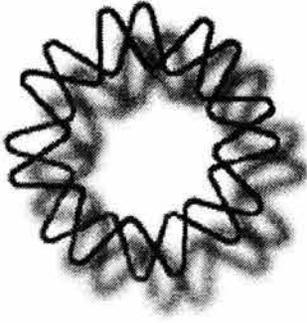


00551



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

“EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CITIDINA, N-
ACETILMANOSAMINA Y MANOSAMINA EN LA GLICOSILACIÓN
DE FOSFATASA ALCALINA HUMANA RECOMBINANTE
PRODUCIDA EN CÉLULAS DE INSECTO”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
QFB LUZ ADRIÁN DELGADO BUSTOS



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

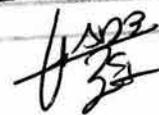
ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Luz Adrián

Delgado Bustos

FECHA: 29-Abr-04

FIRMA: 

Dedicatorias

A mi Familia

A mis padres que siempre me han brindado todo el apoyo no solo para este, sino para todos los proyectos y aspectos en mi vida.

A mi Abuela, por estar siempre conmigo, desde mis primeros pasos hasta el día en que tuve que salir de casa. Gracias por todas las enseñanzas y experiencias compartidas.

A todos mis hermanos y mis hermanas, a mis sobrinos y mis cuñados por su gran apoyo moral y económico durante todos éstos años, por mostrarme siempre el buen camino y por compartir conmigo tantos buenos y malos momentos. Me siento muy afortunado de que estén conmigo, gracias por hacer de ésta una gran familia.

A Claudia, por hacerme tan feliz y por compartir tu vida conmigo, por todo el camino que hemos recorrido y por lo que falta....

A la Familia Pérez Sánchez, por todo su apoyo y toda su confianza durante éste tiempo.

A mis amigos

Con los que puedo contar en todo momento y que han sido un factor muy importante en la culminación de ésta etapa. Con los que no importa el tiempo de conocerlos sino la calidad de las vivencias: Ernesto Camarillo, Jimmy A. Mena, J. Jesús Mendoza, Pedro Cadena, Vanessa López, Eduardo Herrera, Karina Balderas, Rolando Arroniz, Luis Vizcaíno, Argel Gastelum, J. Alfonso Rangel, Lucio Rodríguez, Heber Gamboa.

A mis compañeros del grupo OTR: Germán Plascencia, Antonio Serrato, Karin Levy, Vanessa Hernández, Javier Dorantes, Angélica Ortega, Paul Mondragón, Adriana Rodríguez, Alvaro Lara. A quienes contribuyeron con valiosos comentarios y sugerencias: Dr. O. Tonatiuh Ramírez, Dr. Sandino Estrada, Dra. Laura Palomares, Dr. Bernard Priem, Dra. Angélica Meneses.

A mis compañeros del grupo Galindo: Mauricio Trujillo, José Luis López, Toño Rocha, Ruben Priego, Celia Flores, Marisol Córdova, Tania Panecatí, Boris Jiménez, Luz Horita, Edith Coronado, Dr. Carlos Peña, Dr. Leobardo Serrano.

Agradecimientos

Al Dr. Sandino Estada Mondaca, por sus enseñanzas y su apoyo en todo momento, por su confianza y por hacer agradable el realizar este proyecto.

Al Dr. O. Tonatiuh Ramírez Reivich, por haberme dado la oportunidad de participar en su grupo y por confiar en mí durante todo este tiempo.

A la Dra. Laura A. Palomares Aguilera, por sus valiosas aportaciones en la realización de este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial por su constante motivación y comentarios acertados: Dra. Brenda Valderrama Blanco y Dr. Carlos Arias Ortiz.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado y sus valiosos comentarios a esta tesis.

Dr. Mario Soberón Chávez

Dr. Sandino Estrada Mondaca

Dr. Ricardo Lascurain Ledesma

Dra. Gloria Saab Rincón

Dr. Lourival Domingos Possani Postay

A Karin Levy, Vanesa Hernández, Marisol Córdova, Gloria Villa y Maribel Velasco, por su excelente trabajo tanto técnico como administrativo.

A Javier Dorantes por su amistad y su gran apoyo técnico durante mi estancia en el laboratorio.

A Angélica Ortega y Rolando Arroniz, por darme mis primeras enseñanzas en el cultivo de células y por sus consejos.

A quienes de alguna manera han contribuido a la realización de este proyecto: Sr. Pedro Romero, Mauricio Realpe, Vanessa López.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Sandino Estrada Mondaca en el Laboratorio del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través del proyecto DGAPA-IN-216100 y IN-220503, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto CONACyT NC-230, 33348-B y I33104-B y beca de Maestría 165641 así como de la beca complementaria del departamento general de estudios de posgrado (DEGEP).

ÍNDICE

Índice de Figuras	iv
Índice de Tablas	vi
Nomenclatura	vii
Resumen	1
Capítulo I INTRODUCCIÓN	2
Capítulo II ANTECEDENTES	5
2.1 Sistemas de expresión de proteínas recombinantes	5
2.1.1 Sistema de expresión en bacterias	6
2.1.2 Sistema de expresión en levaduras	7
2.1.3 Sistema de expresión en células de mamífero	7
2.2 Sistema células de insecto-baculovirus	9
2.2.1 Generalidades	9
2.2.2 Baculovirus	10
2.3 Glicosilación	13
2.3.1 Estructura de los oligosacáridos	14
2.3.2 N-glicosilación	14
2.3.3 Glicosilación en células de insecto	18
2.4 Metabolismo en células de insecto	20
2.4.1 Principales fuentes de carbono	20
2.5 Metabolismo de monosacáridos y biosíntesis de precursores	23
2.5.1 Activación e interconversión de monosacáridos	24

Capítulo III.	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo general	30
3.2	Objetivos específicos	30
Capítulo IV	MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1	Línea celular	31
4.2	Criopreservación de la línea celular	31
4.3	Baculovirus	32
4.4	Determinación del título viral por la técnica de end-point-dilution	32
4.5	Cultivos en matraces agitados.	33
4.6	Determinación de viabilidad celular por exclusión con azul de tripano	34
4.7	Determinación de la concentración celular en el contador de partículas counter Coulter.	35
4.8	Inicio de la cinética de producción de proteína recombinante	35
4.9	Tratamiento de los cultivos	36
4.10	Infección	37
4.11	Análisis de metabolitos	37
4.12	Cuantificación y purificación de la SeAP	37
4.13	Separación de los N-glicanos asociados a SeAP	38
4.14	Derivatización de carbohidratos con APTS.	39
4.15	Análisis de glicanos	40
4.16	Digestión con exoglicosidasas	43
4.17	Evaluación de la actividad hexosaminidasa	45

Capítulo V	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
5.1	Crecimiento y viabilidad	47
5.2	Aspectos metabólicos	51
5.2.1	Consumo de glucosa y generación de lactato	51
5.2.2	Producción de proteína recombinante	54
5.3	Análisis de oligosacáridos	56
5.3.1	Tratamientos con citidina	60
5.3.2	Tratamientos con N-Acetilmanosamina	65
5.3.3	Tratamientos con manosamina	70
5.4	Actividad β -N-Acetilglucosaminidasa	76
Capítulo VI	CONCLUSIONES	79
Capítulo VII	PERSPECTIVAS	81
	REFERENCIAS	82
	APÉNDICE A	89
A.1	Cálculo de la velocidad específica de crecimiento e índice de crecimiento	90
A.2	Determinación del índice de crecimiento	90
A.3	Cálculo de la velocidad específica de producción de proteína recombinante	91
A.4	Cálculo de la velocidad específica de consumo de glucosa y velocidad específica de generación de lactato.	93
	APÉNDICE B	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.	
2.1	Esquema de infección de un baculovirus silvestre 11
2.2	Algunas glicoformas 15
2.3	Procesamiento de N-glicanos en RE y Golgi 17
2.4	Metabolismo de glucosa y glutamina en células de insecto 22
2.5	Reacciones de formación de donadores de alta energía 23
2.6	Biosíntesis e interconversión de monosacáridos 24
2.7	Biosíntesis de precursores y procesamiento de N-glicanos 29
4.1	Esquema de cinéticas de producción 35
4.2	Reacción de derivatización de un azúcar reductor 39
4.3	Esquema del instrumental básico para electroforesis capilar 41
4.4	Exoglicosidasas empleadas para digestiones de oligosacáridos 44
5.1	Cinética de crecimiento y viabilidad típica 48
5.2	Índice de crecimiento 49
5.3	Velocidad específica de crecimiento de cultivos no infectados 50
5.4	Depleción de glucosa y generación de lactato 51
5.5	Producción específica de proteína recombinante 55
5.6	Escalera de glucosa 56
5.7	Nomenclatura y clave utilizada para identificar los picos en los electroferogramas 57
5.8	Electroferogramas representativos de digestiones con exoglicosidasas 58

5.9 Abundancia relativa de formas paucimanosa y alta manosa en cultivos tratados con citidina	61
5.10 Electroferogramas de las muestras tratadas con citidina 48 HPI	63
5.11 Electroferogramas de las muestras tratadas con citidina 120 HPI	64
5.12 Electroferogramas de las muestras tratadas con N-Acetilmanosamina 48 HPI	66
5.13 Electroferogramas de las muestras tratadas con N-Acetilmanosamina 120 HPI	67
5.14 Abundancia relativa de formas paucimanosa y alta manosa en cultivos tratados con N-Acetilmanosamina	69
5.15 Abundancia relativa de formas paucimanosa y alta manosa en cultivos tratados con manosamina	71
5.16 Electroferogramas de las muestras tratadas con manosamina 48 HPI	73
5.17 Electroferogramas de las muestras tratadas con manosamina 120 HPI	74
5.18 Ensayo para actividad β -N-Acetilglucosaminidasa	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.

2.1 Donadores activados	23
5.1 Velocidad específica de consumo de glucosa, velocidad específica de consumo de lactato	53
5.2 Concentración máxima de proteína recombinante, velocidad específica de producción de proteína recombinante	54
5.3 Estructuras propuestas y porcentaje de abundancia 48 y 120 HPI, tratamientos con citidina	61
5.4 Estructuras propuestas y porcentaje de abundancia 48 y 120 HPI, tratamientos con N-Acetilmanosamina	65
5.5 Estructuras propuestas y porcentaje de abundancia 48 y 120 HPI, tratamientos con manosamina	70
5.6 Velocidad de consumo de sustrato para hexosaminidasa en extracto celular	77

NOMENCLATURA

AcNPV	Nucleopolihedrovirus de Autographa californica
ADN	Ácido desoxi-ribonucleico
AG	Aparato de Golgi
APTS	Aminopireno-trisulfonato
Asn	Asparagina
BHK	Baby Hamster Kidney
CMP	Citidina monofosfato
CTP	Citidina trifostato
Cys	Cisteína
Cyt	Cytidina
CHO	Chinese Hamster ovary
DMSO	Dimetilsulfóxido
FBS	Suero fetal bovino
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
GDP	Guanidina difosfato
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
Glu	Glutamato
GV	Granulovirus
HPI	Horas post-infección
Leu	Leucina
LIF	Fluorescencia inducida por laser
Man	Manosa
ManN	Manosamina
ManNAc	N-Acetilmanosamina
MDI	Multiplicidad de infección
Met	Metionina
NAP	Nucleótido azúcares activados
NeuNAc	Ácido N-Acetil-neuramínico
NPV	Nucleopolihedrovirus
PLAP	Fostatasa alcalina de placenta
Pro	Prolina
RE	Retículo endoplásmico
RPM	Revoluciones por minuto
SCIBV	Sistema células de insecto-baculovirus
SeAP	Fosfatasa alcalina secretada
Ser	Serina
Sia	Ácido Siálico
TDI	Tiempo de infección
THF	Tetrahidrofurano
Thr	Treonina
UDP	Uridina difosfato
UFP	Unidades formadoras de placa

UTP	Uridina trifosfato
VCG	Velocidad específica de consumo de glucosa
VGL	Velocidad específica de generación de lactato
VPP	Velocidad específica de producción de proteína recombinante

RESUMEN

El procesamiento postraducciona l de proteínas producidas en cultivos celulares ha cobrado gran importancia ya que es un factor determinante en la actividad de proteínas recombinantes de interés terapéutico. Dentro de estas modificaciones postraduccionales, la glicosilación es particularmente esencial para las propiedades farmacocinéticas de estas proteínas. Dentro de todos los factores que influyen en la glicosilación de proteínas, las condiciones de cultivo y la disponibilidad de nucleótido-azúcares han sido ampliamente estudiados en cultivos de células de mamíferos y menos en células de insecto. En este trabajo se realizó una caracterización del efecto de la adición de citidina (Cyt), N-acetilmanosamina (ManNAc) y manosamina (ManN) en la N-glicosilación compleja de fosfatasa alcalina humana recombinante producida por el sistema células de insecto-baculovirus.

Los resultados muestran que el tratamiento con ManNAc tiene un efecto positivo en el crecimiento mientras que los tratamientos con Cyt y ManN muestran un efecto negativo en el crecimiento. Sin embargo, el consumo de glucosa y la generación de lactato fueron similares en todos los cultivos. Otro parámetro que se mantuvo sin alteración fue la producción específica de proteína recombinante. El análisis de las muestras de proteína recombinante cosechada a 48 y a 120 horas post-infección, muestra que la mayoría de las estructuras identificadas para los tres tratamientos (Cyt, ManNAc y ManN) corresponden a formas alta manosa y paucimansa. Se identificaron estructuras complejas (N-acetilglucosamina y galactosa terminales) e híbridas únicamente con la adición de 20 mM de ManNAc y en las tres concentraciones de ManN. En ninguna muestra de proteína se identificaron N-glicanos con ácido síalico terminal.

Capítulo I INTRODUCCIÓN

Una de las aplicaciones de la biotecnología moderna que ha experimentado un gran crecimiento debido a su importancia, es la producción de proteínas recombinantes de interés terapéutico. Debido a su gran potencial para la industria farmacéutica, se utilizan actualmente diversos sistemas de expresión de proteínas. Aunque se ha optado principalmente por producir estas proteínas en cultivos de procariotes o eucariotes inferiores, se debe tomar en cuenta que un factor de suma importancia en las proteínas que serán utilizadas con fines terapéuticos es que deben tener las modificaciones postraduccionales características de las proteínas humanas. Dichas modificaciones postraduccionales solamente se obtienen al expresar la proteína de interés en células de eucariotes superiores. En el desarrollo de sistemas de expresión que cumplan con esta importante cualidad ha predominado el uso de cultivos de células de mamífero. Un sistema de expresión destacado y diferente al de células de mamífero es el sistema células de insecto baculovirus (SCIBV) [1]. Este sistema de expresión consiste en cultivar células de insecto hasta alcanzar una concentración particular para posteriormente ser infectadas con un baculovirus recombinante que contiene el gen de la proteína que va a ser expresada. Este sistema ofrece importantes ventajas sobre otros sistemas de expresión basados en células de mamífero. Entre ellas destaca el ser altamente eficiente, reportándose productividades de hasta 600 mg/L situándose muy por encima de las reportadas para sistemas basados en células de mamíferos [1]. Otras ventajas incluyen la posibilidad de expresar dos o más proteínas recombinantes, su inocuidad al ser humano y al medio ambiente, la facilidad para la obtención de cultivos en suspensión y la facilidad para construir los virus recombinantes. Una cualidad importante de las células de insecto

es que al igual que otras células de eucariotes superiores, pueden realizar modificaciones postraduccionales (acilación, fosforilación, glicosilación) similares a las que se encuentran en las proteínas humanas [2]. Este procesamiento postraducciona es esencial para la funcionalidad de proteínas de interés terapéutico. Muchas propiedades farmacocinéticas dependen de las modificaciones postraduccionales que tenga la proteína que va a ser administrada. Una de estas modificaciones postraduccionales que es determinante en la actividad farmacológica es la glicosilación, ya que es un factor esencial en la inmunogenicidad, solubilidad, permanencia en el torrente sanguíneo, características farmacocinéticas, resistencia a la proteólisis y otras propiedades importantes para la actividad *in vivo* del producto final [3].

Se han manipulado las concentraciones de glucosa y glutamina en el medio de cultivo de células CHO (Chinese Hamster Ovary) con el fin de disminuir la cantidad de lactato y amonio, que son los principales desechos metabólicos, y que se ha visto afectan (sobre todo el amonio) la cantidad y el patrón de glicosilación de proteínas recombinantes [4]. Otro factor importante en la glicosilación de proteínas es la concentración de nucleósidos (citidina y uridina), existen reportes que indican que su adición al medio de cultivo incrementa la disponibilidad de nucleótido-azúcares [5-8]. Estos nucleótido-azúcares en conjunto con las glicosiltransferasas son esenciales para la biosíntesis de glicoconjugados. La disponibilidad intracelular de estos precursores es esencial en el mecanismo de glicosilación. Pels Rijcken y colaboradores [5] demostraron que adicionando 0.5 mM de citidina y uridina a un cultivo de hepatocitos de rata, se incrementaba la concentración intracelular de nucleótido-azúcares (UDP-N-acetilglucosamina, UDP-N-acetilgalactosamina, CTP). También observaron un aumento

significativo en la concentración de nucleótido-azúcares con la adición de N-Acetilhexosaminas. El control de los niveles de nucleótido-azúcares es muy significativo ya que varias enzimas involucradas en su biosíntesis mostraron inhibición por sus productos finales al ser probadas *in vitro* [9]. La inclusión de glucosamina (10mM), uridina (2mM) y N-acetilmanosamina (20mM) en el medio de cultivo mostró un aumento significativo en la concentración de nucleótido-azúcares en células CHO [6], lo cual sugiere que la manipulación del metabolismo de nucleótido-azúcares por medio de la adición de nucleótidos puede promover cambios en el procesamiento de glicoproteínas en células de eucariotes superiores.

