000 | Diferente |
| Temperatura | 1 | 0.004290 | 0.004290 | 4.28 | 0.072 | Igual |
| Sub-división*pH | 1 | 0.003481 | 0.003481 | 3.47 | 0.099 | Igual |
| Sub-división*Temperatura | 1 | 0.000016 | 0.000016 | 0.02 | 0.903 | Igual |
| pH*Temperatura | 1 | 0.001156 | 0.001156 | 1.15 | 0.314 | Igual |
| Sub-división*pH*Temperatura | 1 | 0.001980 | 0.001980 | 1.98 | 0.197 | Igual |

| | | | | |
|--------------|----|----------|----------|--------|
| Error | 8 | 0.008015 | 0.001002 | Iguals |
| Total | 15 | 0.089205 | | Iguals |

Para cada uno de los factores, la hipótesis nula plantea que todas las medias son iguales y por lo tanto, la concentración celular es independiente del tratamiento empleado durante el crecimiento. Por otra parte, la hipótesis alterna indica que la concentración celular depende al menos de uno de los tratamientos descritos, lo que se sustenta con la diferencia estadística entre las medias.

En la tabla 10 se evidencia con un 95% de confianza, que la concentración celular obtenida luego de 16 horas de incubación es dependiente del pH del medio de cultivo pero independiente de la subdivisión de *P. pastoris* y de la temperatura de incubación. Adicionalmente, no se evidencian interacciones entre los tratamientos descritos, que consigan un efecto estadísticamente relevante en la concentración celular.

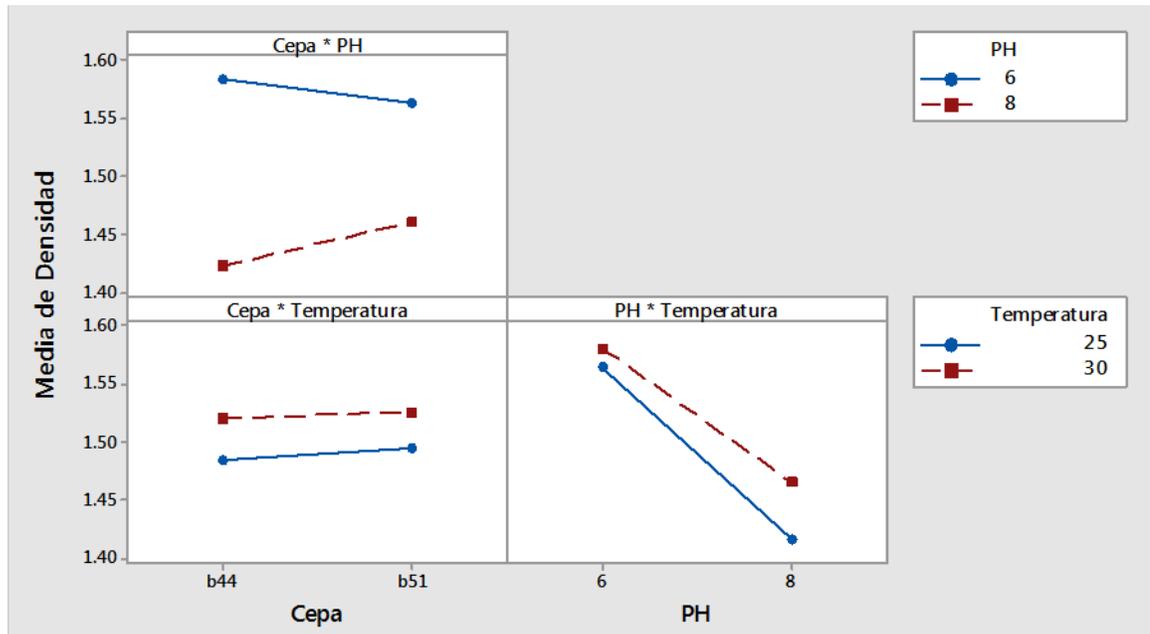
La interpretación gráfica de los resultados obtenidos en el diseño experimental, se presenta a continuación.



Gráfica 3. Influencia de la sub-división de *P. pastoris*, el pH y la temperatura, sobre la concentración celular. Método de medias ajustadas.

La gráfica 3 sustenta que el pH es la variable que proporciona una concentración celular de *P. pastoris* estadísticamente diferente, luego de 16 horas de incubación.

De esta forma, se maximiza la respuesta cuando el medio de cultivo está a pH 6 y la densidad óptica es menor a pH 8.



Gráfica 4. Influencia de la interacción entre la sub-división de *P. pastoris*, el pH y la temperatura, sobre la concentración celular. Método de medias ajustadas.

Las pendientes obtenidas en la gráfica 4 poseen inclinaciones similares y no se cruzan en ninguno de sus puntos. Este comportamiento indica que no existe alguna interacción entre la sub-división de *P. pastoris*, el pH y la temperatura, sobre la concentración celular, luego de 16 horas de incubación.

A continuación, se presenta una comparación por el método LSD de Fisher con una confianza del 95%, que relaciona los efectos de la sub-división de *P. pastoris*, el pH y la temperatura, sobre la concentración celular, luego de 16 horas de incubación.

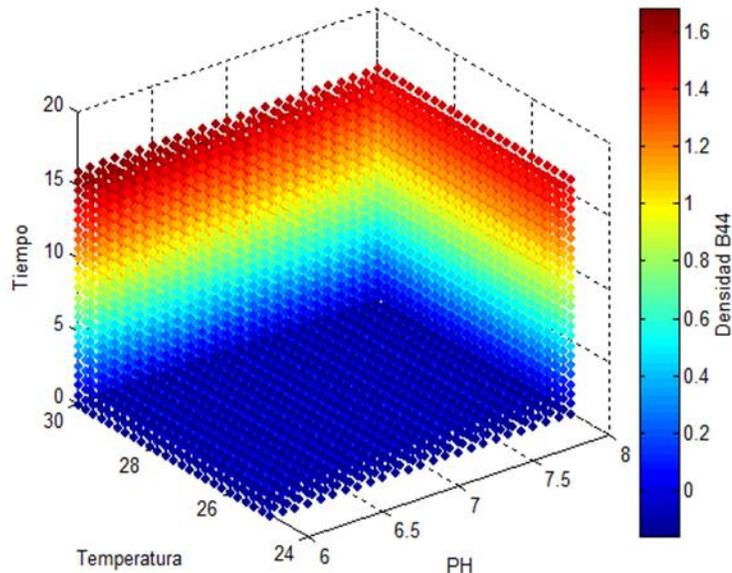
Tabla 11. Comparación por parejas de las medias de Fisher, para estimar la dependencia de la concentración celular con la sub-división de *P. pastoris*, el pH y la temperatura de incubación.

| Sub-división | pH | Temperatura | N | Media | Agrupación |
|--------------|----|-------------|---|--------|------------|
| B 4.4. | 6 | 25 | 2 | 1.5860 | A |
| B 4.4. | 6 | 30 | 2 | 1.5815 | A |

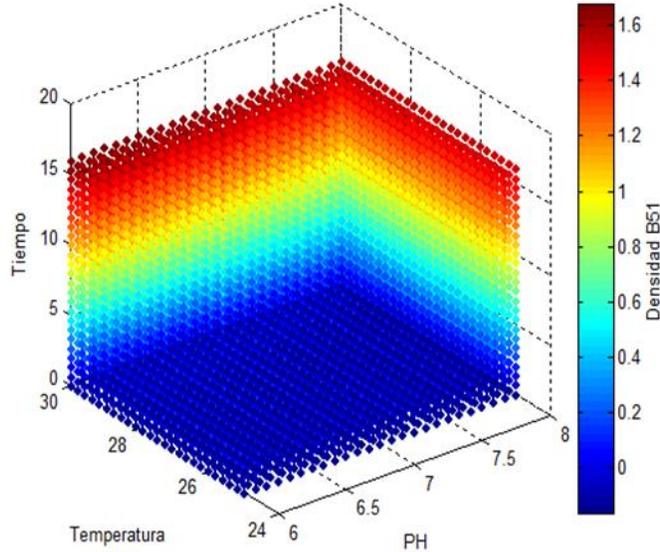
| | | | | | |
|---------------|---|----|---|--------|-----|
| B 5.1. | 6 | 30 | 2 | 1.5810 | A |
| B 5.1. | 6 | 25 | 2 | 1.5450 | A |
| B 5.1. | 8 | 30 | 2 | 1.4730 | B C |
| B 4.4. | 8 | 30 | 2 | 1.4590 | C |
| B 5.1. | 8 | 25 | 2 | 1.4475 | C D |
| B 4.4. | 8 | 25 | 2 | 1.3850 | D |

Las medias que no comparten letra de agrupación son significativamente diferentes. Los tratamientos clasificados con la letra A, correspondientes a un pH 6 de crecimiento, ofrecieron mayores concentraciones celulares. Por otra parte, los denotados bajo las letras C y D, presentaron menor biomasa.

A continuación, se presenta un diseño de superficies desarrollado en MATLAB 8.5, en el cual se relaciona la concentración celular con el pH y la temperatura para cada sub-división de *P. pastoris*, luego de 16 horas de incubación.



Gráfica 5. Representación de superficies obtenida en MATLAB 8.5 para evaluar la densidad óptica en función del tiempo, la temperatura y el pH, en una subdivisión de *P. pastoris* B 4.4.



Gráfica 6. Representación de superficies obtenida en MATLAB 8.5 para evaluar la densidad óptica en función del tiempo, la temperatura y el pH, en una subdivisión de *P. pastoris* B 5.1.

Ambas representaciones evidencian que los niveles de pH y temperatura evaluados, no generan una acción inhibitoria alarmante sobre la concentración celular obtenida, luego de 16 horas de incubación. La biomasa resulta inherente al tiempo, debido a que los tratamientos evaluados, no simbolizan amenaza o toxicidad celular.

Optimización de la tasa de crecimiento celular.