Basados en lo anterior, en este trabajo se analizó el efecto de la adición de manosamina, citidina y N-acetilmanosamina, sobre aspectos como el crecimiento, consumo de nutrientes, generación de metabolitos de desecho, producción de proteína recombinante y sobre las glicoformas asociadas a una proteína recombinante producida en el sistema células de insecto-baculovirus.

Capítulo II ANTECEDENTES.

2.1 Sistemas de expresión de proteínas recombinantes.

La expresión de proteínas recombinantes de interés terapéutico ha cobrado gran importancia en la biotecnología moderna, debido principalmente a la gran demanda de éstas por la industria farmacéutica y a su alto valor agregado. Para la expresión de proteínas recombinantes se han empleado diversos sistemas, cada uno de los cuales ofrece características propias debidas al microorganismo y al método empleado para la expresión del gen de interés. Esto es algo que debe tomarse en cuenta para la elección del sistema de expresión adecuado para la proteína que se quiere obtener y evaluar las ventajas y desventajas que ofrece cada sistema. El rendimiento, la conservación del gen de interés y los costos de producción han sido hasta ahora variables determinantes en la elección del sistema de expresión adecuado, sin embargo, otras consideraciones importantes como el procesamiento postraduccional, inocuidad del sistema y escalamiento del proceso, deben también ser tomados en cuenta cuando se trata de proteínas destinadas a su administración en humanos para asegurar la efectividad y seguridad del producto terminado. Los sistemas de expresión que se utilizan actualmente para expresión de proteínas heterólogas utilizan procariotes, eucariotes inferiores, eucariotes superiores y plantas.

A continuación se señalan las características principales de los sistemas de expresión en células procariotas y eucariotas tanto inferiores como superiores.

2.1.1 Sistema de expresión en bacterias.

Escherichia coli ha sido un microorganismo ampliamente empleado para la producción de proteínas recombinantes tanto con fines terapéuticos, como de aplicaciones en la investigación [10, 11]. Una característica muy importante de este microorganismo es que es fácil de crecer y lograr cultivos de alta densidad celular, además se tiene un gran conocimiento sobre su genética y biología molecular, lo cual facilita la clonación de genes y un buen control de la expresión de la proteína recombinante. Se considera un sistema robusto de expresión de genes heterólogos debido a que los protocolos de transformación¹ están muy desarrollados y se dispone de una gran variedad de vectores. El control de la expresión de la proteína recombinante es muy importante, ya que cuando se utiliza a *E. coli* como hospedero para la expresión de proteínas, éstas pueden resultarle tóxicas e inhibir el crecimiento celular, por lo que es necesario controlar la expresión de la proteína mediante el uso de promotores inducibles. El uso de éstos promotores permite una expresión más eficiente de las proteínas heterólogas, ya que el promotor permanece inactivo mientras el cultivo alcanza una alta densidad celular, de esta manera, mientras la bacteria crece, no se pierde el plásmido que expresa la proteína recombinante y se obtiene una gran cantidad de proteína al ser inducida la expresión. En contraste con los altos rendimientos logrados por este sistema de expresión, se presentan algunas desventajas, siendo una de las principales la referente al plegamiento de la proteína expresada, especialmente si se trata de una proteína propia de eucariotes. Si a esto se le suma que no realizan las modificaciones postraduccionales propias de eucariotes superiores (como la glicosilación compleja), hacen que éste sistema convenga poco para la obtención de glicoproteínas funcionales para el consumo humano.

¹ Alteración del fenotipo de un organismo como resultado de la inclusión de ADN foráneo.

2.1.2 Sistema de expresión en levaduras

El sistema de expresión en levaduras ha sido utilizado desde 1980. Las técnicas para transformar *Saccharomyces* con los adecuados vectores de expresión han sido ampliamente desarrolladas, sin embargo, esta levadura ha permanecido sólo como una gran herramienta para la investigación, debido a sus bajos niveles de expresión de proteínas recombinantes y condiciones demandantes en la fermentación. Por todo esto la explotación de *Saccharomyces* como sistema de expresión ha sido reemplazada por una mejor alternativa, la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. Este sistema ofrece las ventajas de *E. coli* (alto nivel de expresión, fácil escalamiento y bajos costos) combinados con las ventajas de la expresión en un sistema eucariote (procesamiento de proteínas, plegamiento y modificaciones postraduccionales similares a las humanas). *Pichia* lleva a cabo la N-glicosilación eficientemente, pero generalmente la cadena de carbohidratos unida a la proteína recombinante difiere de la que se encuentra en la proteína natural, encontrándose sólo ramificaciones de manosa en el “núcleo” del oligosacárido. *Pichia* no puede producir cadenas de oligosacáridos complejos², como los que se encuentran regularmente en muchas proteínas de eucariotes superiores [12].

2.1.3 Sistema de expresión en células de mamífero

En la búsqueda de sistemas de expresión adecuados para la producción de proteínas recombinantes para uso en humanos, el sistema de expresión en células de mamífero presenta la ventaja principal de dar como resultado proteínas con la más alta

² Cadenas de oligosacáridos que fueron procesados por lo menos hasta tener dos N-acetilglucosaminas terminales

similitud a las humanas tanto en plegamiento como en modificaciones postraduccionales. Una de las aplicaciones cruciales del sistema de expresión en células de mamífero es la producción de proteínas terapéuticas como factores de crecimiento y anticuerpos monoclonales, así como en experimentos relacionados con la terapia génica para el tratamiento de enfermedades humanas [11]. La eficiencia de la expresión de genes heterólogos en células de mamífero está determinada por la elección de las células hospedero, método de transferencia del gen, sitios en los cuales los genes heterólogos serán integrados en el genoma del hospedero y la posición de estimuladores de la transcripción presentes en el vector que contiene el gen de interés [13]. Otros rubros importantes son las modificaciones postraduccionales (glicosilación, fosforilación y procesamiento proteolítico), ya que pueden afectar la calidad de la proteína expresada por las células recombinantes.

Un vector de expresión típico de mamíferos contiene una copia del ADN complementario del gen de interés localizado en el extremo 3' del promotor para asegurar una transcripción eficiente; una señal polyA ubicada río abajo, que es requerida para una eficiente terminación de la transcripción. Las secuencias estimuladoras de la transcripción, están usualmente colocadas en 5' del promotor, mientras que un marcador y un origen de replicación son incluidos para la propagación de la expresión en *E. coli*.

Un gran número de sistemas de expresión están disponibles para la expresión heteróloga de una gran variedad de proteínas en células de mamífero. La elección de un determinado sistema vector/hospedero depende, en principio, del nivel de expresión deseado, naturaleza de la expresión (transitoria vs. estable), expresión intracelular o extracelular, y si se quiere expresión constitutiva o inducible.

Actualmente el reto sigue siendo producir proteínas terapéuticas de una manera más económica y es necesario recurrir a sistemas de expresión alternativos que aseguran altos niveles de expresión y que permitan reducir el tiempo entre la construcción del vector de expresión y la producción de la proteína en escala industrial, así como asegurar que la proteína obtenida tenga las características de plegamiento y modificaciones postraduccionales que aseguren una óptima funcionalidad.

2.2 Sistema células de insecto-baculovirus.

2.2.1 Generalidades

En los últimos años, el sistema de expresión en células de insecto ha generado grandes expectativas debido a las grandes ventajas que ofrece para la obtención de proteínas recombinantes. El sistema consiste en infectar un cultivo de células de insecto con un baculovirus recombinante que contiene el gen de la proteína que se quiere expresar. Es un sistema versátil ya que permite la expresión de varios genes a la vez, genera grandes cantidades de proteína recombinante y es capaz de llevar a cabo modificaciones postraduccionales. Por otra parte, las células de insecto se adaptan fácilmente a condiciones de cultivo en suspensión y las proteínas son expresadas en el compartimiento apropiado, es decir, las proteínas de membrana son localizadas en la membrana y las proteínas secretadas lo son en el medio de cultivo [1]. El genoma viral es grande (130 Kb), por lo que pueden ser insertados grandes fragmentos de DNA heterólogo. Los baculovirus no infectan a vertebrados y sus promotores han mostrado no ser activos en células de mamífero, lo cual le confiere a éste sistema la cualidad de ser seguro para la expresión de proteínas para consumo humano.

2.2.2 Baculovirus

Los baculovirus están clasificados en la familia *Baculoviridae*, tienen una nucleocápside de forma alargada de 40-50 nm de diámetro y 200-400 nm de longitud conteniendo una molécula de ADN de doble cadena circular superenrollado. La familia contiene dos géneros, el género *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) y el género *Granulovirus* (GV) [14]. Una característica de NPV es la formación en el núcleo de células infectadas de cuerpos de oclusión (viriones³ encapsulados en una proteína viral cristalina llamada poliedrina). Los baculovirus se pueden encontrar en dos fenotipos: (a) como virus no ocluidos y (b) como virus ocluidos en las células infectadas. En las fases iniciales de la infección (10-20 Hrs. después de la infección) se forman los virus no ocluidos, y el otro fenotipo de virus (los virus ocluidos) son formados entre 20 y 24 Hrs después de la infección [15]. Los cristales de poliedrina en que se encuentran inmersos los virus ocluidos pueden ser de hasta 5 µm de diámetro y contener muchos viriones. Los virus ocluidos son los responsables de la transmisión del virus de insecto a insecto, después de la muerte y descomposición de una larva de insecto infectado, las cápsulas de poliedrina son liberadas a la vegetación y consumidas por otra larva, quien al degradar la matriz de poliedrina en su tracto digestivo, libera a los viriones que infectan a las células del epitelio del intestino medio del insecto. Estas células infectadas liberan virus no ocluidos que son responsables de la infección secundaria una vez que se han propagado a través de la hemolinfa y tráquea. El insecto puede continuar alimentándose hasta por 5-7 días hasta que la cutícula de la larva se melaniza y la estructura muscular es disuelta en un proceso llamado reblandecimiento o licuefacción. La larva eventualmente se destruye liberando

³ Partícula viral que contiene el material genético (ADN), y proteínas asociadas con su genoma para permitir el empaquetamiento de éste y protegerlo de procesos degradativos.

cerca del 25% de su peso en forma de cuerpos de inclusión de poliedrina, con lo cual vuelve a iniciar el ciclo cuando éstos son liberados y consumidos por otra larva [15]. En el caso de la infección en cultivos celulares se utiliza sólo el fenotipo de virus no ocluidos a los que se les ha insertado el gen de interés. En la fig.2.1 se muestra el ciclo de infección de un baculovirus silvestre.

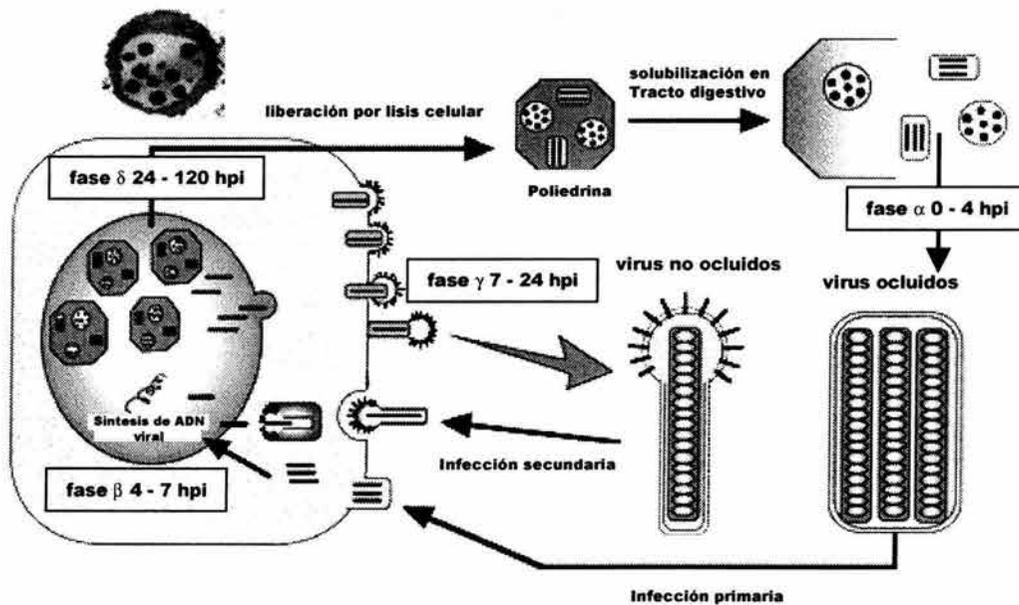


Fig. 2.1 Ciclo de infección de un baculovirus silvestre, en los rectángulos se indican las fases de la infección y la duración de cada una de ellas.

La expresión de genes del baculovirus se lleva a cabo en cuatro fases: inmediata (α), temprana (β), tardía (γ) y muy tardía (δ). Los genes de la fase α son transcritos por la ARN polimerasa II del hospedero. La presencia de los productos de los genes α es necesaria para iniciar la transcripción de los genes β . La síntesis de las proteínas α y β ocurre dentro de las 4-7 h después de la infección y es el tiempo en el que comienza la síntesis del ADN viral. Alrededor de las 7 h post-infección (HPI), las células infectadas muestran hipertrofia del núcleo y acumulación de cromatina granular conocida como

estroma virogénico, esto coincide con el principio de la síntesis de ADN viral y con la transcripción de los genes γ [14]. Entre los polipéptidos γ se encuentran muchas de las proteínas estructurales de los viriones. El ensamblaje de los viriones comienza en el estroma virogénico cerca de las 12-18 HPI. Las nucleocápsides ensambladas durante éste periodo geman del núcleo y son transportadas a la membrana plasmática en donde la proteína viral gp64 es acoplada [15]. La fase muy tardía (δ) comienza a partir de las 20-24 HPI, algunos de los viriones que se encuentran en el núcleo entran en proceso de oclusión, otros salen del núcleo y se transfieren a través de la membrana plasmática hasta el exterior de la célula para diseminar la infección hacia otras células. Dos genes son abundantemente expresados durante la fase muy tardía, después de las 18 HPI, el de *polh* y el de *p10*. La poliedrina es el producto del gen (*polh*), es una proteína de 29 kDa que forma la matriz cristalina que envuelve a los virus ocluidos. La proteína p10 (10 kDa) forma arreglos de fibras largas en el núcleo y ocasionalmente en el citoplasma [15]. La función de ésta proteína no ha sido determinada, pero se ha reportado que la lisis celular se retarda cuando las células son infectadas con virus mutados en *p10*, lo cual puede ser una ventaja al utilizar virus en los que se ha sustituido este gen en la construcción del baculovirus recombinante [16]. En 1983 Smith y colaboradores [17] observaron que los virus que contenían deleciones en el gen de la poliedrina eran estables y se podían replicar en células cultivadas *in vitro*. Aunque las células infectadas con tales virus perdieron la capacidad de formar virus ocluidos, la capacidad de producir virus infectivos no se vio afectada. De esta manera, los virus pueden ser colectados del medio de cultivo y ser usados para infectar a otras células. Debido a que el gen de la poliedrina no es un gen esencial para la infección y propagación del baculovirus en cultivos celulares, la

construcción de un baculovirus recombinante puede llevarse a cabo reemplazando el gen de la poliedrina por el gen de interés, de ésta manera, estando el gen heterólogo bajo la influencia del promotor de la poliedrina, es expresado en lugar del gen de la poliedrina en la fase muy tardía de la infección. Los promotores de estas dos proteínas (p10 y poliedrina) son muy fuertes y de la fase muy tardía, la poliedrina como ejemplo, puede constituir hasta el 50% de la proteína total, por lo que el empleo de estos dos promotores es frecuente para la expresión de proteínas recombinantes [14].

2.3 GLICOSILACIÓN

La glicosilación de proteínas consiste en la adición secuencial de monosacáridos y/o aminoazúcares a la cadena polipeptídica, se trata de la más extensiva de las modificaciones postraduccionales hechas a proteínas por las células eucariotes [18]. Esta modificación involucra la adición y eliminación de oligosacáridos, primero en el retículo endoplásmico (RE) y luego en el aparato de Golgi (AG) antes de que la proteína sea secretada o de que sea transportada a la superficie de la célula. Casi todas la proteínas en la superficie de las células de mamíferos (incluidos los receptores) son glicoproteínas, y la mayoría de las proteínas secretadas son también glicosiladas (con excepciones como la insulina, la hormona del crecimiento y algunas interleucinas). La glicosilación tiene una gran influencia sobre la secreción, solubilidad, estabilidad, antigenicidad y eliminación de la sangre de glicoproteínas [2], en algunos casos los carbohidratos son parte del sitio de unión a ligandos.

2.3.1 Estructura de los oligosacáridos

Se conocen tres distintos tipos de glicosilación que ocurren en plantas y animales superiores:

1. N-glicosilación; los oligosacáridos están unidos al grupo amino de una asparagina, usualmente en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr.
2. O-glicosilación: cadenas pequeñas de oligosacáridos unidos a serina o treonina
3. Monómeros de glucosamina y manosa son incorporados a anclas glicosil-fostadidil-inositol (GPI) de algunas proteínas de membrana.

Además, unidades de fucosa o pequeños glicanos unidos vía Asn-X-Cys se han encontrado en algunas proteínas de la sangre.

2.3.2 N-glicosilación

La N-glicosilación se caracteriza por un enlace glicosídico con el grupo R de una asparagina en la cadena polipeptídica que se encuentra en un core tripéptido o péptido consenso Asn-X-Ser/Thr (donde X es cualquier aminoácido, excepto Asn o Pro) [19]. Sin embargo, la sola presencia de ésta secuencia de aminoácidos no garantiza que será glicosilada, ya que influyen otros factores como la estructura secundaria y el plegamiento, así como su estado dentro del RE. Dentro de los oligosacáridos N-agregados se tienen tres categorías estructurales: complejas, altas en manosa e híbridas. La formación de cada una de estas estructuras va a depender de las etapas que se sigan dentro del proceso de glicosilación. Las tres estructuras contienen la misma estructura central llamada núcleo quitobiosa (fig.2.2a) que consiste de dos N-acetilglucosaminas (GlcNAc) unidas a la asparagina contenida en la secuencia consenso y tres unidades de

manosa, ocasionalmente se encuentra una unidad de fucosa (Fuc) (fig.2.2b) unida a la GlcNAc enlazada a la Asn.

Los oligosacáridos complejos contienen dos o más ramificaciones (fig.2.2c) unidas al núcleo quitobiosa y los términos biantenario, triantenario y tetraantenario se

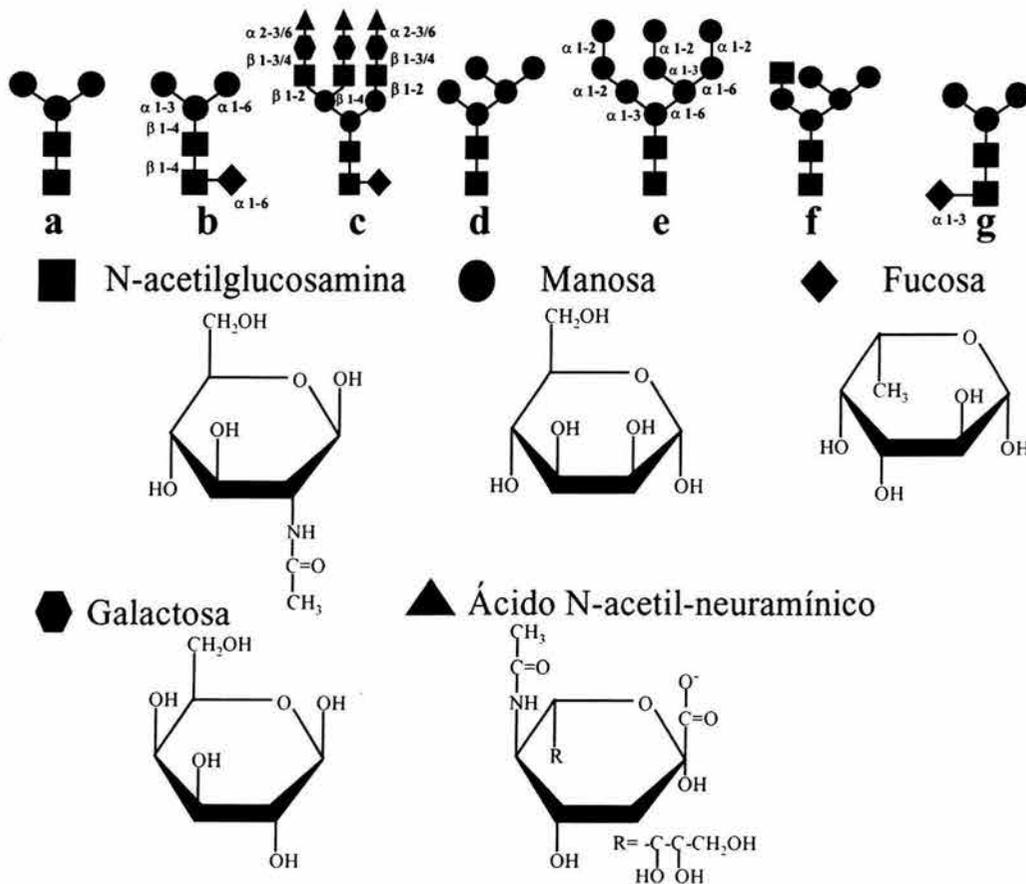


Fig. 2.2 Algunas glicofomas: a) núcleo quitobiosa b) núcleo quitobiosa con fucosa α 1-6, c) compleja, d y e) alta manosa, f) híbrida, g) núcleo quitobiosa con fucosa α 1-3

refieren al número de ramificaciones. Azúcares como GlcNAc, galactosa (Gal), N-acetilgalactosamina (GalNAc), Fuc y ácidos siálicos (N-acetil [NeuAc] y glicolil [NeuGc] ácidos neuramínicos), son añadidos a éstas estructuras.

Las estructuras oligo (5-9) (fig.2.2d) y alta manosa (>9 Man) (fig.2.2e) contienen sólo manosas unidas al núcleo común. Las estructuras híbridas (fig.2.2f) contienen al menos una cadena del tipo compleja y ramificaciones conteniendo solo manosas.

La N-glicosilación se lleva a cabo tanto en el retículo endoplásmico (RE) como en aparato de Golgi (AG), es controlada por un gran número de glicosiltransferasas y glicosidasas. Las glicosiltransferasas son agrupadas en familias en función del tipo de azúcar que transfieren a la proteína (Ej. Galactosiltransferasas y sialiltransferasas, que transfieren galactosas y ácido siálico respectivamente). Teóricamente, si todas las enzimas en la vía se encuentran activas, los nucleótido-azúcares necesarios están disponibles y no se tienen limitaciones estructurales, todos los glicanos serán completamente procesados a estructuras complejas con ácidos siálicos terminales. No obstante, en la práctica esto es raramente observado y lo que se obtiene es una mezcla de glicanos procesados total o parcialmente.

En la figura 2.3 se muestra un esquema de la biosíntesis de N-glicanos. Un glicano común característico ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) es puesto en el acarreador lipídico dolicol pirofosfato, primero en el citoplasma y después en el RE. Este oligosacárido se une a la asparagina de la cadena polipeptídica naciente y entra en el RE. La enzima responsable de catalizar esta reacción es la oligosacariltransferasa y se encuentra asociada al ribosoma (paso 1). Dentro del lumen del RE las tres glucosas terminales son removidas por una α -glucosidasa, y la estructura resultante es $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (pasos 2 y 3) y es modificada a $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ por la α 2-manosidasa (paso 4). Esta estructura es transportada al *cis*-Golgi en donde vuelven a actuar las manosidasas resultando en una estructura $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (paso 5), ésta es sustrato de la GlcNAc transferasa I y adiciona GlcNAc a la antena 1-3 (paso 6), la presencia de GlcNAc en este brazo del glicano actúa como una señal para posibles modificaciones posteriores, éstas incluyen la remoción de las manosas terminales remanentes (manosidasa II, paso 7); adición de una antena más de

GlcNAc (GlcNAc transferasa II, paso 8) y residuos bisectados de GlcNAc (GlcNAc transferasa III); creación de más ramificaciones (GlcNAc transferasa IV y GlcNAc transferasa V) y la α 6-fucosilación del núcleo quitobiosa (paso 9) [18]. Esta fucosilación es una característica estructural común entre los N-glicanos. Otra fucosilación común que ocurre en los N-glicanos de plantas e invertebrados es la adición de fucosa en enlace α 1-3 con la GlcNAc unida a la asparagina (Fig. 2.2g), la cual resulta inmunogénica en mamíferos.

Un mismo sitio de N-glicosilación en diferentes moléculas de una proteína puede

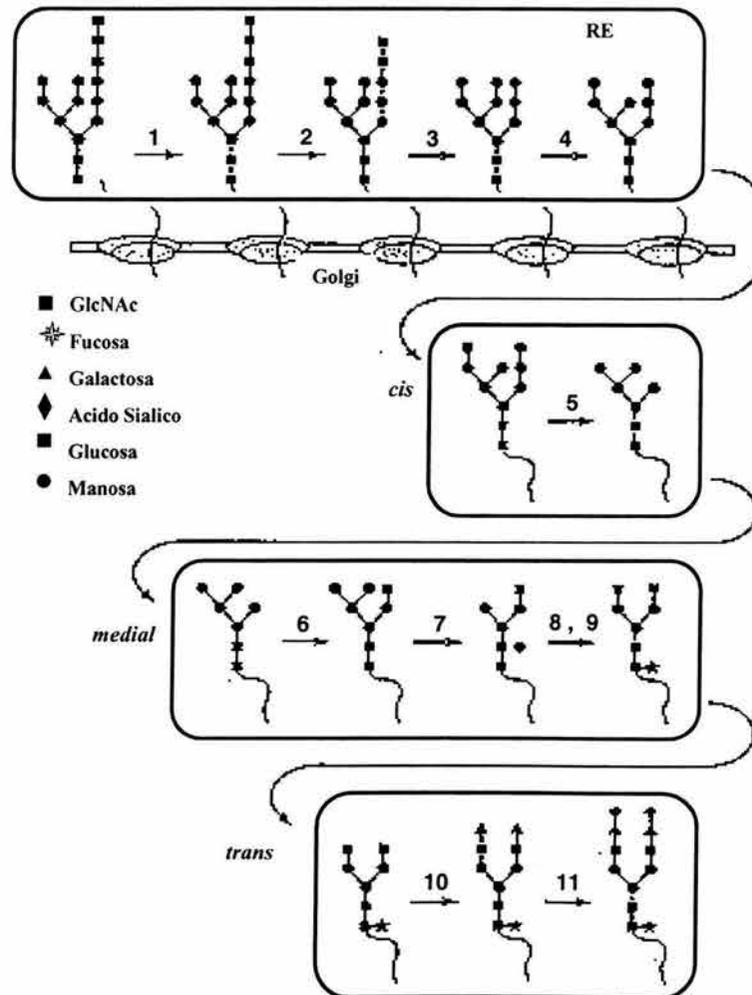


Fig. 2.3 Procesamiento de N-glicanos en RE y Golgi. En el diagrama se muestran las reacciones realizadas en el RE (1-4) y en las diferentes secciones del aparato de Golgi (5-11). [17]

contener diferentes estructuras de glicanos, ésto es conocido como microheterogeneidad, y el término macroheterogeneidad se refiere a la ocupación de los diferentes sitios de N-glicosilación en una proteína.

2.3.3 Glicosilación en células de insecto

La capacidad de un procesamiento postraduccional completo de las proteínas expresadas en células de insecto es particularmente importante en la producción de proteínas de interés terapéutico. El procesamiento postraduccional de proteínas en el uso del sistema células de insecto-baculovirus para producir proteínas recombinantes ha cobrado gran interés. Las células en cultivo pueden llevar a cabo O-glicosilación y N-glicosilación, fosforilación, miristilación y palmitoilación, así como el correcto plegamiento de proteínas y sus sitios activos [20].

Los resultados de los estudios realizados en este sistema de expresión son inconsistentes e incluso contradictorios. Kuroda [21] y colaboradores mostraron que una hemaglutinina expresada en células Sf-9 carece de galactosa y ácido siálico, sin embargo, el plasminógeno humano expresado en células Sf-21AE contenía carbohidratos complejos incluyendo la adición de ácido siálico tal y como se encuentra normalmente en la proteína nativa [22], siendo éste el primer reporte de glicosilación compleja de proteínas recombinantes producidas en células de insecto. Reportes posteriores coinciden en que los N-glicanos encontrados en glicoproteínas expresadas en las líneas celulares Sf-9 y Sf-21 son sólo del tipo alta manosa (fig.2.2e), oligosacáridos truncados denominados paucimansa (fig.2.2a) ($\text{Man}_{3-2}\text{GlcNAc}_2$) ocasionalmente incluyendo estructuras con fucosa unidas en α 1-6 [23]. Otros estudios muestran que las glicoproteínas expresadas en ciertas líneas celulares pueden sintetizar oligosacáridos híbridos y complejos; el análisis

de los N-glicanos encontrados en el interferón- γ producido en células Ea-4 de *Estigmene acrea* confirma la presencia de estructuras complejas, híbridas, paucimanosas y altas en manosa [24].

En 2003 Palomares [25] y colaboradores hicieron la caracterización de dos líneas celulares, A7S de *Pseudaletia unipuncta* y DpN1 de *Danaus plexippus*. También analizaron los glicanos obtenidos de la proteína recombinante expresada (Fosfatasa alcalina secretada, SeAP), y se compararon las actividades de dos enzimas clave en el procesamiento de N-glicanos complejos, la β 1-4 galactosiltransferasa (GalT) y la β N-acetilglucosaminidasa (GlcNAcasa), ésta última elimina las N-acetilglucosaminas terminales de la estructura que recién se ha fucosilado (Fig. 2.7), resultando en una estructura que ya no puede seguir siendo procesada. Los resultados muestran un alto porcentaje de estructuras complejas y sialidades producidas por la línea celular DpN1 y sólo estructuras alta manosa y paucimanosa en A7S. La actividad de GalT fue mayor en DpN1 (10 pmol/mgh) e indetectable en A7S, en cuanto a la GlcNAcasa, también DpN1 fue la que mostró mayor actividad (3.5 pmol/mgh), pero también fue alta en A7S (1.5 pmol/mgh) comparada con la actividad en Tn5B1-4 (0.7 pmol/mgh). Las tres líneas celulares mostraron una gran cantidad de formas paucimanosa, lo cual indica una alta actividad GlcNAcasa que evita que se tenga un procesamiento completo.

Los trabajos realizados anteriormente sugieren que las células de insecto poseen el potencial para realizar un procesamiento postraduccional completo, aspectos como la actividad de glicosidasas y glicosiltransferasas, así como las condiciones de cultivo y disponibilidad de nucleótido-azúcares deben ser tomados en cuenta con el fin de auxiliar a la célula para realizar N-glicosilación compleja.

2.4 METABOLISMO EN CÉLULAS DE INSECTO

2.4.1 Principales fuentes de carbono

Los requerimientos nutricionales para el crecimiento de líneas celulares de insecto *in vitro* han sido ampliamente estudiados y se han establecido también las rutas metabólicas para la degradación de estos nutrientes y la generación de metabolitos de desecho [26, 27]. Los primeros medios de cultivo formulados para células de insecto fueron formulados basándose en los componentes encontrados en la hemolinfa de insectos [28].

Las principales fuentes de carbono utilizadas por células de insecto son la glucosa y la glutamina [28-30], pero requieren también, además de otros nutrientes, la adición de factores de crecimiento, lípidos, hormonas y elementos traza. El suero fetal bovino (SFB) es generalmente empleado con el fin de aportar éstos elementos, así como para proporcionar protección contra el estrés hidrodinámico en células que crecen en cultivos suspendidos. Es importante mencionar que las células de insecto no pueden crecer sin SFB o sin los sustitutos que han sido diseñados para reemplazarlo y que son añadidos a los medios de cultivo libres de suero [1]. Otros azúcares como fructosa y maltosa son también utilizados para el crecimiento, pero la glucosa es la fuente de carbono preferida por la células, Neermann y Wagner [31] encontraron que el 60% de la glucosa consumida por las células de insecto es degradada a CO₂, y el restante 40% es empleado para biosíntesis y que la glutamina aporta sólo el 8% de la energía total empleada por las células.

Aminoácidos, lípidos y vitaminas son también nutrientes importantes para el crecimiento de células de insecto. Asn, Met, Asp, Ser, Leu, Cys y Glu son lo aminoácidos

con mayor índice de consumo [26, 32, 33]. Los requerimientos nutricionales de las células de insecto después de la infección viral se ha considerado que permanecen sin cambio, sin embargo, esto es dependiente de la línea celular y de la proteína recombinante expresada [34, 35], pocos grupos de investigación han estudiado en detalle la cinética de consumo de los nutrientes después de la infección. Wong y colaboradores [36] reportan un incremento en el índice específico de consumo de ciertos aminoácidos en algunos casos de hasta un orden de magnitud, mientras que el consumo de glucosa y glutamina permanecen sin cambios.

Algunos metabolitos de desecho como el amonio, lactato y otros ácidos orgánicos (piruvato, α -cetoglutarato, fumarato) pueden acumularse durante la fase de crecimiento y durante la fase de infección. El lactato y el amonio son los principales metabolitos de desecho resultantes del metabolismo de la glucosa y la glutamina [27]. La producción de lactato en células de insecto es generalmente baja en comparación con lo que se genera en cultivos de células de mamífero y no se han encontrado efectos limitantes en el crecimiento a altas acumulaciones de lactato [37, 38]. La acumulación de metabolitos de desecho ha mostrado ser dependiente de la línea celular y no se ha encontrado que limiten el crecimiento las concentraciones acumuladas de amonio o lactato en células de insecto.

Otro factor esencial para el crecimiento de las células de insecto es el oxígeno. Mismo que funciona como aceptor final de electrones en la cadena de transporte electrónico (proceso de fosforilación oxidativa para la generación de energía). En las células de insecto, la glicólisis aumenta a bajas concentraciones de oxígeno, observándose un incremento en la generación de lactato. El metabolismo de los principales nutrientes se muestra esquemáticamente en la figura 2.4.