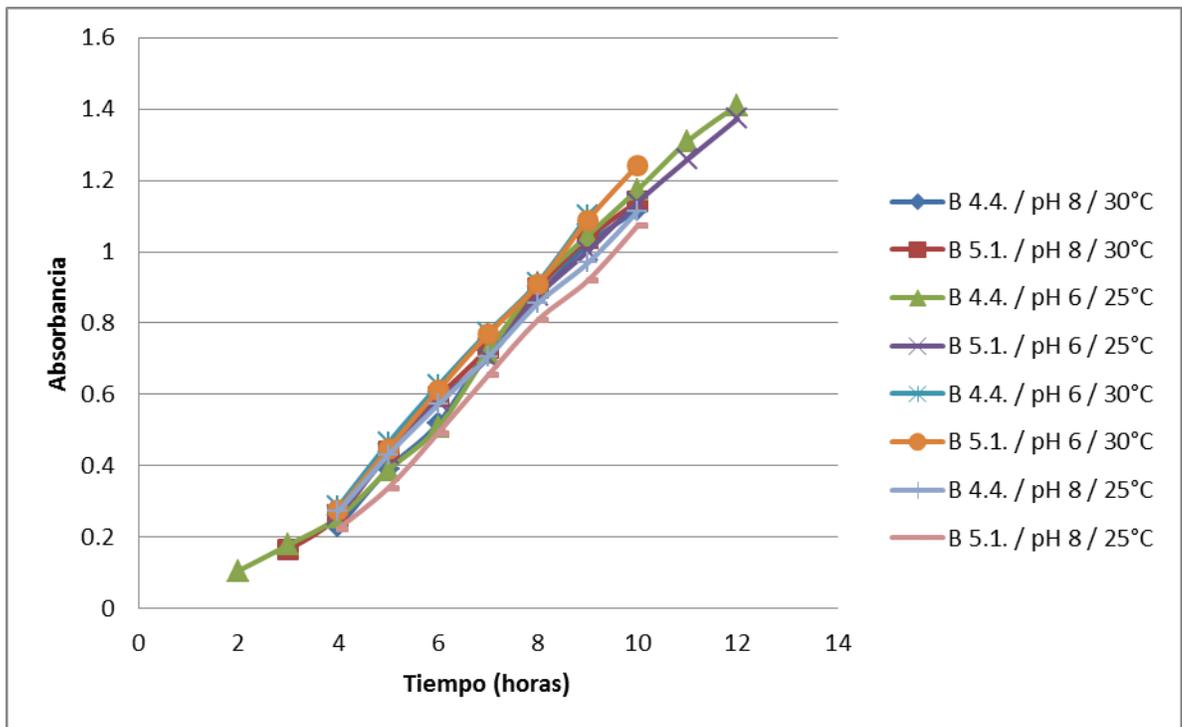
Durante este apartado, fue necesario promediar las repeticiones de cada ensayo evidenciado en la curva de crecimiento de la gráfica 2. Finalmente, se obtuvieron 8 tratamientos. Para garantizar confiabilidad estadística de los resultados, se calcularon las desviaciones estandar. Ningún valor, fue superior a 0.08.

Tabla 12. Desviaciones estandar de cada tratamiento empleado para la construcción de las curvas de crecimiento de *P. pastoris*.

| Tiempo (h) | B 4.4. pH 8 30°C | B 5.1. pH 8 30°C | B 4.4. pH 6 25°C | B 5.1. pH 6 25°C | B 4.4. pH 6 30°C | B 5.1. pH 6 30°C | B 4.4. pH 8 25°C | B 5.1. pH 8 25°C |
|------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 0 | 0.007 | 0.013 | 0.004 | 0.007 | 0.020 | 0.011 | 0.022 | 0.029 |

| | | | | | | | | |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0.000 | 0.004 | 0.011 | 0.000 | 0.031 | 0.008 | 0.007 | 0.006 |
| 2 | 0.018 | 0.001 | 0.013 | 0.004 | 0.035 | 0.002 | 0.011 | 0.007 |
| 3 | 0.022 | 0.004 | 0.014 | 0.002 | 0.045 | 0.003 | 0.023 | 0.018 |
| 4 | 0.025 | 0.006 | 0.008 | 0.011 | 0.052 | 0.002 | 0.017 | 0.014 |
| 5 | 0.008 | 0.023 | 0.025 | 0.019 | 0.041 | 0.019 | 0.042 | 0.014 |
| 6 | 0.013 | 0.001 | 0.016 | 0.010 | 0.048 | 0.016 | 0.014 | 0.010 |
| 7 | 0.013 | 0.008 | 0.018 | 0.004 | 0.011 | 0.002 | 0.016 | 0.020 |
| 8 | 0.008 | 0.023 | 0.001 | 0.017 | 0.001 | 0.013 | 0.024 | 0.025 |
| 9 | 0.007 | 0.015 | 0.020 | 0.005 | 0.018 | 0.002 | 0.003 | 0.042 |
| 10 | 0.013 | 0.040 | 0.004 | 0.022 | 0.000 | 0.026 | 0.016 | 0.051 |
| 11 | 0.035 | 0.011 | 0.032 | 0.033 | 0.002 | 0.005 | 0.002 | 0.029 |
| 12 | 0.031 | 0.033 | 0.033 | 0.023 | 0.011 | 0.001 | 0.013 | 0.020 |
| 13 | 0.057 | 0.027 | 0.049 | 0.019 | 0.003 | 0.002 | 0.018 | 0.008 |
| 14 | 0.041 | 0.018 | 0.047 | 0.002 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 |
| 15 | 0.035 | 0.031 | 0.033 | 0.008 | 0.012 | 0.016 | 0.003 | 0.005 |
| 16 | 0.052 | 0.016 | 0.034 | 0.028 | 0.009 | 0.004 | 0.005 | 0.033 |

Posteriormente, se seleccionó el fragmento de cada curva correspondiente a la fase de crecimiento exponencial, que se caracteriza por presentar un comportamiento lineal.



Gráfica 7. Fase de crecimiento exponencial de *P. pastoris* bajo los tratamientos indicados.

Los datos de la gráfica 7, fueron introducidos en Stat Graphics Centurion, utilizando la opción “comparación de las líneas de regresión” para establecer la diferencia estadística entre las pendientes. Cabe aclarar que la magnitud del valor de la pendiente, es proporcional a la tasa de división celular. A continuación, se evidencian los resultados obtenidos.

Tabla 13. ANOVA adicional para variables según el orden de introducción.

| Fuente | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado medio | Razón F | Valor P |
|-------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Tiempo | 7.31601 | 1 | 7.31601 | 9127.52 | 0.0000 |
| Interceptos | 0.0756911 | 7 | 0.010813 | 13.49 | 0.0000 |
| Pendientes | 0.0166295 | 7 | 0.00237564 | 2.96 | 0.0119 |
| Modelo | 7.40833 | 15 | | | |

Como el valor P de las pendientes es menor que 0.05, existen diferencias estadísticas en las tasas de crecimiento de *P. pastoris*, con un nivel de confianza del 95%.

A continuación se presenta en orden decreciente, la tasa de división celular en función de la sub-división de *P. pastoris*, la temperatura y el pH.

Tabla 14. Comparación estadística de pendientes para estimar la influencia de cada tratamiento descrito, sobre la tasa de división celular de *P. pastoris*.

| Tratamiento | Pendiente | Agrupación |
|--------------------|-----------|------------|
| B 5.1., pH 6, 30°C | 0.159857 | A |
| B 4.4., pH 6, 30°C | 0.159343 | A |
| B 4.4., pH 8, 30°C | 0.152929 | A |
| B 5.1., pH 8, 30°C | 0.145583 | A |
| B 5.1., pH 8, 25°C | 0.143768 | B C |
| B 4.4., pH 6, 25°C | 0.141045 | B C |
| B 5.1., pH 6, 25°C | 0.138933 | C |
| B 4.4., pH 8, 25°C | 0.138643 | C |

Las medias que no comparten letra de agrupación son significativamente diferentes. Los tratamientos que maximizan la respuesta de crecimiento están agrupados con la letra A y se obtienen cuando la temperatura de incubación es 30°C y el pH del medio es 6, independiente de la sub-división de *P. pastoris* empleada. La tabla 14 sugiere que cuando la temperatura del sistema es 25°C, la tasa de crecimiento celular es menor.

Expresión del hEGF obtenido en la fase de crecimiento estacionaria de *P. pastoris*.

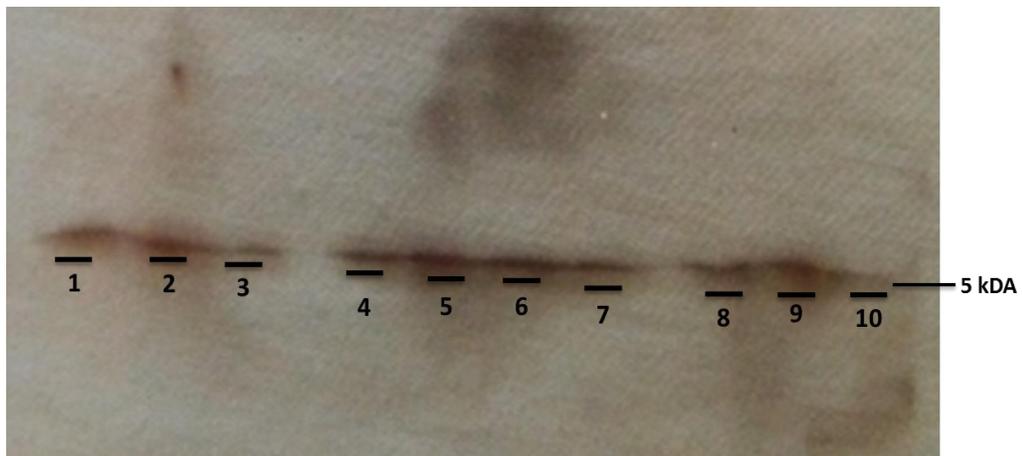


Figura 7. Transferencia de Western blot en membrana de PVDF para la detección del hEGF durante la optimización de su expresión en *P. pastoris*. Las señales corresponden a los tratamientos: 1) B 4.4. a pH 8 y 30°C, 2) B 4.4. a pH 8 y 30°C, 3) B 5.1. a pH 8 y 30°C, 4) B 5.1. a pH 8 y 30°C, 5) B 4.4. a pH 6 y 25°C, 6) B 4.4. a pH 6 y 25°C, 7) B 5.1. a pH 6 y 25°C, 8) B 5.1. a pH 6 y 25°C, 9) Estándar hEGF y 10) Marcador de peso molecular.

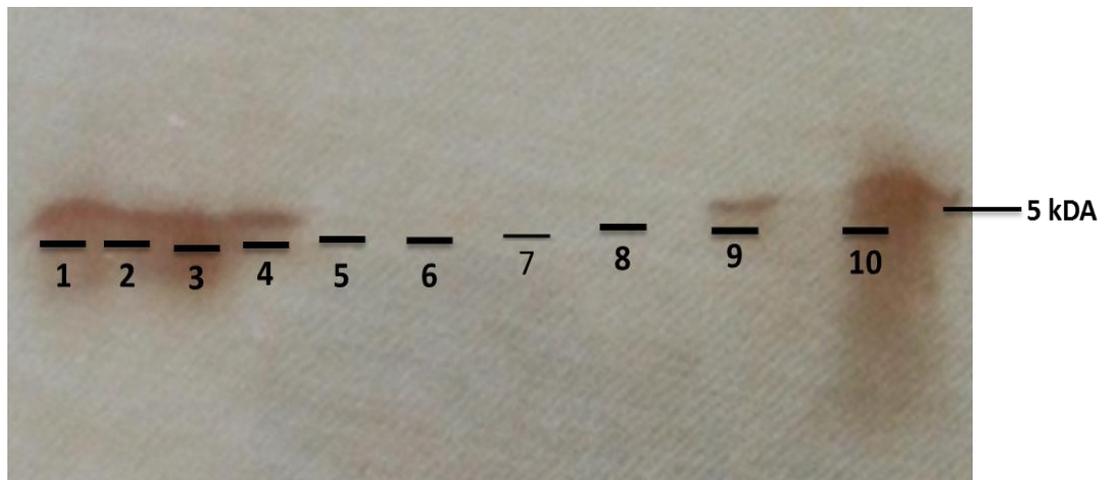


Figura 8. Transferencia de Western blot en membrana de PVDF para la detección del hEGF durante la optimización de su expresión en *P. pastoris*. Las señales corresponden a los tratamientos: 1) B 4.4. a pH 6 y 30°C, 2) B 4.4. a pH 6 y 30°C, 3) B 5.1. a pH 6 y 30°C, 4) B 5.1. a pH 6 y 30°C, 5) B 4.4. a pH 8 y 25°C, 6) B 4.4. a pH 8 y 25°C, 7) B 5.1. a pH 8 y 25°C, 8) B 5.1. a pH 8 y 25°C, 9) Estándar hEGF y 10) Marcador de peso molecular.

El tiempo de exposición de cada membrana de PVDF con el Film, fue 5 segundos para optimizar la señal.

Para realizar un seguimiento semi-cuantitativo de la expresión del hEGF en los ensayos de la tabla 5, se desarrolló un Western blot con las concentraciones de estandar hEGF descritas en la tabla 6. Sin embargo, los resultados de la transferencia por Western blot resultaron alterados y contaminados en varias

ocasiones. Algunas radiografías obtenidas en el proceso se presentan a continuación.

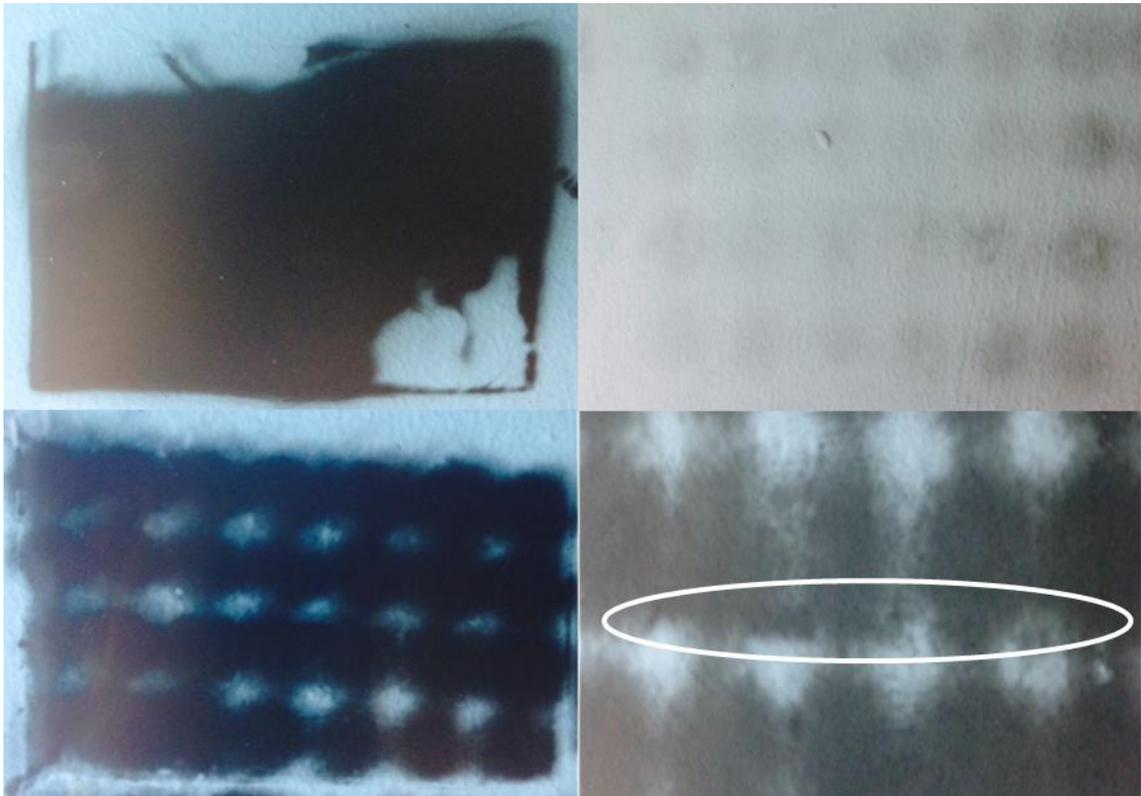


Figura 9. Inconvenientes obtenidos en la transferencia de Western blot sobre membrana de PVDF para la realización de la curva del estandar hEGF. 1) Insuficiencia de bloqueo de la membrana. 2) Contaminación de la membrana y enmascaramiento de las bandas. El tiempo de exposición de la membrana con el Film fue 5 segundos. 3). Contaminación de la membrana y enmascaramiento de las bandas. El tiempo de exposición de la membrana con el Film fue 10 segundos. 4) Zoom del ensayo 3), donde se evidencia la unión del anticuerpo primario al hEGF.

Con los resultados obtenidos, resulta difícil estimar los niveles de expresión del hEGF en *P. pastoris*. Primero, porque las bandas en las figuras 7 y 8 no tienen diferencias visuales significativas que permita establecer criterios sobre la optimización de la expresión. En segundo lugar, las inmunotransferencias evidenciadas en la figura 9 resultaron contaminadas o insuficientemente bloqueadas, dificultando la comparación semi-cuantitativa entre las muestras y los estándares.

A continuación se presenta un resumen de los resultados ilustrados en las figuras 7 y 8.

Tabla 15. Evaluación de los niveles de expresión del hEGF recombinante en *P. pastoris* y su dependencia con las condiciones de crecimiento descritas.