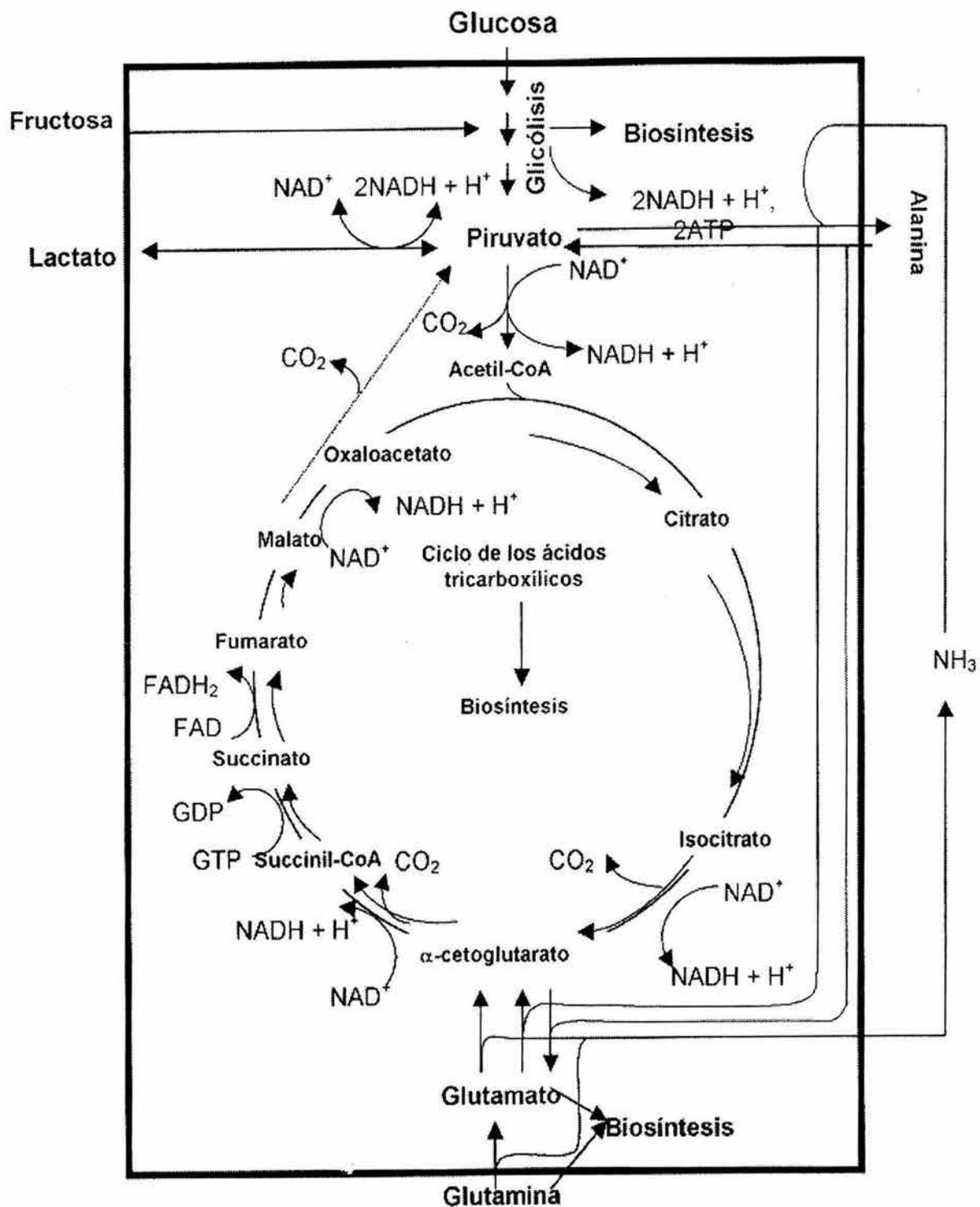


Fig. 2.4 Metabolismo de glucosa y glutamina en células de insecto [1]

2.5 Metabolismo de monosacáridos y biosíntesis de precursores

La biosíntesis de glicanos requiere la conversión de monosacáridos a nucleótido-azúcares activados (NAP) que son los donadores de azúcares a los aceptores que utilizan las glicosiltransferasas específicas. Para llevar a cabo esto, los monosacáridos deben ser importados al interior de la célula, recuperarlos de glicanos degradados o derivarlos de otros azúcares dentro de la célula. Ya que la mayoría de las reacciones de glicosilación ocurren en Golgi, la internalización de los azúcares, interconversión y activación ocurren en el citoplasma y se requiere de transportadores específicos que lleven los donadores activados hasta Golgi [18].

En la figura 2.5 se muestra la reacción por medio de la cual un nucleótido trifosfato como la uridina trifosfato (UTP) reacciona con un glicosil-1-P para formar un donador alto en energía para participar en la síntesis de glicoconjugados [19].

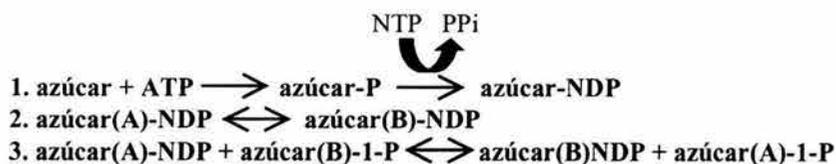


Fig. 2.5 Reacciones de formación de donadores de alta energía.

Los NAP más comunes se enlistan en la tabla 2.1. El ácido siálico es el único monosacárido que es activado como mononucleótido, CMP-Sia.

Monosacárido	Forma activada
Glucosa Galactosa N-acetilglucosamina N-acetilgalactosamina Ácido glucurónico Ácido iudurónico Xilosa	UDP- monosacárido
Manosa Fucosa	GDP-monosacárido
Ácido siálico	CMP-Sia

Tabla 2.1. Donadores activados y monosacáridos precursores

2.5.1 Activación e interconversión de monosacáridos.

Las principales vías para activación de azúcares e interconversión de monosacáridos se muestran en la fig. 2.6

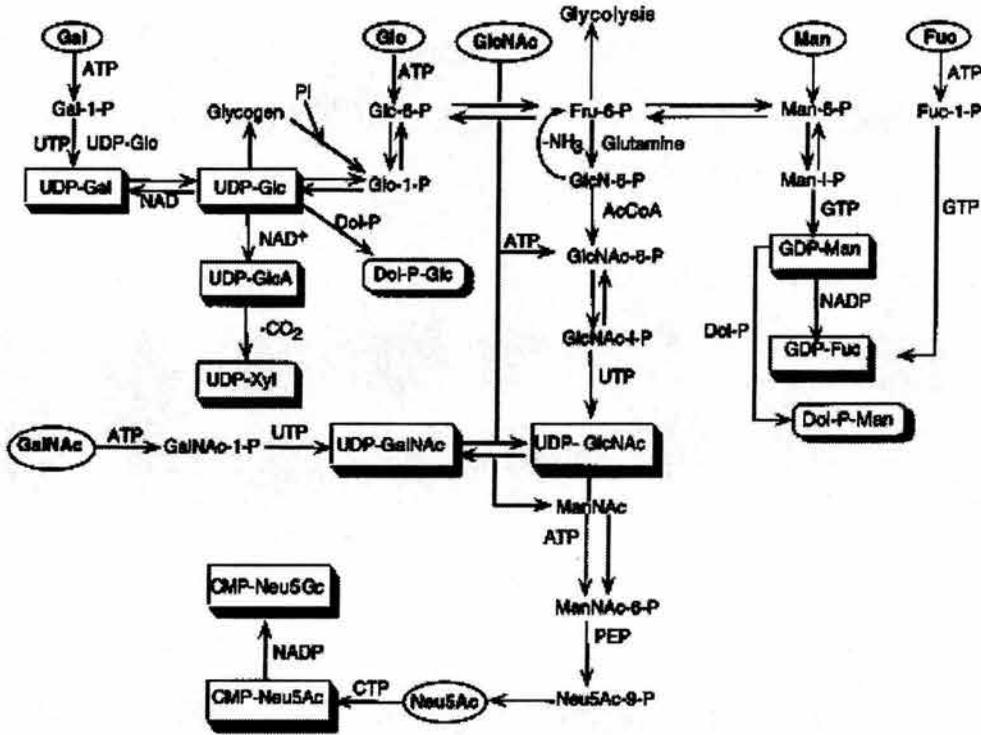


Fig. 2.6 Biosíntesis e interconversión de monosacáridos, los donadores activados se muestran en rectángulos sombreados y los monosacáridos en óvalos. [9]

Los primeros pasos involucrados en la conversión de monosacáridos obtenidos de la dieta, de procesos de reciclaje o de la recuperación en NAP, implican la fosforilación de uno o más de los grupos hidroxilo de los monosacáridos además de la inversión de estereocentros para convertir a un determinado azúcar en su correspondiente epímero [9]. En algunos casos es necesaria la acción secuencial de una o más enzimas para la biotransformación. El hecho de que los NAP contengan un grupo funcional de alta energía facilita la transferencia al glicoconjugado naciente por medio de la

glicosiltransferasa específica que le corresponde [18]. La composición exacta del producto final está determinada, en parte, por la ruta que haya seguido el oligosacárido al ser procesado, así mismo de la vía secretora y del contacto con determinadas glicosiltransferasas y la disponibilidad de NAP. Esto puede resultar en que a una proteína se le puede agregar un determinado oligosacárido, mientras que otra proteína idéntica que ha tenido diferencias en cuanto al contacto con glicosiltransferasas y la existencia de los NAP necesarios, tenga un oligosacárido diferente unido al mismo sitio de glicosilación.

Varios grupos de investigación se han dedicado a estudiar el efecto en la glicosilación al aumentar la concentración intracelular de NAP [5, 7, 39, 40]. Para lograr aumentar la concentración de NAP se adicionan al medio de cultivo nucleósidos (uridina, citidina) o aminoazúcares (N-acetilglucosamina, N-acetilmanosamina). Estos tratamientos han sido aplicados en su mayoría a células de mamífero (BHK, CHO, hepatocitos) y algunos en células de insecto (Sf-21, Tn5B1-4), observando un aumento en la concentración intracelular de NAP, y al adicionar nucleósidos o aminoazúcares marcados radiactivamente, la incorporación de éstos en los glicoconjugados analizados [5]. Tomiya y colaboradores [7] determinaron la concentración intracelular de NAP en dos líneas celulares de insecto y las compararon con las encontradas en células de mamífero, encontrando altas concentraciones de UDP-GlcNAc, UDP-Gal y UDP-Glc en células de insecto, no así de CMP-NeuNac, ya que este NAP no pudo ser detectado en ninguna de las dos líneas celulares de insecto.

Xuejun Gu y colaboradores [6] adicionan N-acetilmanosamina al medio de cultivo y observan un aumento del 15% en la silalilación de interferón- γ producido en células CHO, así mismo, observan un aumento de tres veces en la concentración

intracelular de CMP-Sia y utilizando N-acetilmanosamina marcada radiactivamente encuentran que casi el 100% de la sialilación fue originada por la adición de éste precursor. En experimentos similares hechos con células CHO para producir interferón- γ , adicionando Uridina y Glucosamina con el fin de aumentar la concentración de UDP-Nacetilhexosaminas, encuentran un efecto negativo en la sialilación de la proteína, atribuible a que ese aumento en la concentración de UDP-Nacetilhexosaminas compite con el transportador que se encarga de llevar el CMP-Sia desde el núcleo en donde es sintetizado hasta Golgi en donde es sustrato de la sialiltransferasa.

En células de insecto, Joshi y colaboradores [39] producen una proteína sialidada al agregar N-acetilmanosamina al medio de cultivo y realizando la producción en un reactor HARV (High Aspect Ratio Vessel). Donaldson y colaboradores [41] reportan un aumento en glicofomas con N-acetilglucosamina terminales y una reducción en las estructuras con manosas terminales, al adicionar manosamina al medio de cultivo. Todos estos trabajos realizados muestran que el procesamiento postraducciona l de glicoproteínas recombinantes puede ser modificado y lograr que las células de insecto lleven a cabo la N-glicosilación hasta el nivel de estructuras complejas e incluso sialidadas aumentando la disponibilidad de los sustratos para las glicosiltransferasas.

Partiendo de estas evidencias, en este trabajo se propuso evaluar el efecto de la adición de citidina, N-acetilmanosamina y manosamina sobre la glicosilación de una glicoproteína producida en el sistema células de insecto-baculovirus. La glicoproteína elegida para realizar este trabajo fue la Fosfatasa alcalina humana. El cDNA de la fosfatasa alcalina de placenta (PLAP) fue aislado y secuenciado de placenta humana [42]. La PLAP nativa contiene una secuencia señal que la transporta y la ancla a

membrana, lo cual resulta en la inmovilización de la PLAP en la superficie de las células de mamíferos [43]. Berger y colaboradores [44] truncaron el gen de la PLAP en el extremo 3' para remover la región de anclaje a membrana en el carboxilo terminal. La fosfatasa alcalina truncada (fosfatasa alcalina secretada, SeAP) sintetizada en células de mamíferos es transportada a membrana y secretada al medio de cultivo. Esta construcción fue introducida en un baculovirus por Davis [45] y donada a nuestro laboratorio por M. Shuler (Cornell University, Ithaca, N.Y). La SeAP tiene un peso molecular aparente de 64 KDa y tiene dos sitios potenciales de N-glicosilación, de los cuales sólo uno está glicosilado [44]. Puede ser cuantificada por un procedimiento rápido y muy sensible (ver materiales y métodos), que además de no ser costoso permite detectar concentraciones de hasta 20 picogramos por mililitro [45]. Todas estas características hacen de la SeAP un excelente modelo de estudio aplicable a glicoproteínas expresadas en cultivos celulares.

En este trabajo se describen tres intentos por modificar el patrón de glicosilación de una proteína recombinante expresada mediante el sistema células de insecto-baculovirus, mediante la adición de tres sustancias (Cyt, ManNAc y ManN) que intervienen en el proceso de formación de oligosacáridos.

El nucleósido citidina (Cyt) interviene en la vía de síntesis del donador activado (CMP-NeuNAc) que utiliza la sialiltransferasa para agregar ácidos síalicos a las glicoproteínas que están siendo post-traduccionalmente procesadas en el aparato de Golgi (fig. 2.7). La síntesis de CMP-NeuNAc comienza en el citoplasma transformando N-acetilmanosamina en ácido N-acetilneuramínico, el cual posteriormente entra al núcleo en donde se convierte en CMP-NeuNAc mediante la acción de la enzima CMP-ácido-N-acetilneuramínico sintasa utilizando citidina trifosfato (CTP). De esta manera, el objetivo

de la adición de citidina es el incrementar la activación de NeuNAc y favorecer la sialilación de la glicoproteína producida.

Al igual que en el caso de citidina, el objetivo de adicionar N-acetilmanosamina (ManNAc) a los cultivos celulares es favorecer la biosíntesis del precursor del ácido siálico (fig 2.7). En otros trabajos realizados tanto en cultivos de células de insecto como de células de mamífero se ha adicionado N-acetilmanosamina, logrando en algunos de ellos, efectos favorables en la sialilación de la proteína heteróloga expresada [5, 6, 8, 39].

Si bien la manosamina (ManN) no es un precursor directo de ninguno de los nucleótido- azúcares (fig.2.7), su adición a los cultivos deriva de la evidencia mostrada en un estudio realizado por Donaldson y colaboradores, en el que al agregar manosamina en cultivos de células Sf-21 y H5 observan un incremento de estructuras con N-acetilglucosaminas terminales [41].

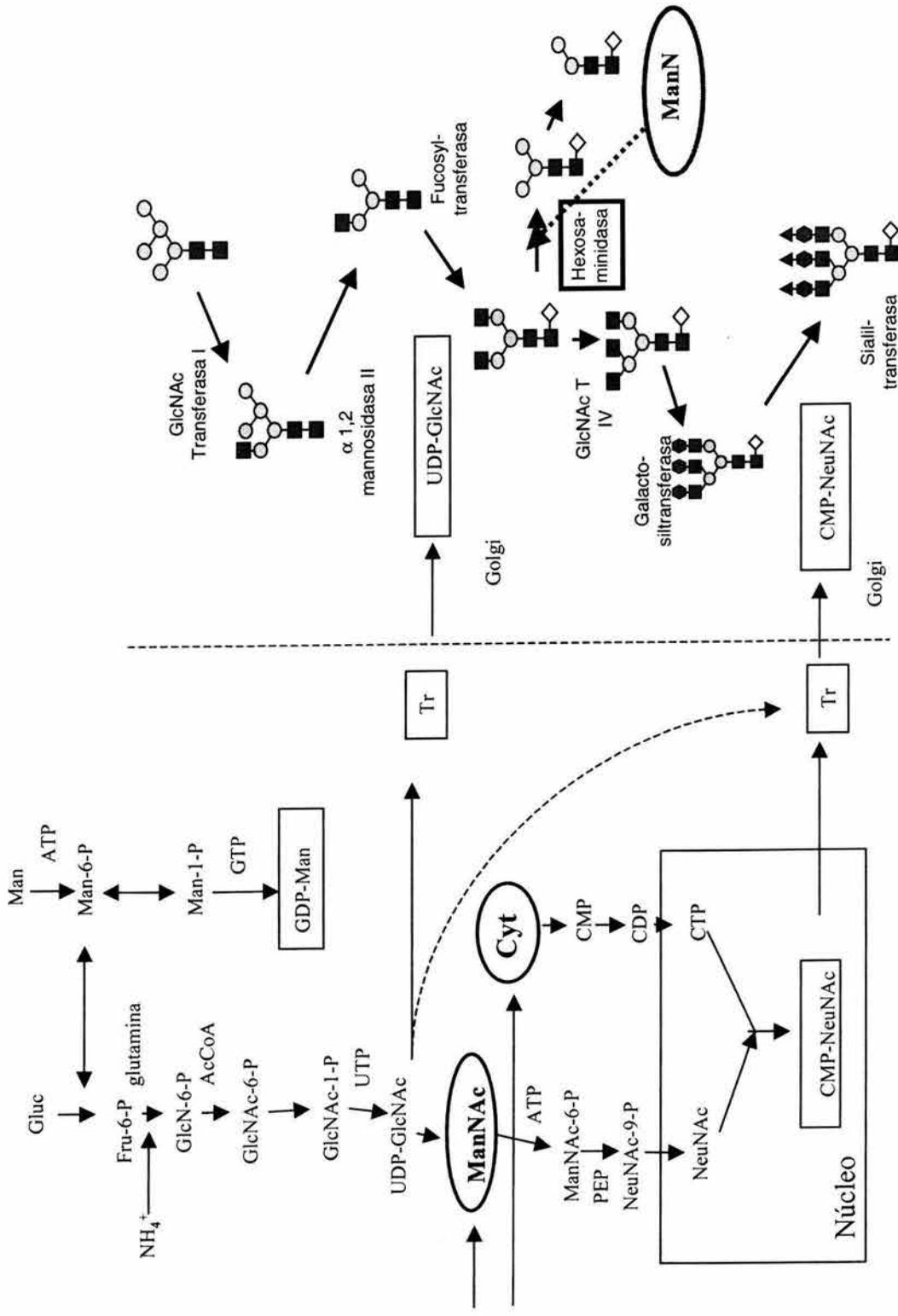


Figura 2.7 Biosíntesis de precursores y procesamiento de N-glicanos en Golgi. Se indican en óvalos las sustancias adicionadas y el lugar en el que participan.

Capítulo III OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar cómo la adición de manosamina, N-acetilmanosamina y citidina, afectan la composición de N-glicanos de una glicoproteína recombinante producida por el sistema células de insecto-baculovirus.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Adicionar manosamina (5, 10 y 20 mM), N-acetilmanosamina (5, 10 y 20 mM) y citidina (0.5, 1 y 1.5 mM) a cultivos celulares de insecto (Tn5B1-4) realizados en matraces agitados, para evaluar su efecto en:

- Crecimiento y viabilidad celular
- Consumo de glucosa y generación de lactato
- Producción de proteína recombinante

3.2.2 Separar los glicanos asociados a la proteína recombinante producida y purificada de cada cultivo para su análisis en electroforesis capilar y evaluar el efecto de la adición de cada una de éstas sustancias en la N-glicosilación de la proteína recombinante.

Capítulo IV MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Línea celular

Células BTI-Tn5B1-4 (High Five[®]) de *Trichoplusia ni* fueron cultivadas en medio SF900II (Gibco) al cual se le añadió 0.1% de Pluronic F-68[®]. Inicialmente los cultivos se hicieron en frascos estáticos de 25 y 75 cm², y posteriormente se iniciaron los cultivos suspendidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL agitados a 115 RPM, con un volumen de trabajo de 30 mL y a una temperatura controlada de 27°C. Todos los cultivos suspendidos fueron iniciados a una concentración inicial de 0.2×10^6 células/mL. A los matraces se les aplicó un tapón de espuma de silicón para asegurar una buena transferencia de oxígeno.

4.2 Criopreservación de la línea celular

Las células destinadas a la criopreservación deben encontrarse en la fase exponencial de crecimiento y con una viabilidad mayor al 98%. Con el objeto de proteger a las células de un choque osmótico y de la formación de cristales de hielo en el interior, se le agregó al medio de cultivo dimetilsulfóxido (DMSO) y suero fetal bovino (FBS). La metodología utilizada es una variante de la reportada por O'Reilly [16] y Meneses [46]:

1. Centrifugar las células a 800 RPM durante 10 min.
2. Resuspender el pellet celular en medio fresco añadido con 40% de FBS, para obtener una densidad celular de 20×10^6 células/mL.
3. Preparar medio de cultivo conteniendo 15% de DMSO.
4. Colocar 500 µL de medio con células y 500 µL de medio con DMSO en viales para criopreservación de 2 mL.

5. Los viales son colocados en cajas de cartón sobre un lecho de algodón y se almacenan a 4°C por 1 hora y a -70°C por 24 Hrs.

6. Finalmente se almacenan en los criotankes con nitrógeno líquido.

El descongelamiento de las células debe hacerse lo más rápido posible, procediéndose de la siguiente manera:

1. Preparar un tubo Corning® de 15 mL con 4 mL de medio de cultivo.
2. Descongelar el vial en agua a 27°C
3. Colocar el contenido del vial en el tubo y centrifugar a 400 RPM durante 8 min.
4. Descartar el sobrenadante y resuspender las células con 5 mL de medio fresco.
5. Colocar el contenido del tubo en un frasco T-25 y ponerlo en la incubadora a 27°C.

4.3 Baculovirus.

El baculovirus recombinante es un derivado de AcNPV, contiene el gen de la fosfatasa alcalina secretada (SeAP) bajo el control del promotor de la polihedrina. El stock viral fue amplificado en células Sf-9, su título es de 1×10^9 UFP/mL fue estimado por la técnica de end-point-dilution y se conserva con 5% de suero fetal bovino a 4°C, protegido de la luz.

4.4 Determinación del título viral por la técnica de end-point-dilution

Para esta técnica es importante que las células Sf-9 que habrán de emplearse se encuentren en fase de crecimiento exponencial y con una viabilidad mayor al 95% [16].

1. Colocar 100 μ L de células en medio fresco a una densidad de 1×10^5 células/mL en placas para cultivo celular de 96 pozos.

2. Poner las placas en la incubadora a 27°C durante 30 min.
3. Hacer diluciones decimales del stock viral que se va a titular de 10⁻¹ hasta 10⁻⁸ (50µL del stock viral y 450 µL de medio).
4. Colocar 10 µL de cada dilución por pozo, una dilución para cada fila de la placa , utilizando sólo 10 columnas, ya que dos columnas se usarán como control (sin infectar).
5. Incubar las placas a 27°C durante 10 días, teniendo la precaución de colocarlas en lechos húmedos para evitar la evaporación del medio de cultivo.
6. Comparar la morfología celular (tamaño, apariencia y confluencia celular) de los pozos infectados contra los pozos control.
7. El virus se almacena a 4°C con FBS al 5%.

4.5 Cultivos en matraces agitados.

Las cinéticas de producción de proteína recombinante fueron realizadas en matraces de 250 mL con un volumen de trabajo de 30 mL, agitados a 115 rpm y a una temperatura controlada de 27°C. En todos los casos, los cultivos fueron iniciados a una densidad celular de 0.2 x10⁶ células/mL.

Preparación de un cultivo Stock suspendido:

1. Poner a 27°C el medio de cultivo SF900II adicionado con 0.1% de Pluronic F-68[®], y colocar 15 mL en un matraz Erlenmeyer de 250 mL estéril con tapón de espuma de silicón.
2. Tomar un frasco T-75 conteniendo la línea celular en 15 mL de medio de cultivo y sacudirlo suavemente para despegar las células de la superficie interna del frasco.

3. Con una pipeta estéril de 25 mL tomar las células resuspendidas y colocarlas en el matraz de 250 mL.
4. Colocar el matraz en una incubadora a 27°C y con agitación orbital a 115 rpm.
5. Monitorear la viabilidad y la densidad celular cada 24 hrs.

4.6 Determinación de viabilidad celular por exclusión con azul de tripano.

La determinación de la viabilidad celular se hizo mediante conteo en una cámara de Neubauer. El azul de tripano penetra en las células no viables distinguiéndose perfectamente de las células viables al adquirir un color azul. A fin de que el método sea confiable, se debe procurar que la dilución que se prepare permita contar en cada campo de la cámara un mínimo de 20 y un máximo de 50 células. El procedimiento realizado fue el siguiente:

1. Preparar el colorante de azul de tripano al 10% en buffer de fosfatos pH 7.4
2. Preparar una dilución de la muestra a analizar en un volumen conocido de azul de tripano.
3. Contar las células en los 10 campos de la cámara de Neubauer.
4. Sumar el número de células teñidas y células no teñidas de los 10 campos para obtener el número de células totales.
5. Determinar el porcentaje de viabilidad (%V)

$$\%V = (\text{número de células no teñidas} / \text{número de células totales}) \times 100$$

4.7 Determinación de la concentración celular en el contador de partículas Coulter Counter.

El Coulter Counter es un aparato electrónico utilizado para contar partículas y consiste en un electrodo por el cual, mediante un orificio (diámetro de 100 μm) pasan las partículas que han sido suspendidas en una solución salina isotónica, cada vez que una célula pasa por éste se interrumpe la corriente en el electrodo y cada disrupción es registrada, dando por resultado un gráfico de distribución de tamaños de partícula. Con la finalidad de precisar la medición, se acotan los límites de tamaños de partícula de acuerdo al tamaño de las células que se estén utilizando. Para el caso de células BTI-Tn5B1-4 (High Five[®]), los límites fueron establecidos entre 6 y 30 μm , ya que el tamaño promedio de estas células es de 15 μm . El número de partículas contadas que reporta el Coulter Counter es multiplicado por el factor de dilución, obteniéndose de esta manera el número de células por mililitro en la muestra analizada.

4.8 Inicio de la cinética de producción de proteína recombinante.

Cada cinética de producción de proteína constaba de un total de 24 matraces (6 para cada concentración). Para cada concentración ensayada se tenían dos matraces

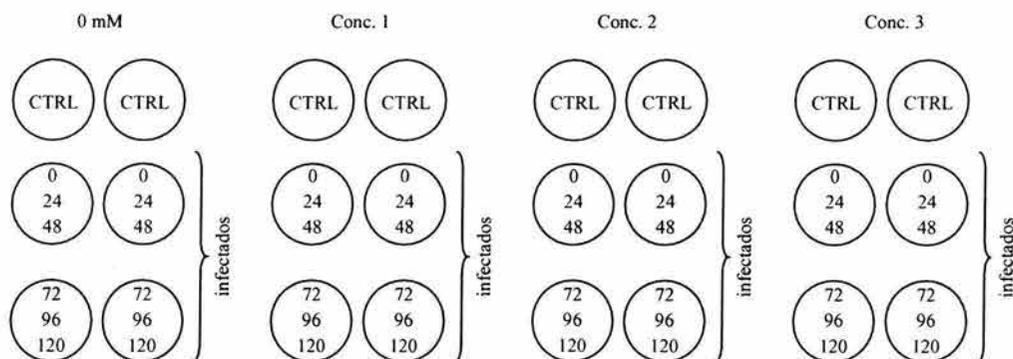


Figura 4.1 Esquema de cinéticas de producción. Los círculos representan matraces. Los números dentro de los círculos representan las horas post-infección a las que fue muestreado cada matraz.

control (no infectados) que eran muestreados cada 24 hrs durante todo el curso de la cinética (fig. 4.1), dos matraces infectados para ser muestreados a los tiempos 0, 24 y 48 hpi y tener una primera cosecha de proteína a las 48 hpi y dos matraces infectados para ser muestreados a los tiempos 72, 96 y 120 hpi y cosechar la proteína a las 120 hpi.

Para procurar la homogeneidad en todos los matraces al momento de iniciar la cinética, se hizo crecer un inóculo inicial de 750 mL a 0.2×10^6 células/mL en un matraz de 2 L, originado de un cultivo stock suspendido de 60 mL que se encontraba en la fase exponencial de crecimiento y con una viabilidad superior al 96%, para después poner 30 mL en cada matraz de la cinética, asegurándose de agitar en cada vez el matraz de 2 L para lograr una concentración celular uniforme en cada matraz de la cinética de producción.

4.9 Tratamiento de los cultivos

Para lograr las concentraciones deseadas de manosamina (5, 10 y 20 mM) y N-acetil-manosamina (5, 10 y 20 mM) en el medio de cultivo se preparó una solución stock 0.5 M de manosamina y 0.5 M N-acetil-manosamina (Sigma-Aldrich). En el caso de citidina, las concentraciones deseadas fueron de 0.5, 1 y 1.5 mM para lo cual se utilizó una solución stock 0.125 M de citidina (Sigma-Aldrich).

4.10 Infección

Las células fueron infectadas a una multiplicidad de infección (MDI)⁴ de 1 UFP/célula y a un tiempo de infección (TDI)⁵ de 1.5×10^6 Células/mL. Los cultivos se iniciaron inoculando a 0.2×10^6 células /mL, se procedió a hacer un seguimiento de la densidad celular del cultivo y cuando se ha alcanzado una concentración de 1.5 millones de células por mililitro se procedió a infectar el cultivo.

4.11 Análisis de metabolitos

La medición del consumo de nutrientes y liberación de metabolitos se hizo mediante un analizador bioquímico YSI 2700. La medición de éstos se hace por medio de reacciones enzimáticas. Una enzima específica para el sustrato de interés es inmovilizada entre dos membranas, una de policarbonato y una de acetato de celulosa. El sustrato es oxidado al entrar en contacto con la enzima inmovilizada, produciendo peróxido de hidrógeno, el cual pasa a través de la membrana de acetato de celulosa hasta un electrodo de platino en donde es oxidado. La corriente resultante es proporcional a la concentración del sustrato.

4.12 Cuantificación y purificación de la SeAP

La cuantificación de SeAP se hizo directamente con una pequeña cantidad del sobrenadante del cultivo, mediante una reacción rápida que utiliza p-nitrofenol-fostato como sustrato, dando como resultado una coloración amarilla que es detectada en un

⁴ La MDI se define como el número de unidades formadoras de placa (UFP) de virus por cada célula en el cultivo, se estima que en una unidad formadora de placa se encuentran 500 partículas virales [48].

⁵ El TDI es en realidad, la concentración celular a la cual se infecta el cultivo, el tiempo en que el cultivo alcanza esta concentración celular está en función de varios factores como el inóculo inicial, viabilidad, medio de cultivo, etc.

espectrofotómetro a 405 nm. Para cada ensayo se utilizó 1 mL de buffer de reacción (dietanolamina 105.2 g/L y Mg Cl₂ 101.68 g/L), 100 µL de sustrato (p-nitrofenol-fostato 40 g/L) y 10 µL de la muestra, se midió en un espectrofotómetro a 405 nm durante 1 min, y se tomó el valor de la pendiente de la recta que resulta de la relación absorbancia Vs tiempo⁶. El pellet celular fue separado mediante una centrifugación a 500xg por 10 min, y el sobrenadante fue sometido a diálisis con una membrana Spectra/por 2 con un tamaño de poro de 12-14 KDa, realizando un total de 12 cambios de buffer (20 mM tris, 1 mM MgCl₂ pH 8) cada 12 horas. La muestra ya dializada se hizo pasar por una columna de afinidad (L-histidil-diazobenzil-ácido fosfórico inmovilizado en 4% de agarosa) y la SeAP fue eluída con un gradiente de fosfato de sodio (1-100 µM a un flujo de 0.1 mL/min). La proteína fue concentrada por ultrafiltración utilizando tubos Centricon Plus 20 de 30 KDa (amicon[®]) y un evaporador-condensador Savant Speed Vac[®] Plus.

4.13 Separación de los N-glicanos asociados a SeAP

Para desglicosilar la proteína fue necesario desnaturalizarla por lo que se resuspendió en un buffer (50 mM fosfato de sodio, 0.1% SDS y 2% β-mercapto-etanol) y se puso en ebullición durante 5 min, se adicionó 1 U de PNGasa-F⁷ para 100 µg de proteína, y se incubó durante 16 hrs a 37°C. Con el fin de separar los N-glicanos se precipitaron las proteínas con 3 volúmenes de etanol absoluto frío y se centrifugó para separar el pellet. El sobrenadante (carbohidratos en solución) se evaporó en el Savant Speed Vac[®] Plus.

⁶ El valor de la cuantificación de SeAP directamente del espectrofotómetro está expresado en UI/mL, para obtener el valor en µg /mL, se consideró que 1µg = 0.730 UI.

⁷ Péptido-N-Glicosidasa-F, cataliza la hidrólisis del enlace entre la asparagina y la cadena de oligosacáridos asociados a la glicoproteína.

4.14 Derivatización de carbohidratos con APTS.

Dada la naturaleza de los carbohidratos, su separación y detección por equipos cromatográficos o electroforéticos es complicada. La derivatización química de éstos compuestos es uno de los métodos utilizados para facilitar su detección por métodos espectroscópicos [47]. La introducción de un grupo cromóforo o fluoróforo en el carbohidrato no sólo facilita su detección por aparatos de absorbancia o fluorescencia, también modifica sus propiedades físicas como hidrofobicidad y carga eléctrica [48]. De ésta manera, el cambio en la hidrofobicidad y la introducción de una carga eléctrica permite que los carbohidratos que han sido derivatizados puedan ser separados por medio de electroforesis. La elección del agente con el que se van a derivatizar los carbohidratos depende principalmente de la estructura del carbohidrato y el tipo de detector que vaya a emplearse, así como del límite de detección para asegurar que no se tendrán problemas en el análisis.

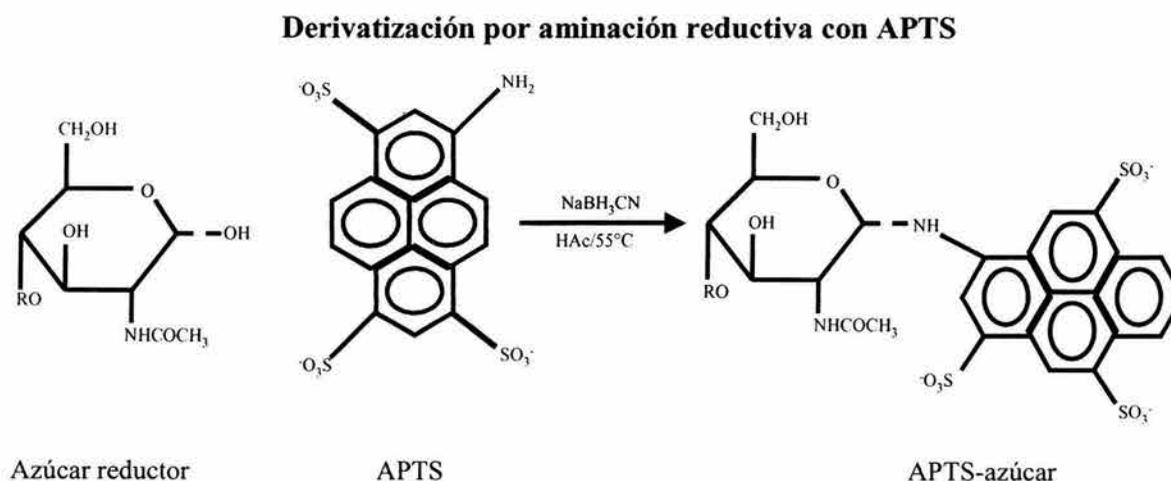


Figura 4.2. Reacción de derivatización de un azúcar reductor. En la figura se esquematiza la estructura del APTS y las condiciones de reacción. El enlace punteado indica el extremo reductor del carbohidrato.

Uno de los fluoróforos empleados para el análisis de oligosacáridos es el APTS⁷ (8-aminopireno-1,3,6-trisulfonato) cuya estructura se representa en la figura 4.2, éste se enlaza covalentemente al extremo reductor del oligosacárido asegurando que cada molécula de oligosacárido va a estar marcada con sólo una molécula de APTS. Una vez marcado con APTS se la ha conferido al carbohidrato una carga neta negativa. Esto se lleva a cabo mediante una reacción de aminación reductiva utilizando cianoborohidruro de sodio como catalizador en medio ácido a 55°C. En la Fig. (4.2) se muestra la reacción de derivatización por aminación reductiva.