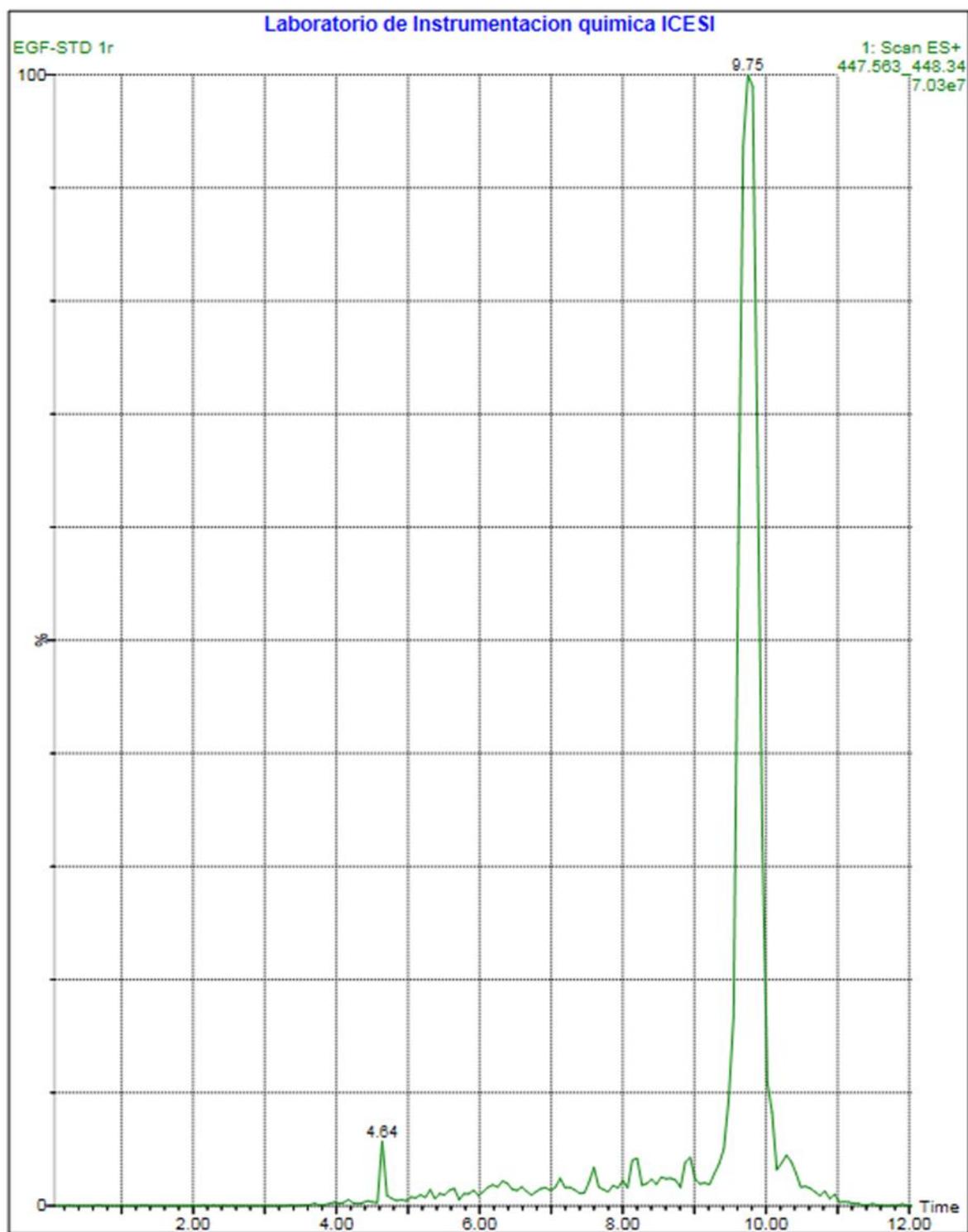
| Ensayo | Tratamiento | Expresión del hEGF |
|--------|--------------------|--------------------|
| 1 | B 4.4., pH 8, 30°C | Positiva |
| 2 | B 4.4., pH 8, 30°C | Positiva |
| 3 | B 5.1., pH 8, 30°C | Positiva |
| 4 | B 5.1., pH 8, 30°C | Positiva |
| 5 | B 4.4., pH 6, 25°C | Positiva |
| 6 | B 4.4., pH 6, 25°C | Positiva |
| 7 | B 5.1., pH 6, 25°C | Positiva |
| 8 | B 5.1., pH 6, 25°C | Positiva |
| 9 | B 4.4., pH 6, 30°C | Positiva |
| 10 | B 4.4., pH 6, 30°C | Positiva |
| 11 | B 5.1., pH 6, 30°C | Positiva |
| 12 | B 5.1., pH 6, 30°C | Positiva |
| 13 | B 4.4., pH 8, 25°C | Negativa |
| 14 | B 4.4., pH 8, 25°C | Negativa |
| 15 | B 5.1., pH 8, 25°C | Negativa |
| 16 | B 5.1., pH 8, 25°C | Negativa |

Los resultados evidenciados en la tabla 15, señalan que la expresión del hEGF no es inhibida por elevadas concentraciones de *P. pastoris* en el medio, ni por su alta tasa crecimiento. Por otra parte, a pH 8 y 25°C, se presenció una inhibición de la expresión del polipéptido recombinante.

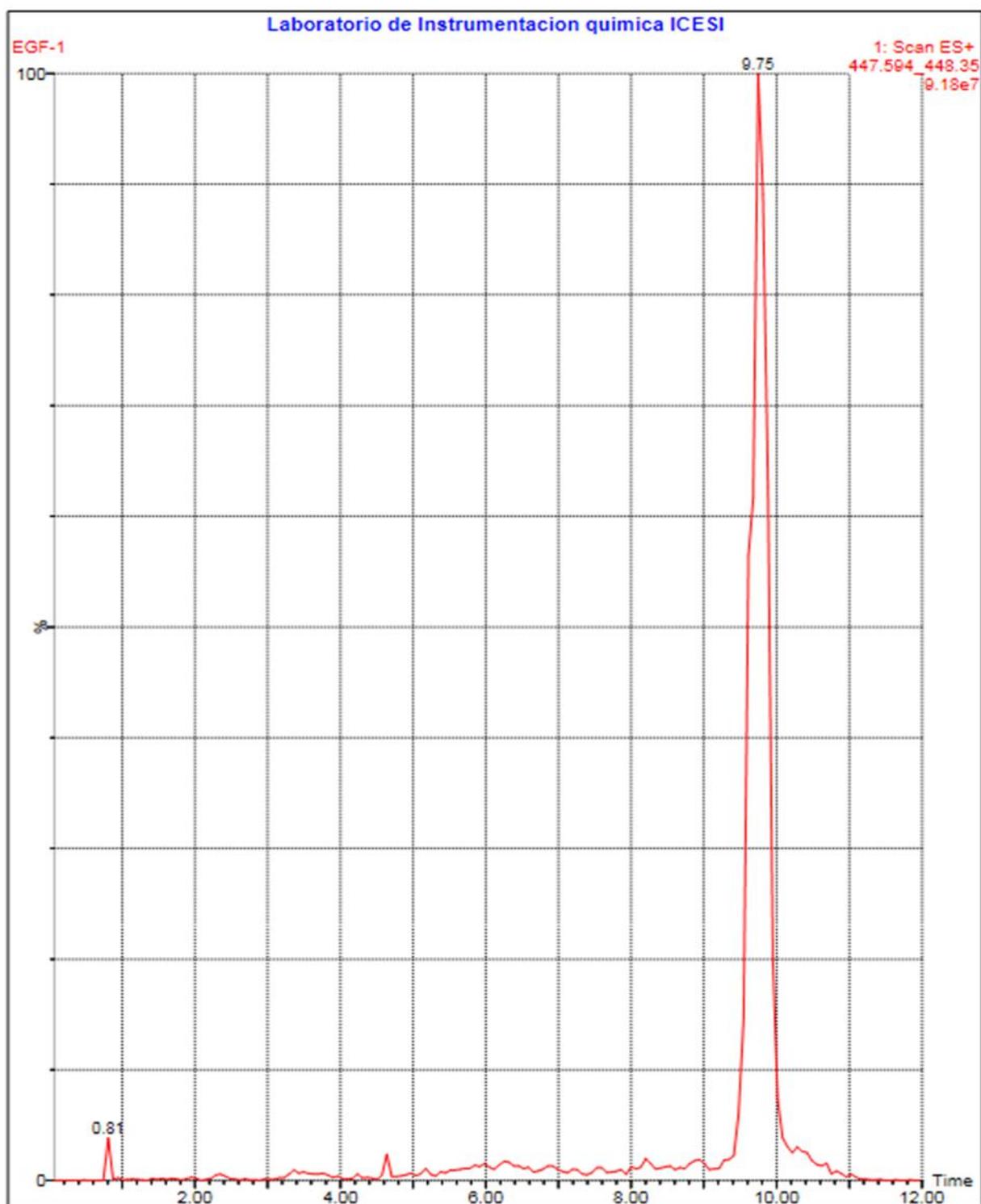
2.5.6. Caracterización del hEGF por LC-MS.

Durante este apartado, se condujeron 6 muestras y 1 estándar al laboratorio de Instrumentación Química de la Universidad Icesi, donde se llevó a cabo la caracterización estructural de los polipéptidos, seguida de la aplicación de un logaritmo de deconvolución para demarcar los datos relevantes y eliminar las señales sin significancia, considerando que el polipéptido es de gran tamaño y posee una estructura compleja.

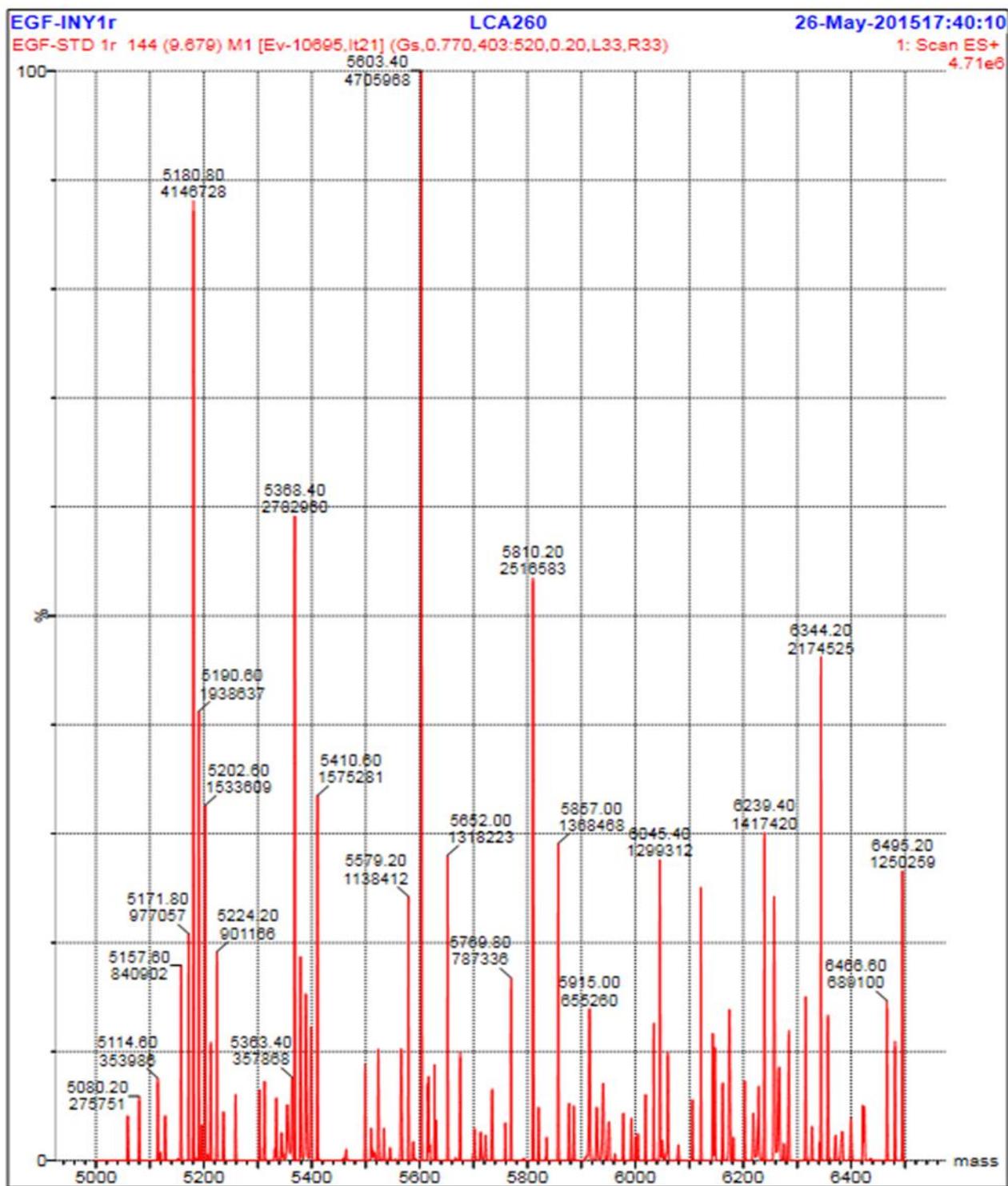
A continuación, se presentan los resultados obtenidos luego de aplicar el algoritmo de deconvolución.