Los oligosacáridos fueron resuspendidos en 2 µL del fluoróforo (APTS 5 mg en 50 µL de ácido acético 15%), se inició la reacción agregando 2 µL de 1M cianoborohidruro de sodio en THF y se incubó 90 min a 55°C. Se agregaron 46 µL de agua MiliQ para tener un volumen final de 50 µL.

4.15 Análisis de glicanos

La electroforesis capilar (EC) es una simple electroforesis llevada a cabo en un tubo capilar. Es una técnica de separación altamente eficiente tanto para moléculas grandes como pequeñas. La transformación de la electroforesis convencional a la moderna EC fue iniciada con la producción de capilares estrechos de bajo costo empleados en la cromatografía de gases y el desarrollo de métodos de detección en línea altamente sensibles para la cromatografía líquida de alta resolución [49].

⁷ Aminopireno-trisulfonato, es uno de los fluoróforos utilizados en electroforesis capilar cuando se utiliza como detector la fluorescencia inducida por laser, su longitud de onda de excitación es 455 nm y de emisión 512 nm.

La configuración básica del instrumental necesario para EC es relativamente simple (Fig. 4.3). Consiste en un capilar de sílice fundido con una ventana óptica de observación, una fuente de alto voltaje controlable (P), dos electrodos, dos depósitos de buffer, y un detector que puede ser ultravioleta (UV), fluorescencia inducida por laser (LIF) o de arreglo de fotodiodos (PAD). Los extremos del capilar son puestos en los dos depósitos con buffer y el detector en la ventana de observación. Después de llenar el capilar con buffer, la muestra es introducida, lo cual se puede hacer inyectando con presión o con voltaje.

Existen algunas diferencias en la terminología empleada en cromatografía y la que se utiliza en electroforesis capilar. Por ejemplo, un término fundamental en cromatografía es tiempo de retención. En electroforesis, bajo condiciones ideales, nada es retenido, por lo que el término análogo es tiempo de migración. El tiempo de migración (t_m) es el

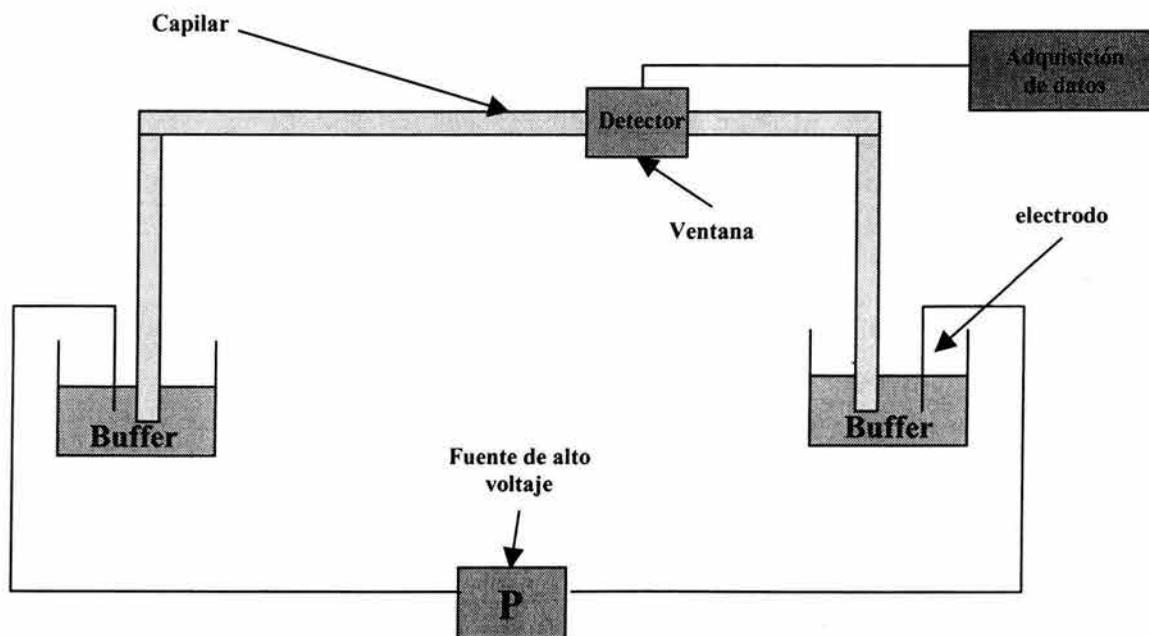


Fig.4.3 Esquema del instrumental básico para realizar la electroforesis capilar

tiempo que le toma al soluto moverse desde el principio del capilar hasta la ventana de detección [50].

Otros términos fundamentales son la movilidad electroforética μ_{ep} (cm^2/Vs), la velocidad electroforética v_{ep} (cm/s), y la fuerza del campo eléctrico E (V/cm). Las relaciones entre éstos factores se muestran en la siguiente ecuación:

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{L_d / t_m}{V / L_t}$$

L_d longitud al detector

L_t longitud total

V Voltaje

Algunas consideraciones acerca de esta ecuación:

1. Las velocidades son términos medibles. Son calculadas dividiendo el tiempo de migración entre la longitud del capilar hasta el detector L_d .
2. Las movilidades son determinadas dividiendo la velocidad entre la fuerza de campo. La movilidad es independiente del voltaje y longitud del capilar, pero es altamente dependiente del tipo y pH del buffer, así como de la temperatura.
3. Es importante considerar dos longitudes en el capilar: la distancia al detector L_d , y la longitud total L_t . Mientras que la separación se lleva a cabo en el segmento del capilar L_d , la fuerza de campo es calculada dividiendo el voltaje entre la longitud del capilar completo L_t . El exceso en la longitud del capilar $L_t - L_d$, es requerida para hacer la conexión al depósito de buffer. En el caso del equipo utilizado, esta longitud es de 7 cm [50].

El análisis de glicanos se hizo en un equipo de electroforesis capilar P/ACE™ MDQ (Beckman/Coulter): se tomaron 5 μL de los glicanos ya derivatizados y se

adicionaron 195 μL de agua MiliQ. Se utilizó un capilar recubierto con alcohol polivinílico (N-CHO capillary, Beckman/Coulter) de 47 cm de longitud total (40 cm a la ventana de detección). La inyección se realizó a 0,5 psi por 10 seg. La corrida se realizó durante 30 min a 25 Kv en fase reversa en un buffer de separación proporcionado por el fabricante y usando LIF (laser induction fluorescence) como detector.

4.16 Digestión con exoglicosidasas.

Una vez que se ha obtenido el electroferograma de cada muestra en el aparato de electroforesis capilar, se procede a asignar a cada uno de los picos las unidades de glucosa que le corresponden, esto se hace tomando como estándar el electroferograma de una escalera de glucosa⁹. A fin de poder determinar la identidad de cada uno de los picos se hace la comparación en unidades de glucosa con estructuras reportadas en tablas de quienes han analizado estas estructuras bajo las mismas condiciones. Sin embargo, en muchos de los casos, las estructuras de una o más estructuras comigran en unidades de glucosa, siendo necesario digerir la muestra con exoglicosidasas específicas a fin de eliminar los carbohidratos terminales de cada estructura y poder así, proponer una estructura para cada pico.

Las exoglicosidasas utilizadas fueron: manosidasa, hexosaminidasa, β -galactosidasa y sialidasa, todas de la marca Glyko[®]. Las características de cada una de ellas se reportan en la figura 4.4 en la que se menciona de dónde es obtenida y la especificidad a sustratos y a tipos de enlaces. Las digestiones fueron realizadas según el

⁹ La escalera de glucosa es una serie de polímeros resultantes de digestiones consecutivas de dextrán, por lo que se obtiene una serie de picos que van migrando de acuerdo a las unidades de glucosa presentes en cada monómero, dímero o polímero, al hacer una regresión lineal de la relación unidades de glucosa vs. tiempo de migración se obtiene la ecuación de una recta, con la que se pueden extrapolar los tiempos de migración de cada pico en los electroferogramas de las muestras y obtener así, las unidades de glucosa correspondientes.

método de Joosten y Joshi [51], en todos los casos se utilizó el buffer de reacción proporcionado por Glyko® para cada exoglicosidasa:

- La manosidasa es reconstituida en 25 µL de su buffer de reacción y se utilizan 3 µL de la enzima para cada reacción.
- Se utiliza 1 µL de hexosaminidasa para cada reacción.
- 1 µL de β-galactosidasa es diluida con 3 µL de agua y 1 µL de esta dilución es utilizado para cada reacción.
- La sialidasa es utilizada en la misma forma que la β-galactosidasa.

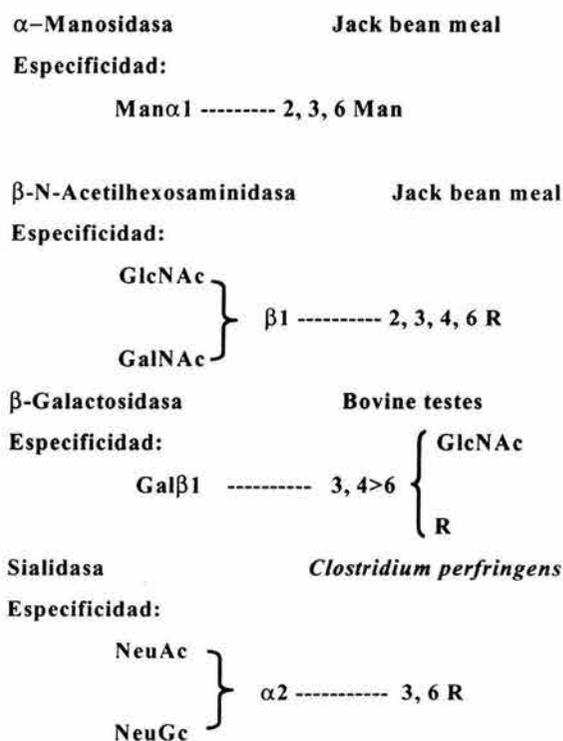


Figura 4.4 Exoglicosidasas empleadas para digestiones de oligosacáridos

La digestión es llevada a cabo en un tubo de 1 mL, la composición de cada una de las digestiones es la siguiente:

- 3 μL de carbohidratos derivatizados
- 3 μL de buffer 5x (de la exoglicosidasa correspondiente)
- 1 μL de la exoglicosidasa.
- El volumen necesario de agua miliQ para llevar la reacción a 15 μL .

4.17 Evaluación de la actividad hexosaminidasa

Se midió la actividad hexosaminidasa con los diferentes tratamientos a las concentraciones ensayadas. El ensayo fue realizado utilizando un extracto celular de células H5. El procedimiento realizado fue una variante del reportado por Palomares y colaboradores [25].

1. Se preparó una curva de calibración con diluciones seriadas de 4-methylumbelliferone (4-mu). El 4-mu sólo es soluble en metanol o en ácido acético glacial. Primero se solubilizó en una mínima cantidad de ácido acético y posteriormente se llevó al volumen deseado con el buffer de reacción (0.1 M acetato de sodio /HCl pH 6), se hicieron las diluciones seriadas y se colocaron 10 μL de la dilución y se completó el volumen a 3 mL. Se leyó la emisión de fluorescencia a una longitud de onda de 450 nm después de haber excitado a 362 nm, y a un ancho de abertura de 5 nm.
2. Se prepararon 30 mL de células a 1×10^6 células/mL, se lavaron dos veces con PBS pH 6.5, las células fueron distribuidas en alícuotas de 1 mL, se eliminó el PBS y se resuspendieron en el buffer de lisis (100 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.1% tritón X-100). Se sonicaron 3 veces por 10 seg y se eliminó el pellet. Se hizo una dilución 1:5 y se determinó proteína total por Bradford.

3. Se adicionó la cantidad necesaria de ManN, ManNAc y Cyt, para lograr las concentraciones ensayadas. Se tomaron 2.4 μg de proteína total del extracto de células.
4. Se adicionaron 10 μL de la concentración evaluada a 90 μL de la solución del sustrato (1.1 mM 4-methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide) y se incubó a 37°C por 1 hr. Se detuvo la reacción adicionando 900 μL de glicina 0.2M pH 10.5. Se completó a 3 mL con buffer de reacción (0.1 M acetato de sodio/HCl pH 6) y se leyó a una longitud de onda de 450 nm después de haber excitado a 362 nm, y a un ancho de abertura de 5 nm. Los resultados fueron obtenidos al extrapolar con la curva de calibración.

Capítulo V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de hacerlo más comprensible, este capítulo se presenta en tres secciones: en la primera se trata lo referente al crecimiento celular, en la segunda lo referente a consumo de glucosa, generación de lactato y producción de proteína recombinante, y en la tercera se presenta el análisis de los oligosacáridos asociados a SeAP.

5.1 CRECIMIENTO Y VIABILIDAD

Una cinética de crecimiento típica se muestra en la fig.5.1a, en la gráfica se muestra una cinética de crecimiento típica de la línea celular BTI-Tn5B1-4 (H5) de un cultivo no infectado y sin adicionar ninguno de los precursores. En esa gráfica se muestran las fases de crecimiento de las células de insecto en las que se identifican las siguientes: lag, exponencial, estacionaria y muerte. La fase lag comienza en el momento en que se agrega el inóculo y tiene una duración de 48 hrs, a partir de este punto y hasta las 120 hrs se presenta un crecimiento exponencial seguido de una fase estacionaria que culmina a las 168 horas, dando lugar a la fase de muerte en la que la proporción de células viables del cultivo disminuye a casi el 40% a las 192 horas (Fig. 5.1 b). En este caso, la gráfica muestra el crecimiento del cultivo desde el tiempo 0 en el que fueron inoculados los matraces, mostrando en el eje X el tiempo en horas. La velocidad específica de crecimiento (anexo A) de ésta línea celular fue de 0.026 h^{-1} que corresponde a un tiempo de duplicación de 26.65 h, estos resultados coinciden con los reportados por

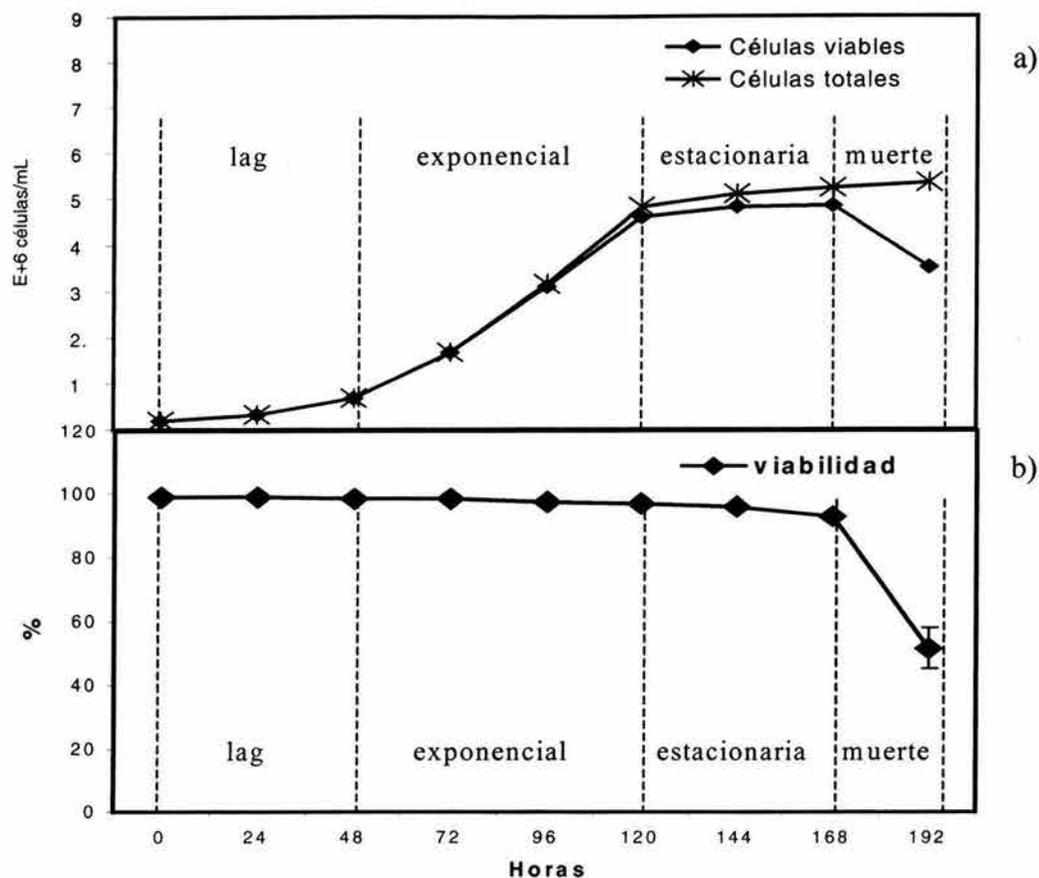


Fig. 5.1 a) Cinética de crecimiento típica, comportamiento de las células totales y células viables a lo largo del cultivo, en b) se muestra la reducción paulatina de la viabilidad en las diferentes fases del cultivo y la caída drástica a partir de las 168 hrs.

A. Ortega [52] y son muy próximos a los reportados por Rhiel [53] en la misma línea celular y bajo las mismas condiciones de cultivo. El índice de crecimiento⁹ fue de 27.1 (desde el inóculo inicial) y 3.54 (desde las 72 h). Para ésta cinética fue calculada la constante de muerte en las últimas 24 horas del cultivo resultando en 1.16 h^{-1} .