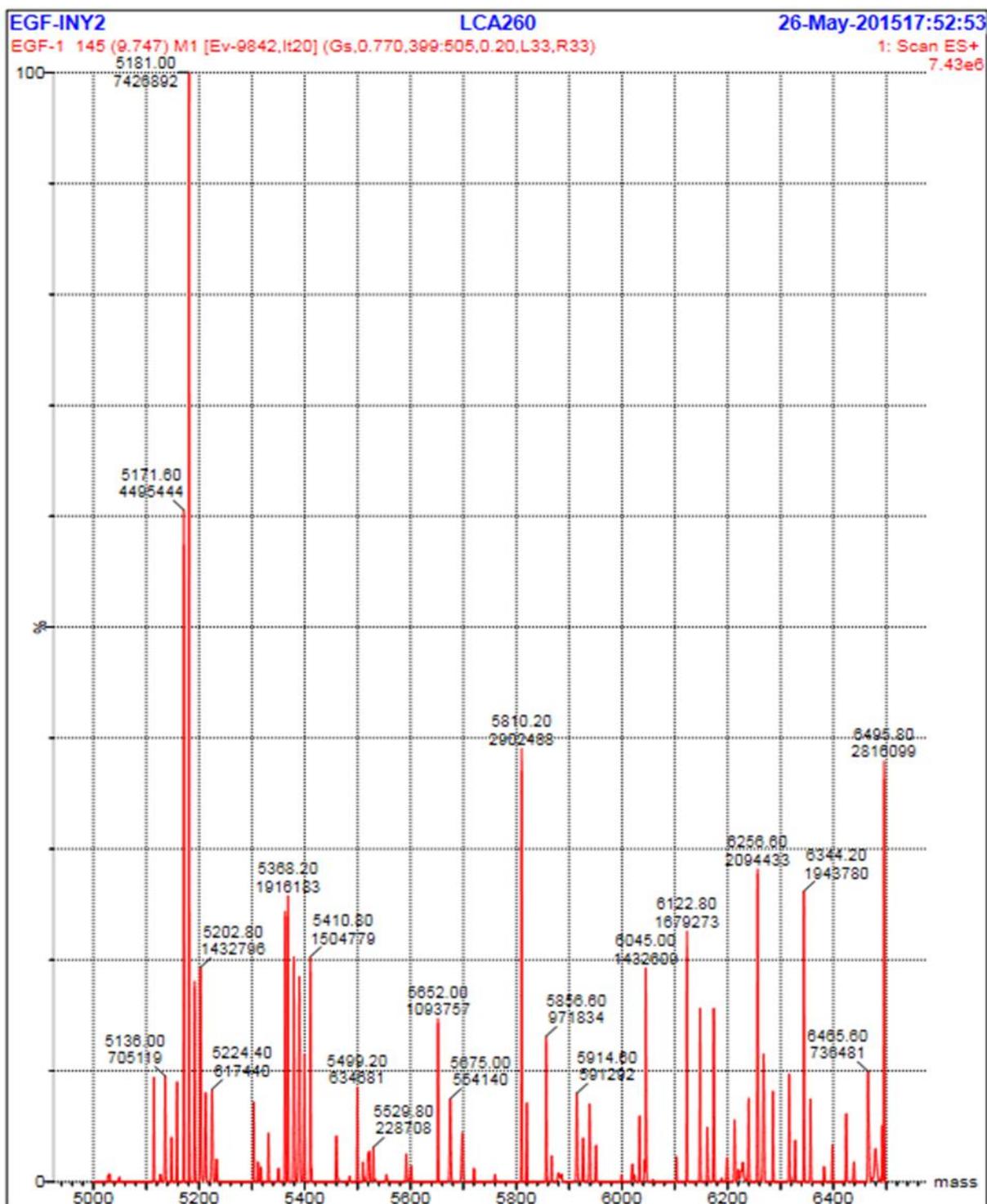
Gráfica 8. Cromatograma del estandar hEGF, con un tiempo de retención de 9.75 minutos.



Gráfica 9. Cromatograma del hEGF en la muestra 1, con un tiempo de retención de 9.75 minutos.



Gráfica 10. Espectro de Masas del estándar hEGF, luego de aplicar el algoritmo de deconvolución.



Gráfica 11. Espectro de Masas del hEGF en la muestra 1, luego de aplicar el algoritmo de deconvolución.

Ambos cromatogramas obtenidos experimentalmente, evidencian un tiempo de retención de 9.75 minutos. Un único máximo de absorción, sustenta la integridad del hEGF recombinante.

Los Espectros de Masas poseen patrones similares e indican un peso molecular del polipéptido entre 5.181 a 5.603 Da.

A continuación, se presentan los resultados más relevantes de la caracterización estructural del hEGF en las 6 muestras.

Tabla 16. Resultados relevantes de la caracterización del hEGF por LC-MS.

| Muestra | Peso molecular | Señales de mayor intensidad | | | | | Tiempo de retención (min) |
|-----------------|----------------|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------------------|
| 1 | 5181.00 | 5171.60 | 5368.20 | 5810.20 | 6256.60 | 6495.80 | 9.75 |
| 2 | 5368.40 | 5172.00 | 5181.00 | 5810.00 | 6345.60 | 6496.80 | 9.68 y 9.81 |
| 3 | 5365.40 | 5202.00 | 5180.60 | 5809.20 | 6345.80 | 6464.80 | 9.68 y 9.81 |
| 4 | 5365.60 | 5202.20 | 5181.00 | 5809.80 | 6256.40 | 6494.80 | 9.75 |
| 5 | 5365.60 | 5202.40 | 5180.60 | 5809.40 | 6256.00 | 6493.80 | 9.75 |
| 6 | 5365.60 | 5202.80 | 5180.80 | 5810.40 | 6257.00 | 6464.80 | 9.75 |
| Estándar | 5603.40 | 5202.60 | 5180.80 | 5810.20 | 6239.40 | 6495.20 | 9.75 |

El error del algoritmo de deconvolución es aproximadamente de 5 Daltons. En este apartado, se obtuvieron resultados satisfactorios, considerando que la muestra inyectada en el equipo contenía una matriz multiprotéica del medio extracelular y que el equipo empleado para la caracterización no es el óptimo para analizar macromoléculas. Pese a lo anterior, los patrones presentados en los cromatogramas y los Espectros fueron similares.

2.6. Discusión.

El material biológico, consistía en levaduras recombinantes del género *P. pastoris* GS115, desarrolladas por el Doctor Federico Odreman. El Plásmido empleado para la inserción del gen que codifica la expresión del hEGF, fue el vector pPICZ α disponible en INVITROGEN, que contenía el gen de selección Neo con resistencia al antibiótico G418, en lugar de la Zeocina™ (V. figura 12). Los rótulos de las muestras empleadas, B 4.4. y B 5.1., corresponden a la misma cepa de *P. pastoris*, desarrollada en diferentes eventos de clonación y transformación.

El medio de cultivo elegido, consistía en YPD, para optimizar el crecimiento. Además, poseía un buffer de fosfato que orientaba al pH en un rango neutro o ligeramente ácido. Además, se incorporó glucosa para reprimir la actividad del *P-AOX1* (Invitrogen, 2010).

En la figura 1, se evidencia el crecimiento de *P. pastoris* en agar YPD con 0.2 y 0.4 mg/mL de G418, luego de 30 horas de incubación a 28°C. Este resultado, indica que la hibridación del plásmido pPICZ α con el genoma de *P. pastoris* fue exitosa, considerando que el crecimiento de las colonias no fue inhibido bajo las concentraciones del antibiótico de selección descritas.

La inserción del gen de interés, no es condición suficiente para garantizar que el organismo hospedero exprese de forma óptima el polipéptido recombinante. Para que esto ocurra, *P. pastoris* debe contar con la maquinaria metabólica apropiada de inducción, plegamiento y secreción proteica.

P. pastoris secreta bajas concentraciones de proteínas nativas. Un protocolo óptimo de expresión, debe garantizar que la macromolécula recombinante abarque la mayoría de la porción proteica del medio (Barr et al., 1992). Para sustentar esta afirmación, se realizó un SDS-PAGE del medio extracelular. Los resultados presentados en la figura 2, indican que la tinción con Coomassie, que posee un nivel de detección de 100 ng (Invitrogen, 2010), no reconoce polipéptidos extracelulares. Por lo tanto, la fracción proteica, comprende magnitudes menores de localización, que podrían determinarse con herramientas más sensibles. Entre ellas, la tinción con plata permite visualizar macromoléculas en un orden de 2 ng (Invitrogen, 2010).