Tratamiento de los cultivos

Los cultivos que recibieron tratamientos fueron inoculados desde el tiempo 0 a una concentración inicial de 0.2×10^6 células/mL con sus respectivos tratamientos con cada uno de los precursores. Posteriormente, cuando los cultivos alcanzaron una concentración celular de 1.5×10^6 células/mL fueron infectados con el baculovirus recombinante; lo cual en la mayoría de los casos ocurrió alrededor de las 60 h. Todos los

⁹ El término índice de crecimiento se refiere al número de veces que el inóculo creció, es el cociente de la concentración máxima viable alcanzada entre la concentración inicial del cultivo.

cultivos fueron realizados bajo las mismas condiciones descritas en la sección materiales y métodos.

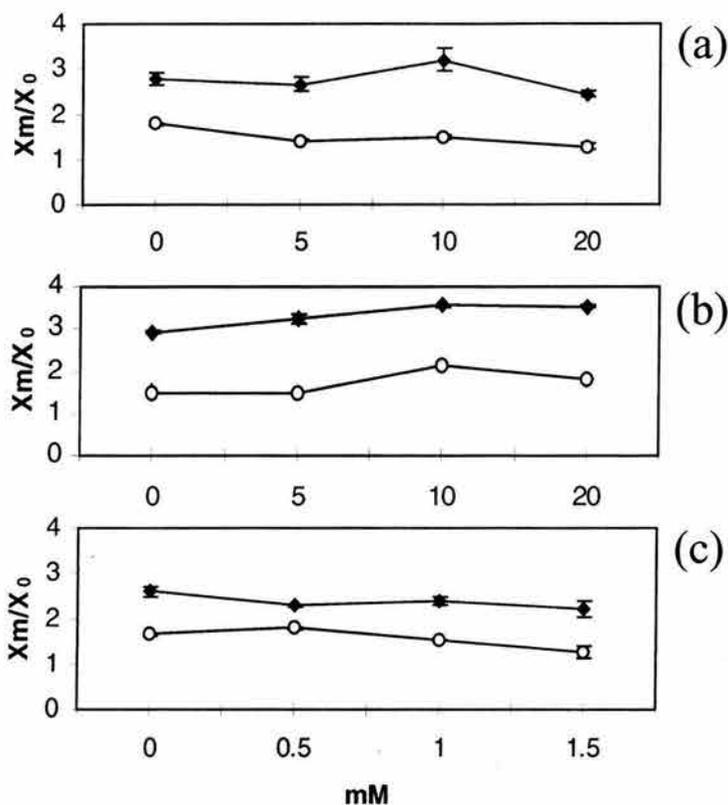


Fig. 5.2 Índice de crecimiento: a) Manosamina, b) N-acetilmanosamina, c) Citidina. \blacklozenge cultivos no infectados \circ cultivos infectados.

En cultivos por duplicado se adicionó manosamina (5, 10 y 20 mM), N-acetilmanosamina (5, 10 y 20 mM) y citidina (0.5, 1 y 1.5 mM) al medio de cultivo. Se caracterizaron las cinéticas de crecimiento en cultivos no infectados y en cultivos infectados y se analizó el efecto de los diferentes tratamientos sobre el crecimiento, producción de proteína recombinante y consumo de nutrientes. En la fig. 5.2 se muestran los valores de índice de crecimiento para cada uno de los cultivos. Los valores mayores de índice de crecimiento se dieron en los cultivos adicionados con N-acetilmanosamina

(Fig. 5.2b), tanto para cultivos infectados (2.1 en 10 mM) como no infectados (3.5 en 10 mM), esto significa que también en estos cultivos se obtuvieron las concentraciones celulares máximas. Los valores de índice de crecimiento más bajos en cultivos infectados corresponden a los del tratamiento con citidina (Fig. 5.2c) (1.25 en 1.5 mM) y en los no infectados del tratamiento con manosamina (Fig. 5.2a) (2.4 en 20 mM). Otro parámetro de gran utilidad que permite comparar los patrones de crecimiento de los cultivos es la velocidad específica de crecimiento, en la fig 5.3 se muestran las velocidades específicas de crecimiento de los cultivos no infectados de cada uno de los tratamientos. Al analizar estos resultados en cultivos no infectados es evidente que la mayor concentración de manosamina (20 mM) tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento, mientras que ninguna de las adiciones de N-acetil-manosamina presenta este fenómeno, lo cual concuerda con lo reportado por Donaldson y colaboradores [41].

Por otra parte, también en los cultivos adicionados con 1.5 mM de citidina se presenta este decremento del 30% en la velocidad específica de crecimiento, de hecho estos cultivos tuvieron una fase lag mayor con respecto a los otros cultivos ya que tardaron casi 13 horas más en alcanzar el TDI deseado (1.5×10^6 células/mL).

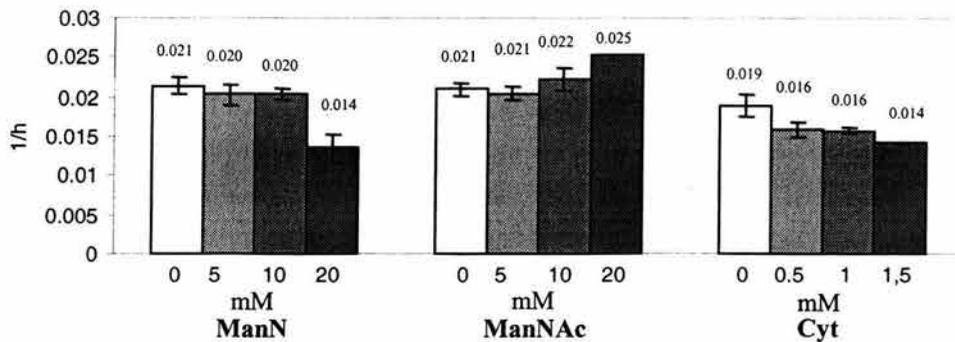


Fig. 5.3 Velocidad específica de crecimiento para cultivos no infectados

5.2 ASPECTOS METABÓLICOS

5.2.1 Consumo de glucosa y generación de lactato

Siendo la glucosa la principal fuente de carbono en las células de insecto, el seguimiento de su consumo durante la cinética de crecimiento y de producción de proteína nos proporciona información importante sobre las posibles alteraciones en el metabolismo de las células que pudieran estar ocasionando los precursores que se están adicionando al medio de cultivo. Así mismo, el seguimiento de la generación y

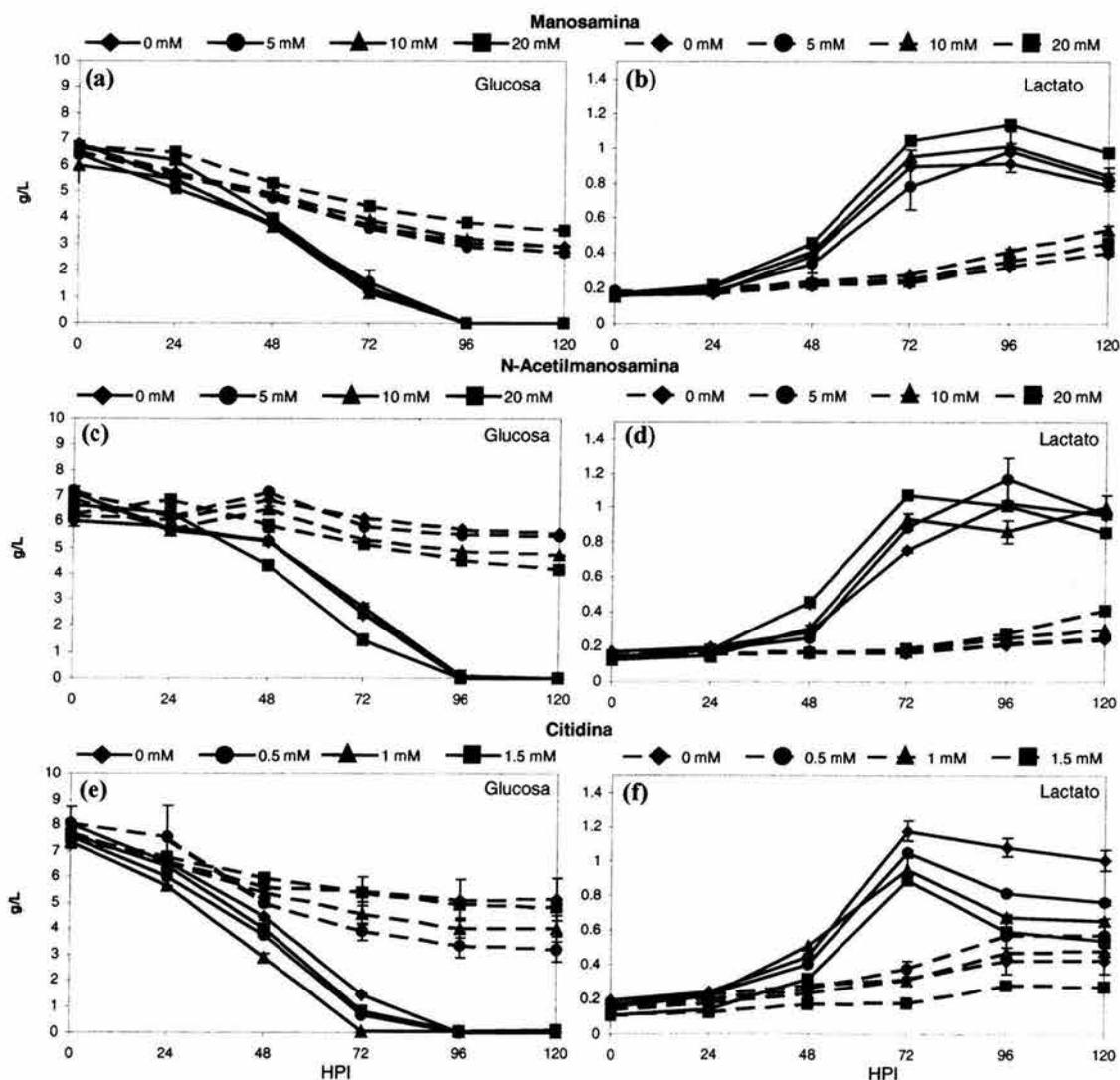


Fig. 5.4 Depleción de glucosa y generación de lactato. En todos los casos, las líneas continuas representan los cultivos no infectados y las líneas punteadas los cultivos infectados.

acumulación de lactato, principal metabolito de desecho en células de insecto, complementa esta información sobre el efecto de la adición de precursores en cultivos de células de insecto.

En la figura 5.4 (a, c y e) se muestra la depleción de glucosa en el medio de cultivo para los tratamientos con manosamina, N-Acetilmanosamina y citidina respectivamente, los cultivos infectados se representan con líneas punteadas y los cultivos no infectados con líneas continuas. La tendencia de depleción de glucosa entre cada una de las concentraciones ensayadas para cada precursor fue muy similar principalmente en los cultivos infectados, los cuales no llegan a agotar completamente la glucosa en el medio de cultivo. En el caso de los cultivos no infectados, se quedan sin glucosa antes de las 96 HPI, esto puede explicarse basándose en la diferencia entre la concentración celular alcanzada por los cultivos no infectados que es siempre mayor a la de los cultivos infectados, de esta manera, los cultivos con mayor densidad celular tienen una mayor depleción de glucosa. En la tabla 5.1a se puede comparar la velocidad específica de consumo de glucosa (VCG)¹¹ de cada cultivo, tanto infectados como no infectados. En los cultivos no infectados y que no se les adicionó ningún precursor (0 mM), la VCG se mantiene en $0.1 \mu\text{mol}/1 \times 10^6 \text{células-h}$, lo cual coincide con el valor reportado por A. Ortega [52] en cultivos realizados con esta misma línea celular y bajo las mismas condiciones de MDI y TDI. Si se comparan las VCG de cultivos no infectados versus cultivos infectados se observa que salvo dos excepciones, siempre el consumo es menor en células infectadas. Entre los cultivos a los que se adicionaron precursores, aquellos a los que se adicionó N-acetilmanosamina muestran los valores más bajos de VCG.

¹¹ La forma en la que fueron realizados los cálculos de velocidad específica de consumo de glucosa, velocidad específica de generación de lactato y velocidad específica de producción de proteína recombinante se describen en el apéndice A.

En la figura 5.4 (b, d y f) se muestran los valores de la concentración extracelular de lactato generado en los diferentes cultivos tratados con manosamina, N-Acetilmanosamina y citidina respectivamente. Nótese que en los cultivos no infectados, la generación de éste metabolito sigue una misma tendencia hasta las 72 HPI, a partir de éste punto la generación de lactato se ve disminuida e incluso en los cultivos adicionados con citidina (Fig. 5.4f) se observa una depleción del lactato generado, esto coincide con el agotamiento de la glucosa, por lo que las células metabolizan el lactato acumulado para obtener energía. Esta vía metabólica se esquematiza en la figura 2.4, donde se muestra que el lactato es transformado a piruvato para de esta manera obtener energía ingresando al ciclo de Krebs. Como ya se aclaró anteriormente, los cultivos adicionados con citidina tardaron casi 13 horas más en alcanzar la concentración del TDI, lo cual aunado a una VCG mayor, explica el por qué estos cultivos agotan antes la glucosa y por lo tanto consumen más lactato.

a) Velocidad específica de consumo de glucosa ($\mu\text{mol}/1 \times 10^6 \text{células} \cdot \text{h}$)

	ManN		ManNAc			Cyt	
	No inf.	Inf.	No inf.	Inf.		No inf.	Inf.
0 mM	0.1	0.09	0.1	0.06	0 mM	0.15	0.07
5 mM	0.1	0.1	0.1	0.06	0.5 mM	0.2	0.15
10 mM	0.1	0.095	0.1	0.07	1 mM	0.2	0.095
20 mM	0.2	0.1	0.1	0.1	1.5 mM	0.2	0.09

b) Velocidad específica de generación de lactato ($\mu\text{mol}/1 \times 10^6 \text{células} \cdot \text{h}$)

	ManN		ManNAc			Cyt	
	No inf.	Inf.	No inf.	Inf.		No inf.	Inf.
0 mM	0.04	0.006	0.035	0.008	0 mM	0.06	0.008
5 mM	0.04	0.007	0.04	0.0065	0.5 mM	0.06	0.02
10 mM	0.04	0.009	0.04	0.0095	1 mM	0.06	0.01
20 mM	0.06	0.007	0.04	0.02	1.5 mM	0.06	0.01

Tabla 5.1 a) Velocidad específica de consumo de glucosa, b) Velocidad específica de generación de lactato

Este fenómeno no se aprecia en ninguno de los cultivos infectados debido a que al cabo de las 120 HPI todavía tienen glucosa remanente en el medio de cultivo. La tabla 5.1b muestra la velocidad específica de generación de lactato (VGL), en este aspecto todos los cultivos mantienen valores cercanos entre sí, teniéndose los valores mayores de VGL en los cultivos adicionados con citidina. De ésta manera se observa una concordancia de los cultivos que muestran una mayor velocidad de consumo de glucosa con una mayor depleción de la misma (no infectados tratados con citidina), así como una mayor generación de lactato (no infectados tratados con citidina). Estos resultados no muestran evidencia de que los tratamientos aplicados a los cultivos estén alterando el aprovechamiento de la fuente de carbono, por lo que se puede descartar la idea de que las variaciones en el procesamiento postraducciona l de la proteína recombinante producida pudiera estar ocasionado por alguna modificación o limitación en la fuente de carbono [54, 55].

5.2.2 Producción de proteína recombinante

a) Concentración máxima de proteína recombinante								
ManN	µg/mL	+/-	ManNAc	µg/mL	+/-	Cyt	µg/mL	+/-
0 mM	191.03	26.61	0 mM	233.29	11.99	0 mM	276.16	8.50
5 mM	265.73	11.90	5 mM	246.82	1.20	0.5 mM	290.37	3.14
10 mM	211.41	16.50	10 mM	302.76	17.60	1 mM	266.11	18.97
20 mM	160.86	4.16	20 mM	257.26	10.11	1.5 mM	239.36	7.50
b) Velocidad específica de producción de proteína recombinante								
ManN	µg/1x10 ⁶ cel*h	+/-	ManNAc	µg/1x10 ⁶ cel*h	+/-	Cyt	µg/1x10 ⁶ cel*h	+/-
0 mM	1.5	0.5	0 mM	2	0	0 mM	2	0
5 mM	2	0	5 mM	2	0	0.5 mM	2	0
10 mM	2	0	10 mM	1.5	0.5	1 mM	2	0
20 mM	2	0	20 mM	2	0	1.5 mM	2	0

Tabla 5.2 a) concentración máxima de proteína recombinante, b) Velocidad específica de producción de proteína recombinante. (+/-) Rango de variación entre dos experimentos.