En la figura 4, se evidencia un resultado similar en la detección del hEGF por SDS-PAGE, indicando una ausencia proteica luego de la inducción con 0.5% (%v/v) de metanol. Cabe mencionar, que la cantidad de polipéptido producida a escala de laboratorio, es pequeña como para ser detectada por esta técnica. La reproducibilidad del método, aplica en Fermentadores, donde los niveles de expresión de proteínas heterólogas son superiores (Invitrogen, 2010). Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad que determinada cantidad de hEGF

esté siendo expresada, pero no secretada al medio extracelular, lo que impide su detección óptima. El último efecto, no fue evaluado durante este trabajo.

El Western blot, ofrece niveles de detección proteica hasta de 1 pg (Invitrogen, 2010). La inmunotransferencia obtenida en los estándares hEGF, se presenta en la figura 3, donde se sustenta la hibridación del anticuerpo primario "Anti-hEGF" con cada muestra empleada. Adicionalmente, la radiografía indica una migración uniforme de los estándares, que poseen un tamaño aproximado de 6 kDa. La concentración de cada muestra, es proporcional a la intensidad y al grosor de la señal emitida sobre el Film. De esta forma, el rhEGF de 5µg/mL, posee una banda de mayor intensidad con respecto a los estándares que se encuentran en medio acuoso a pH 4 y 7.4, cuya concentración es 1µg/mL. En la figura 3, se evidencia la estabilidad del polipéptido en medios ácidos y relativamente básicos, conferida por la visualización de una banda uniforme en la distancia específica de migración electroforética. Con este resultado, se pueden explorar diferentes pH de cultivo en *P. pastoris*, que maximicen la expresión del hEGF sin afectar su estabilidad fisicoquímica, especialmente en la inhibición de la actividad de proteasas extracelulares que actúan a pH neutro y pueden disminuir drásticamente el rendimiento de proteínas heterólogas (Wu, Chu, Wang, & Zhang, 2012).

Luego de la inducción inicial del hEGF recombinante en *P. pastoris* y de realizar la inmunotransferencia respectiva, se obtuvo la radiografía que se ilustra en la figura 5, donde se evidencia la unión inespecífica del anticuerpo primario y por lo tanto el secundario, sobre la membrana de PVDF, dificultando la distinción del complejo conformado por el hEGF, el anticuerpo primario y el secundario. Este evento resulta de un bloqueo insuficiente en la superficie de la membrana con PBS, Tween 20 0.2% (v/v) y BSA 0.3% (%p/v). El papel del BSA luego de la transferencia, consiste en su unión covalente sobre todos los sitios de la membrana que no poseen proteínas blanco. De este modo, el anticuerpo solo puede unirse a su antígeno específico, reduciendo el ruido del fondo y los falsos positivos (Jin & Kennedy, 215). Al elaborar una solución de bloqueo con BSA 3% (%p/v), se garantiza la uniformidad del bloqueo de la membrana, que se traduce en la unión específica del anticuerpo primario con hEGF para dar lugar a bandas uniformes y sin ruido que dificulte su distinción, como se aprecia en la figura 6. En la radiografía, se evidencia que las condiciones de crecimiento, inducción y almacenamiento de *P. pastoris*, no afectaron la estabilidad del polipéptido recombinante, de aproximadamente 6 kDa. Cabe aclarar, el tiempo inicial invertido en la inducción fue relativamente corto, lo que podría justificar los bajos niveles de expresión que se ilustran en la figura 6.

Durante la estandarización de una metodología de expresión de una proteína recombinante en *P. pastoris*, debe establecerse un equilibrio entre el nivel de expresión, la tasa de crecimiento y la densidad celular, que permita optimizar el protocolo empleado y garantice la calidad del producto final.

En la gráfica 1, se presenta la curva de crecimiento de *P. pastoris* a 28°C y 150 RPM, obtenida experimentalmente. Al inicio de la curva, se aprecia una Fase Lag prolongada de aproximadamente 10 horas, correspondiente al acoplamiento gradual de *P. pastoris* en el medio de cultivo. Posteriormente, se evidencia una Fase exponencial en un periodo de 7 horas, seguida de una Fase estacionaria que inicia a las 19 horas de incubación.

En la gráfica 2, se evidencian algunos cambios de comportamiento en el crecimiento de *P. pastoris*, tras ejecutar varios ajustes en las variables de incubación. La variabilidad más evidente, radica en el incremento de la tasa de agitación del medio de cultivo desde 150 RPM a 280 RPM. Como resultado, en el segundo evento las levaduras alcanzaron una Fase Exponencial rápidamente, sin un efecto pronunciado de la Fase Lag. Esto se debe a que la agitación, por medio de movimientos térmico-aleatorios promueve el consumo uniforme de nutrientes para la adaptación rápida de los microorganismos a su ambiente. Sin embargo, las altas tasas de agitación, favorecen la aparición de burbujas en los medios líquidos y su ruptura, libera grandes cantidades de energía que conducen a la muerte celular. Aparentemente, *P. pastoris* posee paredes celulares resistentes que le confieren protección frente a este incidente (Invitrogen, 2010).

Con los datos obtenidos en las curvas de crecimiento de la gráfica 2, se desarrolló un diseño experimental 2^3 en Minitab 17, como se aprecia en el ANOVA de la tabla 9, para determinar las posibles diferencias estadísticamente relevantes en el pH, la temperatura y la sub-división de *P. pastoris* empleada, que maximicen la concentración celular, luego de 16 horas de incubación. Posteriormente, en la tabla 10, se evidencia al pH como la única variable que tiene influencia significativa sobre la acumulación de la biomasa, dado que el valor P de su media (0.000) es significativamente menor al intervalo de confianza, de 0.05.

En las gráficas 3 y 4 se presenta un análisis gráfico de los resultados obtenidos en la tabla 10. La información extraída, indica que cuando el medio líquido YPD se encuentra a pH 6, se obtiene mayor concentración celular luego de 16 horas de incubación, con respecto al manejo del cultivo a pH 8. Sin embargo, no existe significativa relevancia en la respuesta cuando las temperaturas de incubación son 25°C o 30°C. Adicionalmente, no se obtuvieron ventajas relevantes en la acumulación de la biomasa con el uso de las sub-divisiones B 4.4. y B 5.1. de *P. pastoris*. Los niveles de las variables evaluadas, no interactúan convergentemente para conducir al incremento de la biomasa, según se ilustra en la gráfica 4. Los resultados extraídos en este apartado, sustentan los reportes emitidos, que garantizan el crecimiento óptimo de *P. pastoris* en medios de cultivo líquidos con pH neutro o ligeramente ácido para suplir su demanda metabólica (Invitrogen, 2010).

Las gráficas 5 y 6 fueron extraídas del Software MATLAB 8.5. En ellas, se evidencia que el crecimiento de *P. pastoris* bajo los tratamientos evaluados, es inherente al tiempo. En otras palabras, los niveles de pH y temperatura, no

generan inhibición en la acumulación de la biomasa de B 4.4. y B.5.1., luego de 16 horas de incubación bajo las condiciones descritas. A partir de esto, resulta conveniente sugerir que en futuras investigaciones, se realice un diseño de experimentos más robusto, donde se exploren los intervalos de confianza de las condiciones de crecimiento en *P. pastoris* y finalmente, desarrollar un protocolo de expresión más productivo.

Por otra parte, se realizó una evaluación de la tasa de crecimiento de *P. pastoris*, en función de los tratamientos descritos en la tabla 5. Nótese que no necesariamente, una mayor densidad celular es equivalente a una alta tasa de división. Los sistemas microbiológicos pueden alcanzar altas concentraciones sin estar sometidos a un rápido crecimiento y viceversa. Durante este apartado, se promediaron los datos correspondientes a las repeticiones de cada ensayo ilustrado en la gráfica 2 y se determinaron las desviaciones estándar para sustentar la confiabilidad estadística del método. En la tabla 12, se evidencia que ninguna desviación resultó superior a 0.08. De esta forma, se garantiza que los resultados se encuentran en intervalos convenientes.

La gráfica 7 fue el resultado de la estimación de las Fases Exponenciales en cada curva de crecimiento. Como se puede apreciar, poseen un comportamiento lineal según la ecuación $y = mx + b$. De esa forma, los datos pueden ingresarse en un Software Stat Graphics Centurion, que evalúa las diferencias estadísticas significativamente relevantes entre las pendientes. Cabe aclarar que a pendientes mayores, la tasa de crecimiento es superior. El ANOVA presentado en la tabla 13, indica que las pendientes son estadísticamente diferentes, ya que el valor P presentado por su media (0.0119), es inferior a 0.05. Además, la agrupación obtenida en la tabla 14, indica que cuando el medio líquido YPD se encuentra a pH 6 y la incubación se realiza a 30°C para cualquier cepa de *P. pastoris* evaluada, se obtienen mayores tasas de crecimiento celular. Al parecer, la temperatura es la variable de más relevancia para alcanzar la respuesta deseada. En todos los casos, empleando temperaturas de incubación de 25°C, se obtuvieron menores velocidades de crecimiento. Este resultado coincide con un reporte de Wu y colaboradores, donde señalan la temperatura de crecimiento óptima de *P. pastoris* en un rango de 28 a 30°C (Wu, Chu, Wang, & Zhang, 2012). La explicación de este comportamiento, radica en características inherentes del organismo hospedero y dependen de su metabolismo, sus demandas nutricionales y su composición genómica. Adicionalmente en este apartado, se comprobó que cuando el medio cultivo líquido YPD se encontraba a pH 6, generalmente la tasa de crecimiento de *P. pastoris* era superior. De esta forma, el pH tiene un efecto convergente en la acumulación de la biomasa y en el incremento de la tasa de división celular.

Luego de la inducción con metanol al 0.5 y 1% (%v/v) según los ensayos descritos en la tabla 5, se evaluó la influencia de la temperatura, el pH y la concentración del

agente inductor sobre los niveles de expresión del hEGF recombinante en *P. pastoris*.

La concentración del inductor debería ser ligeramente mayor que la concentración crítica requerida para el proceso de inducción. Si la cantidad de metanol no supe la demanda nutricional, la producción del hEGF será mínima. Por otra parte, si la concentración de metanol es demasiado alta, ocasionará un efecto tóxico en las levaduras, con una depleción en el rendimiento del polipéptido recombinante (Palomares, Estrada & Ramírez, 2004). En las figuras 7 y 8 se evidencian las radiografías obtenidas de la inmunotransferencia del hEGF. Desafortunadamente, no se puede estimar la cantidad de inductor que optimiza la expresión del polipéptido. Nótese la similaridad en la intensidad y el grosor de las señales correspondientes a la inducción con 0.5 y 1% de metanol. Según Gräslund y colaboradores, una concentración final de 0.5% en medio líquido BMMY, garantiza la expresión óptima de proteínas recombinantes bajo el promotor AOX1 en *P. pastoris* (Gräslund, Nordlund, Weigelt, Hallberg, Bray & otros, 2011). La ambigüedad de este resultado, radica en la producción del polipéptido a escala de Laboratorio, donde los protocolos no ofrecen grandes cantidades del producto recombinante y las técnicas de detección para localizarlos resultan imprecisas.

De la misma forma, resulta difícil estimar la temperatura y el pH donde se obtuvo una mayor expresión del hEGF recombinante. Sin embargo, en las figuras 7 y 8 se puede detectar una ausencia de la expresión proteica cuando el crecimiento de *P. pastoris* en cultivos líquidos se lleva a cabo a pH 8 y 25°C. Estos valores, ofrecieron anteriormente menor acumulación de biomasa e inferiores tasas de división. De esta forma, la expresión del hEGF en *P. pastoris* está fuertemente ligada al pH y a la temperatura de incubación. Si las levaduras crecen en un ambiente donde sus condiciones metabólicas no son óptimas, la inducción del polipéptido recombinante será inhibida o disminuida.

En estudios realizados por Wu, Zhang y colaboradores, se evidenció que las altas tasas de crecimiento y la elevada densidad de *P. pastoris in vitro*, conducían a la formación de cuerpos de inclusión y a la disminución del rendimiento de proteínas recombinantes (Wu, Chu, Wang, & Zhang, 2012). Sin embargo, los resultados evidenciados en las figuras 7 y 8, sustentan la integridad del hEGF con la emisión de una única señal, incluso en los ensayos donde la tasa de crecimiento celular fue superior (9, 10, 11 y 12). Considerando que la inducción con metanol se realizó luego de alcanzar la fase de crecimiento estacionaria, no se puede afirmar que exista un “efecto de densidad celular” que conduzca a la disminución del rendimiento del polipéptido recombinante. De hecho, en la producción de proteínas heterólogas, muchas veces se alcanza la optimización del producto final con la inducción del gen de interés al comienzo de la fase exponencial de crecimiento (Ferrer, Domingo, Corchero, Vázquez, & Villaverde, 2009).

Por otra parte, los resultados ilustrados en la figura 9, impidieron la estimación semi-cuantitativa del rendimiento del hEGF obtenido durante la optimización.

Como procesos críticos durante la inmunotransferencia, se debe ejecutar un bloqueo óptimo de la membrana de PVDF y se recomienda la preparación de todos los reactivos para cada ocasión que se desee aplicar el método, evitando así la contaminación ilustrada desde la figura 9.2 hasta la 9.4. Desafortunadamente, el estándar empleado en el proceso se agotó, lo que condujo a desistir en el proceso.

Durante la caracterización estructural del hEGF por LC-MS, se obtuvo un “scan” general inicial del medio extracelular de *P. pastoris*, donde se evidenciaban los tiempos de retención de las moléculas detectadas. Suponiendo que la mayor porción proteica correspondía al hEGF, se seleccionó el cromatograma de mayor intensidad, cuyo tiempo de retención era aproximadamente 9.75 minutos. Posteriormente, se apreció un Espectro de Masas, aparentemente del polipéptido recombinante. Sin embargo, cabe aclarar que el rango de detección del equipo LC-MS de la Universidad Icesi es 200-1500 m/z. Como el tamaño del hEGF está alrededor de 6 kDa, fue necesario fragmentar la macromolécula en varias porciones con la fuente de ionización para que fuera detectada por el analizador del equipo. De esta forma, el pico base que se obtuvo, se encontraba en una relación m/z de 447, aproximadamente. Para obtener el espectro que estime el tamaño real del hEGF, se realizó un algoritmo de deconvolución y con el empleo de un “MockData”, se eliminó el ruido y se optimizaron las señales de importancia, obteniendo así los espectros evidenciados desde la gráfica 8, a la 11. La similitud de los Espectros de Masas en las gráficas 10 y 11, sustentan la presencia del hEGF, considerando que los ensayos correspondían a un estándar y a una muestra del medio extracelular. Nótese que el pico base se encuentra en el rango de 5100 a 5600 Da. La macromolécula bajo estudio, posee un tamaño de 6000 Da y el error del algoritmo de deconvolución es de tan sólo 5 Da. Esta discrepancia, se debe a que la intensidad de ionización del polipéptido aún no se ha estandarizado, de tal forma que en la fuente de ionización, se pierden aminoácidos del hEGF que contribuyen a la disminución de su tamaño, lo que finalmente se detecta en el analizador. Sin embargo, los resultados que se obtuvieron en este apartado fueron satisfactorios, considerando que la matriz extracelular posee componentes multiprotéicos y complejos de los cuales se pudo aislar el polipéptido recombinante. Además, la fase estacionaria empleada (C18), no es la óptima para separar macromoléculas y aun así, permitió la separación adecuada del analito.

2.7. Conclusión.

La inserción del gen que codifica la expresión del hEGF en el genoma de *P. pastoris*, no es condición suficiente para garantizar que el organismo hospedero exprese de forma óptima el polipéptido recombinante. Durante este trabajo, se estudiaron las herramientas enfocadas en el manejo del medio de cultivo de *P. pastoris*, que ofrecen mayores niveles de expresión, considerando la importancia que representa esta macromolécula a nivel Farmacéutico y Cosmético.

En la estandarización de una metodología de expresión del hEGF recombinante en *P. pastoris*, debe establecerse un equilibrio entre el nivel de expresión, la tasa de crecimiento y la densidad celular. En pocas palabras, se optimiza la carga metabólica, el tiempo invertido en el crecimiento y con diferentes estrategias sobre el medio de cultivo, se obtendrían mayores niveles de expresión.

Los resultados obtenidos durante este trabajo, señalan al pH de crecimiento de *P. pastoris* como la variable de mayor impacto sobre la acumulación de la biomasa, siendo mayor a pH 6 e inferior a pH 8. Además, se evidenció un incremento en la tasa de división celular cuando la incubación se realizaba a pH 6 y 30°C. En este caso, la temperatura resultó ser la variable de mayor relevancia para alcanzar la respuesta deseada. Sin embargo, empleando temperaturas de incubación de 25°C, se obtuvieron menores velocidades de crecimiento en *P. pastoris*.

Posteriormente se determinó que la alta tasa de división celular, no afectaba el plegamiento ni la integridad del hEGF. Sin embargo, cuando el crecimiento de *P. pastoris* se realizaba a pH 8 y 25°C, se inhibía la expresión del polipéptido recombinante.

Desafortunadamente, no pudo estimarse la cantidad de metanol como agente inductor que optimiza la expresión del polipéptido recombinante. Similarmente, no pudo relacionarse la optimización de los niveles de expresión con el pH ni la temperatura de crecimiento. Esto se debe a que el protocolo de inmunotransferencia por Western blot empleado para la determinación semicuantitativa del hEGF, no resultó reproducible a escala de laboratorio, donde los rendimientos de polipéptido recombinante son relativamente bajos y las señales emitidas por la radiografía no poseen diferencias visuales relevantes.

Los resultados obtenidos durante este trabajo, garantizan que a escala de laboratorio, un ensayo en medio YPD a pH 6 con una temperatura de 30°C y una tasa de agitación de 280 RPM durante 16 horas, optimizará el tiempo de crecimiento y la acumulación de la biomasa de *P. pastoris*. Posteriormente, al ejecutar una inducción del hEGF con 0.5 o 1% de metanol en medio BMMY

durante 55 horas, se obtendrán niveles de expresión del hEGF detectables por Western blot. El polipéptido resultante, será secretado al medio extracelular en su forma soluble y no presentará agregados moleculares o plegamientos incorrectos.

2.8. Recomendaciones.

La ejecución de este trabajo presenta varios desafíos para futuras investigaciones. En primera medida, resulta conveniente estudiar los niveles de expresión del hEGF en *P. pastoris*, realizando la inducción durante las Fases de crecimiento Lag y Exponencial, para evaluar si un “efecto de densidad celular” disminuye el rendimiento del polipéptido recombinante.

Además, podría realizarse un escalamiento en planta piloto para evaluar de forma precisa el efecto del pH, la temperatura y la tasa de agitación del medio de cultivo de *P. pastoris* sobre los niveles de expresión del hEGF, de forma que las cantidades del polipéptido, faciliten la reproducibilidad del método de detección. Adicionalmente, podrían emplearse técnicas de cuantificación proteica más sensibles, que permitan la estimación precisa del rendimiento de la macromolécula recombinante.

Por otra parte, resultaría conveniente examinar los pellets celulares luego de la inducción del hEGF, para evaluar la posibilidad que determinada cantidad del polipéptido esté siendo expresada, pero no secretada al medio extracelular.

Con respecto al equipo LC-MS, sería de gran utilidad la estandarización del procedimiento de purificación y caracterización estructural del hEGF, para garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos.

2.9. Referencias

- Alejandro Gaviria. (18 de Septiembre de 2014). *Ministerio de Salud y Protección Social*. Recuperado el 18 de Noviembre de 2014, de Decreto Numero 1782 de 2014: http://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Decreto%201782%20de%202014.pdf
- Berg, M., Axel, P., & Pettersen, H. (2006). Reproducibility of LC-MS-based protein identification. *Journal of Experimental Botany*, 1509-1514.
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2000). One-dimensional SDS-Poliacrilamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Nature*, 680-685.

- Dirección de Medicamentos y Tecnologías. (Septiembre de 2014). *ABECÉ sobre los Medicamentos Biotecnológicos*. Recuperado el 18 de Noviembre de 2014, de Ministerio de Salud y Protección Social: <http://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/MET/abc-biomedicamentos.pdf>
- Ferrer, N., Domingo, J., Corchero, J. L., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2009). Microbial Cell Factories. *BioMedCentral*, 8-17.
- Graslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Halberg, M., Bray, J., & Gileadi, O. (2008). Protein production and purification. *National Institutes Of Health*, 135-146.
- Hyung Heo, j., Soon Won, H., Ah Kang, H., Rhee, S. K., & Hyung Chun, B. (2002). Purification of Recombinant Human Epidermal Growth Factor Secreted From The Methylophilic Yeast *Hansenula Polymorpha*. *Protein Expression and Purification*, 117-122.
- Invitrogen. (2010). *Patente nº Cat. no. K1740-01*.
- Jin, S., & Kennedy, R. T. (2015). New developments in Western blot technology. *Chinese Chemical Letters*, 416-418.
- Lazzarini, R., Duarte, I., & Ferreira, A. (2013). Patch tests. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 88(6), 879-888.
- Liden, G. (2002). Understanding the Bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 273-279.
- Martínez Carpio, P. (2003). El factor de crecimiento epidérmico cuarenta años después de su descubrimiento: De la Bioquímica a la Química. *Endocrinol Nutr*, 334-344.
- Palomares, L., Estrada, S., & Ramírez, O. (2004). Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *pubmed*, 15-52.
- Serrano González, A. (2005). *Estudio de la producción heteróloga de una lipasa del hongo Rhizopus oryzae en la levadura metilotrófica Pichia pastoris*. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Shafi, S., & Shrivastava, T. (2013). Protein characterization using modern biophysical techniques. *Omics*.
- Sreekrishna, K., Brankamp, R., Kropp, K., Blankenship, D., & Tsay, J. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *ELSEVIER*, 55-62.

- Topczewska, J., & Bolewska, K. (1993). Cloning and expression of the hEGF gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochimica Polonica*, 4-7.
- Valdés, J., Mantilla, E., Márquez, G., Bonilla, R., Proenza, Y., Narciandi, E., y otros. (2009). Physiological study in *Saccharomyces cerevisiae* for overproduction of a homogeneous human epidermal growth factor molecule. *Biotechnología Aplicada*, 166-167.
- Waters. (2006). *Patente nº Revision E*.
- Wu, D., Chu, J., Wang, Y. H., & Zhang, S. L. (2012). Incomplete protein disulphide bond conformation and decreased protein expression result from high cell growth during heterologous protein expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 107-112.
- Xu, P., Raden, D., Doyle, F. J., & Robinson, A. S. (2005). Analysis of unfolded protein response during single-chain antibody expression in *Saccharomyces cerevisiae* reveals different roles for BiP and PDI in folding. *Metab. Eng.*, 269-279.
- Zhang, W. H., Hywood Potter, B. A., & Plantz, V. L. (2003). *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 203-215.

3. Anexos.

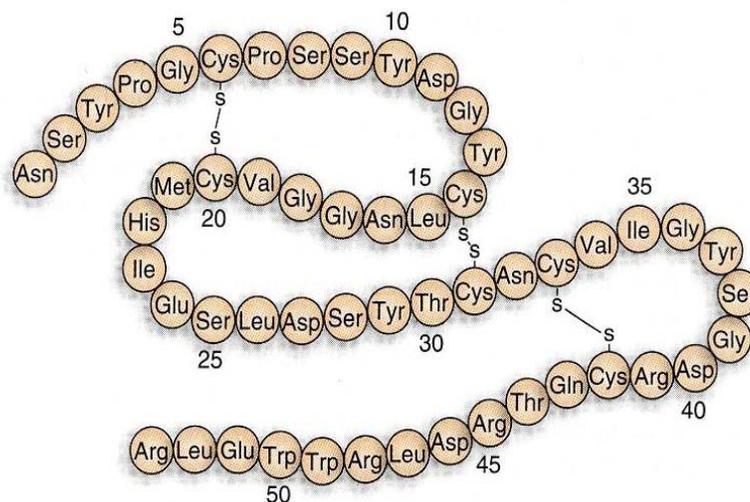


Figura 10. Secuencia de aminoácidos del EGF. (Lazzarini, Duarte, & Ferreira, 2013).

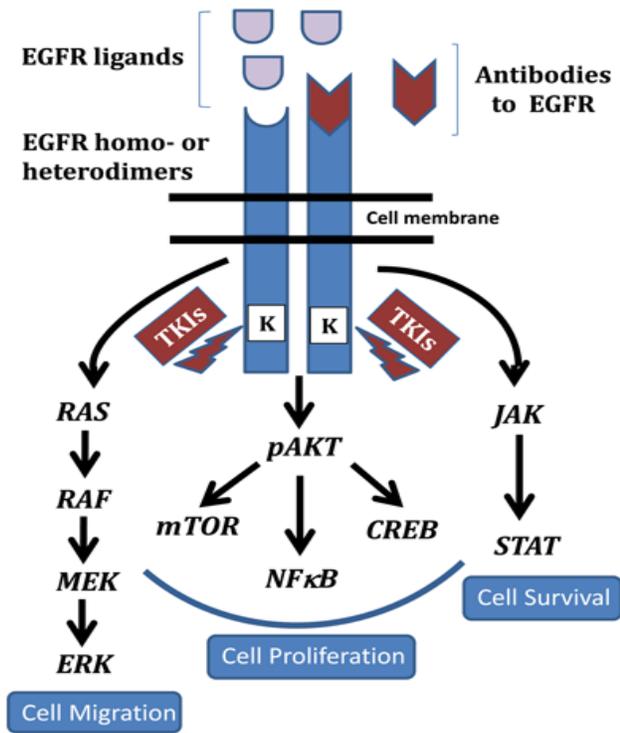


Figura 11. Receptor del EGF (EGRF). Ligandos y fisiología celular. Algunos procesos clave. (Martinez, 2003).

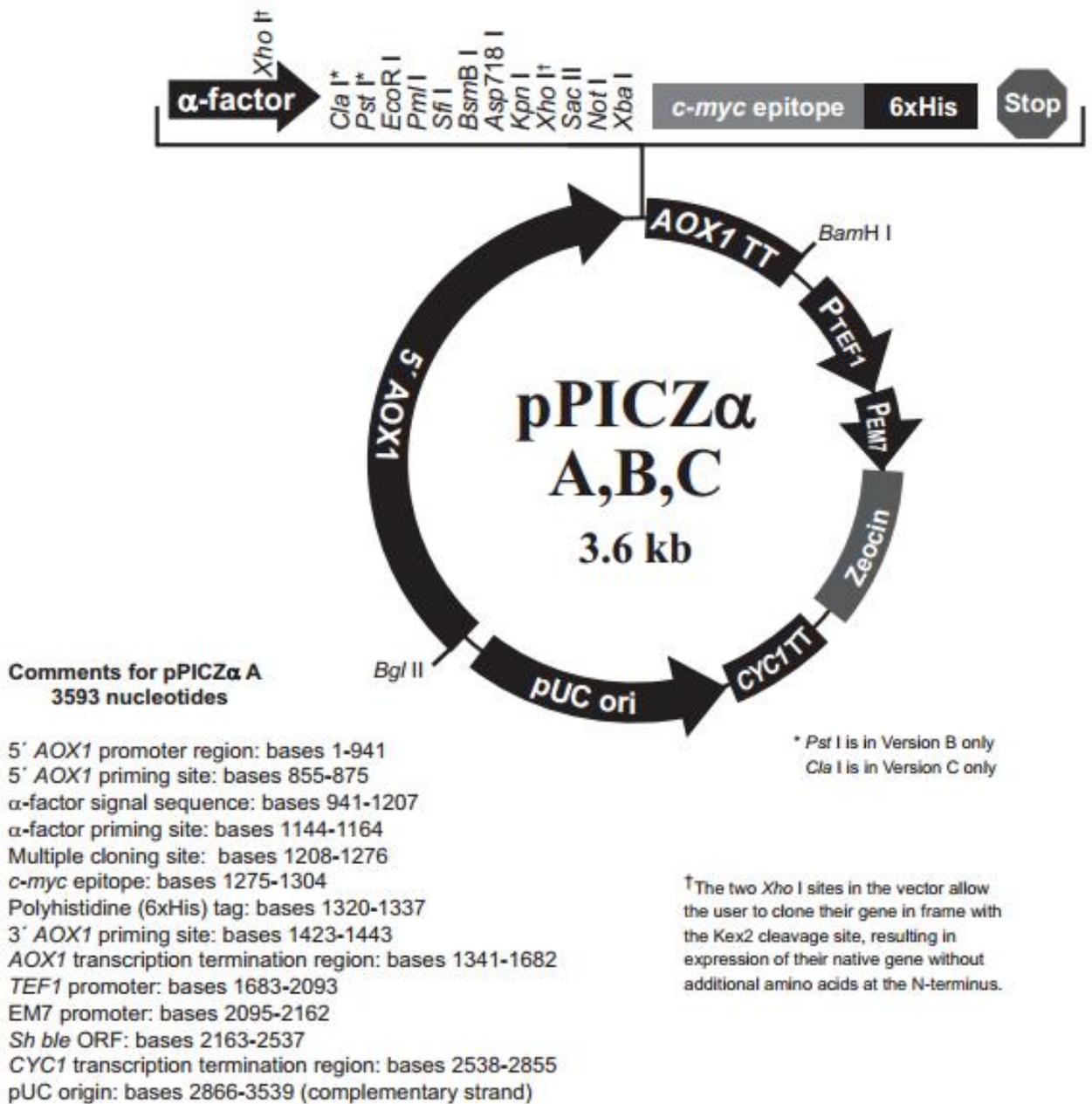


Figura 12. Vector pPICZα empleado en la transformación de *P. pastoris* para la expresión del hEGF. El gen de selección disponible en este trabajo, consistía en G418 en lugar de Zeocina.