En la tabla 5.2a se muestran las concentraciones máximas de SeAP producida en cada cultivo y cosechada a las 120 HPI, los valores más bajos de producción de SeAP corresponden al tratamiento con manosamina excepto en la concentración 5 mM. El rango de concentraciones máximas obtenidas varían desde 85.72 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (en 20 mM de manosamina) hasta 161.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (en 10 mM de N-acetilmanosamina), lo cual significa una diferencia de 1.88 veces entre uno y otro. Si relacionamos la fig. 5.2 con la tabla 5.2a, se observa una correlación entre el índice de crecimiento y la producción volumétrica de proteína. Por ejemplo, los cultivos en los que se recuperó la menor cantidad de proteína (tabla 5.2a) son también los que tuvieron un menor índice de crecimiento (20 mM ManN y 1.5 mM Cyt) (fig. 5.2, a y c símbolos vacíos). Un análisis de la tabla 5.2b muestra que en todos los cultivos la velocidad de producción de proteína se mantuvo en el rango 0.75 a 1 $\mu\text{g}/1 \times 10^6 \text{células} \cdot \text{h}$. Adicionalmente como se muestra en la fig. 5.5 la producción específica de proteína recombinante fue también invariable (entre 80.3 y 133.2 $\mu\text{g}/1 \times 10^6 \text{células}$). Esta gran similitud en la producción específica de

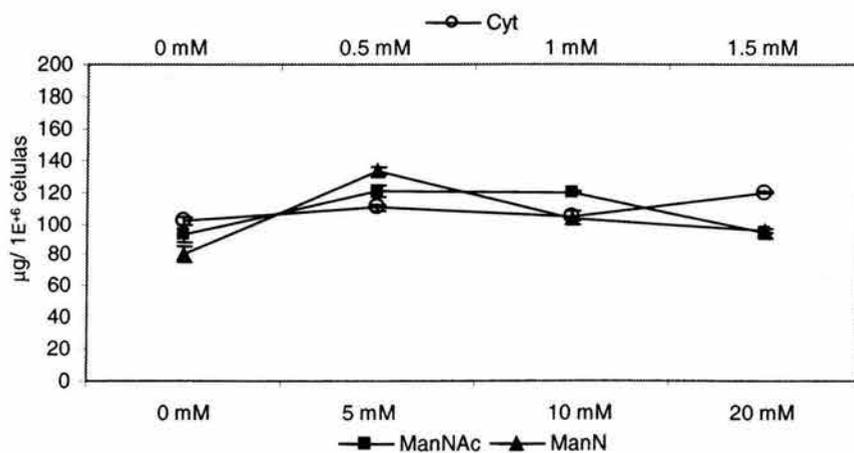


Fig. 5.5 Producción específica de proteína recombinante. Las denominaciones en el eje superior corresponden a las concentraciones de Cyt, y los del eje inferior a las concentraciones de ManNAc y ManN.

proteína recombinante nos permite descartar que las diferencias en el procesamiento postraduccional entre un tratamiento y otro se deban a una saturación del mismo a nivel de aparato de Golgi como lo sugieren Joosten y Shuler [56].

5.3 ANÁLISIS DE OLIGOSACÁRIDOS

La proteína recombinante producida en los cultivos tratados con manosamina, N-acetil-manosamina y citidina fue deglicosilada y los oligosacáridos obtenidos fueron analizados en un equipo de electroforesis capilar. Para el análisis e identificación de las estructuras resultantes de la digestión con la PNGasa F, se tomó como referencia el tiempo característico de migración de unidades de glucosa. A este tipo de referencia se le llama escalera de glucosa y consiste en monómeros y polímeros de glucosa que han sido derivatizados con el mismo fluoróforo que las muestras a analizar, en el electroferograma de la figura 5.6 se muestran los picos correspondientes a las unidades de glucosa, el tiempo de migración se muestra en el eje X y la fluorescencia en el eje Y.

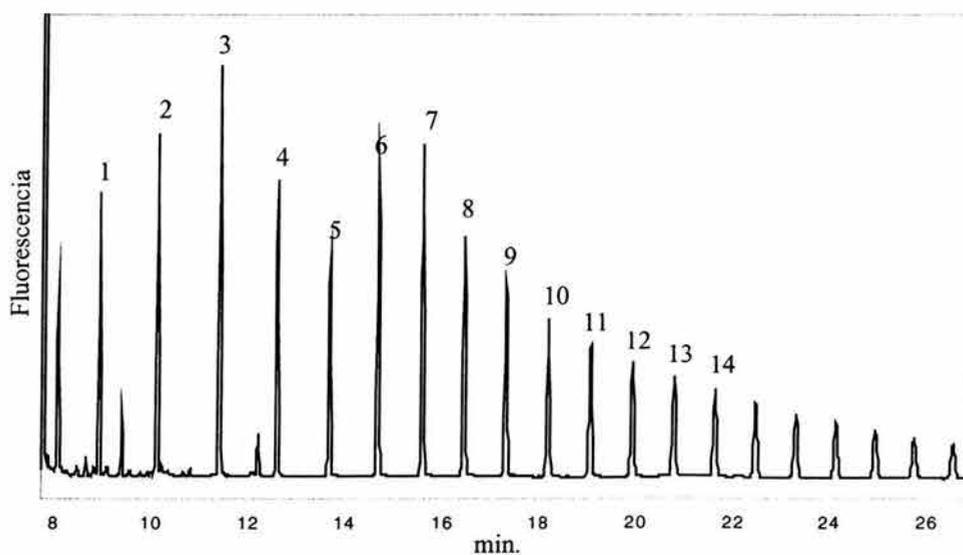
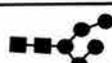
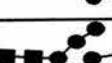
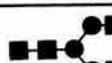
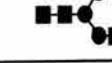
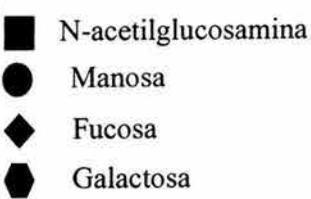


Fig. 5.6 Escalera de glucosa, indicando para cada pico las respectivas unidades de glucosa

	UG	+/-	nombre	Estructura	ID
Paucimanosa	3.1	0.064	MNN		A
	4.78	0.064	M3N2		B
	5.5	0.097	M3N2F		C
Alta manosa	6.7	0.132	MAN5		D
	7.97	0.09	MAN6		E
	8.47	0.092	MAN7		F
	9.45	0.057	MAN8		G
	10.16	0.098	MAN9		H
Complejas	7.07	0.119	N2M3 N2		I
	8.85	0.1	N4M3 N2		J
	8.49	0.114	HYB		K
	9.95	0.066	G2N2 M3N2		L
	10.09	0.066	G2N2 M3N2F		M



- N-acetilglucosamina
- Manosa
- Fucosa
- Galactosa

Fig. 5.7 Nomenclatura y clave de las estructuras propuestas. UG= unidades de glucosa, ID= identificación en los electroferogramas.

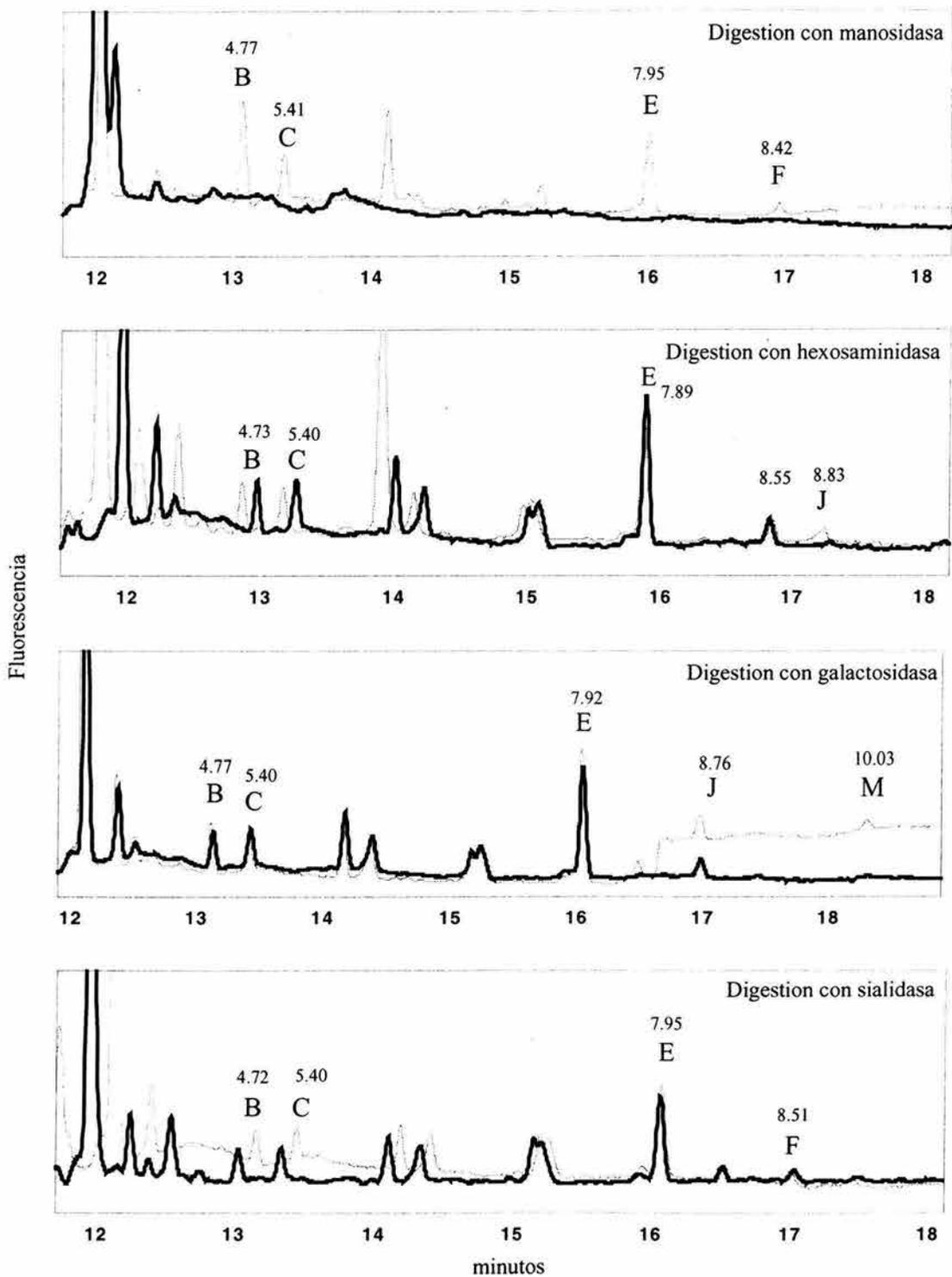


Fig. 5.8 Electroferogramas representativos de digestiones con exoglicosidas. La línea delgada representa la muestra sin digerir, y la línea gruesa la muestra después de la digestión. Se indican con número las UG para las estructuras propuestas.

Una vez que se obtiene el electroferograma de la escalera de glucosa se hace una curva de calibración en la que se relacionan los tiempos de migración de cada pico con las unidades de glucosa. Como resultado se obtiene una relación lineal que permite extrapolar los tiempos de migración de cada pico obtenido en el electroferograma de la muestra analizada, y obtener de esta manera las unidades de glucosa (UG) de cada uno de ellos. Estos valores de unidades de glucosa son comparados con los valores publicados para estándares de cada una de las estructuras que han sido analizadas en condiciones similares, de ésta manera se puede proponer la estructura de los oligosacáridos presentes en la muestra. En este trabajo se tomaron como referencia los valores de UG reportados por el fabricante Glyko® en su catálogo “Tools for Glycobiology 2001-2002”. En la figura 5.7 se detallan las unidades de glucosa que corresponden para cada estructura, así como la nomenclatura y la clave utilizada para identificar cada estructura propuesta en los electroferogramas que se muestran más adelante. El término paucimanosas se refiere a los glicanos que contienen menos de 3 manosas terminales, y el término alto manosa se refiere a los glicanos que contienen más de 3 manosas terminales.

Tal y como se ha descrito en la sección Digestión con exoglicosidasas en el capítulo 4 Materiales y Métodos, la identidad de estructuras que comigran en unidades de glucosa fue resuelta mediante digestiones enzimáticas de la muestra analizada, en la figura 5.8 se ejemplifican tres digestiones, en donde se observan los picos que desaparecen de las estructuras digeridas. En los tres electroferogramas la línea punteada corresponde a la muestra sin digerir y la línea sólida representa a la muestra ya digerida. El panel que muestra la digestión con manosidasa, sugiere que los picos indicados con las letras B, C, E y F corresponden a estructuras con manosas terminales puesto que son

removidos en presencia de manosidasa. De esta manera se puede proponer una determinada estructura para un pico en el que, debido a sus unidades de glucosa, se tengan dos o más estructuras posibles que pudieran estar comigrando.

5.3.1 Tratamientos con citidina

Los resultados de las estructuras de glicanos identificadas para la proteína producida en los cultivos adicionados con citidina se muestran en la tabla 5.3 en donde se muestran las unidades de glucosa, el tipo de estructura y el porcentaje de abundancia.

Las estructuras identificadas asociadas a la proteína obtenida a las 48 horas en los cultivos adicionados con citidina se muestran en la tabla 5.3a y las asociadas a la proteína cosechada a las 120 horas en la tabla 5.3b. en ambas cosechas, la totalidad de las estructuras encontradas presentaron únicamente manosas terminales, lo cual coincide con lo reportado, ya que en estudios realizados en diferentes líneas celulares de insecto sin la adición de precursores, la tendencia es encontrar un gran porcentaje de estructuras del tipo alta manosa y glicanos truncados del tipo paucimansa [20, 23, 41, 51, 57-59]. En los cultivos tratados con citidina no se encontró ninguna estructura compleja, así mismo, ni en las paucimansa ni en las alta manosa se observa una tendencia que indique alguna dependencia de la formación de estas estructuras con la adición de citidina al medio de cultivo.

En el caso de la proteína obtenida a 120 horas, si se compara el cultivo en el cual no se agregó citidina (0 mM), con aquellos en los que sí se adicionó se ve un porcentaje mayor de formas paucimansa y una abundancia menor de formas alta manosa (Fig. 5.9).

a) Cyt 48 h		0 mM	0.5 mM	1 mM	1.5 Mm
UG	Estructura	%	%	%	%
3.1	MNN	nd	nd	69.31	30.68
4.78	M3N2	57.22	82.6	nd	nd
6.7	MAN5	nd	nd	30.66	69.32
7.97	MAN6	42.78	17.4	nd	nd

b) Cyt 120 h		0 mM	0.5 mM	1 mM	1.5 Mm
UG	%	%	%	%	%
3.1	MNN	12.45	20.7	11.77	36.6
4.78	M3N2	28.8	29.6	34.77	26.1
5.5	M3N2F	12.1	12.3	13.91	12.7
6.7	MAN5	4.58	nd	nd	1.74
7.97	MAN6	39.72	37.3	8.24	22.8
8.47	MAN7	2.271	nd	28.22	nd
9.45	MAN8	nd	nd	3.078	nd

Tabla 5.3 a) Estructuras propuestas y porcentaje de abundancia a 48 HPI, b) Estructuras propuestas y porcentaje de abundancia a 120 HPI. nd= no detectado.

En la figura 5.9 se muestra la abundancia de formas paucimanosa y alta manosa para cada uno de los cultivos, ninguna de las gráficas muestra tendencia en la abundancia

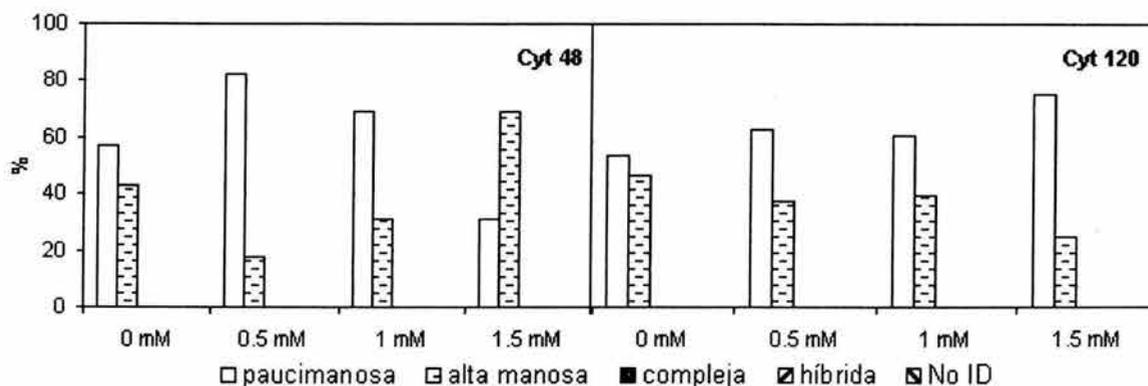


Fig. 5.9 Abundancia relativa de formas paucimanosa y alta manosa en los cultivos tratados con citidina

de una u otra glicoforma que pudiera estar siendo inducida por la concentración de citidina adicionada, así mismo, se puede observar que tanto la proteína cosechada a las 48 HPI como la cosechada a las 120 HPI contienen únicamente estructuras del tipo paucimanosa y alta manosa. Lo anterior concuerda con un reporte de Joosten y colaboradores [60] en el que analiza el efecto del tiempo de cosecha en las glicoformas

asociadas a SeAP producida en células de insecto Tn-4s, en el que no encuentra diferencias significativas entre las muestras cosechadas a 48, 72 y 96 HPI. En la figura 5.10 se muestran los electroferogramas del análisis de la proteína obtenida a las 48 horas y en la figura 5.11 los electroferogramas obtenidos del análisis de la proteína obtenida a las 120 horas en los cultivos adicionados con citidina. Como puede observarse, aquellos picos a los que se les ha asignado una determinada estructura se encuentran señalados con una letra; el hecho de que haya picos a los que no se les ha asignado ninguna estructura es debido a que no hay ninguna estructura reportada para esas unidades de glucosa. Así mismo, se observa que una misma estructura propuesta puede tener desfases en cuanto al tiempo de migración de un electroferograma a otro, sin embargo, corresponderá siempre a las mismas unidades de glucosa ya que ha sido extrapolado con la escalera de glucosa que le corresponde. Una explicación más detallada sobre esto se encuentra en el apéndice B. La abundancia de formas alta manosa indica un procesamiento incompleto de la glicoproteína en el que es secretada antes de ser procesada por la GlcNAc-transferasa I (Fig. 2.7), esto resulta en estructuras con cinco o más manosas terminales. Las formas paucimanosa provienen de estructuras complejas que ya han sido procesadas por la GlcNAc-transferasa II que produce glicanos con la estructura N2M3N2 (Fig. 5.7) de las cuales una Hexosaminidasa asociada a membrana [23] ha eliminado las dos N-acetilglucosaminas terminales (Fig. 2.7), la estructura resultante tiene dos manosas terminales y no es reconocida por la Galactosiltransferasa como sustrato por lo cual ya no puede seguir siendo procesada y es secretada. La predominancia de formas alta manosa y paucimanosa en los cultivos tratados con citidina indican un procesamiento incompleto y una alta actividad de la enzima hexosaminidasa. Por lo cual, aún si se tuvieran las

condiciones necesarias para la sialilación, ésta no llegaría a realizarse por causa de un procesamiento incompleto.

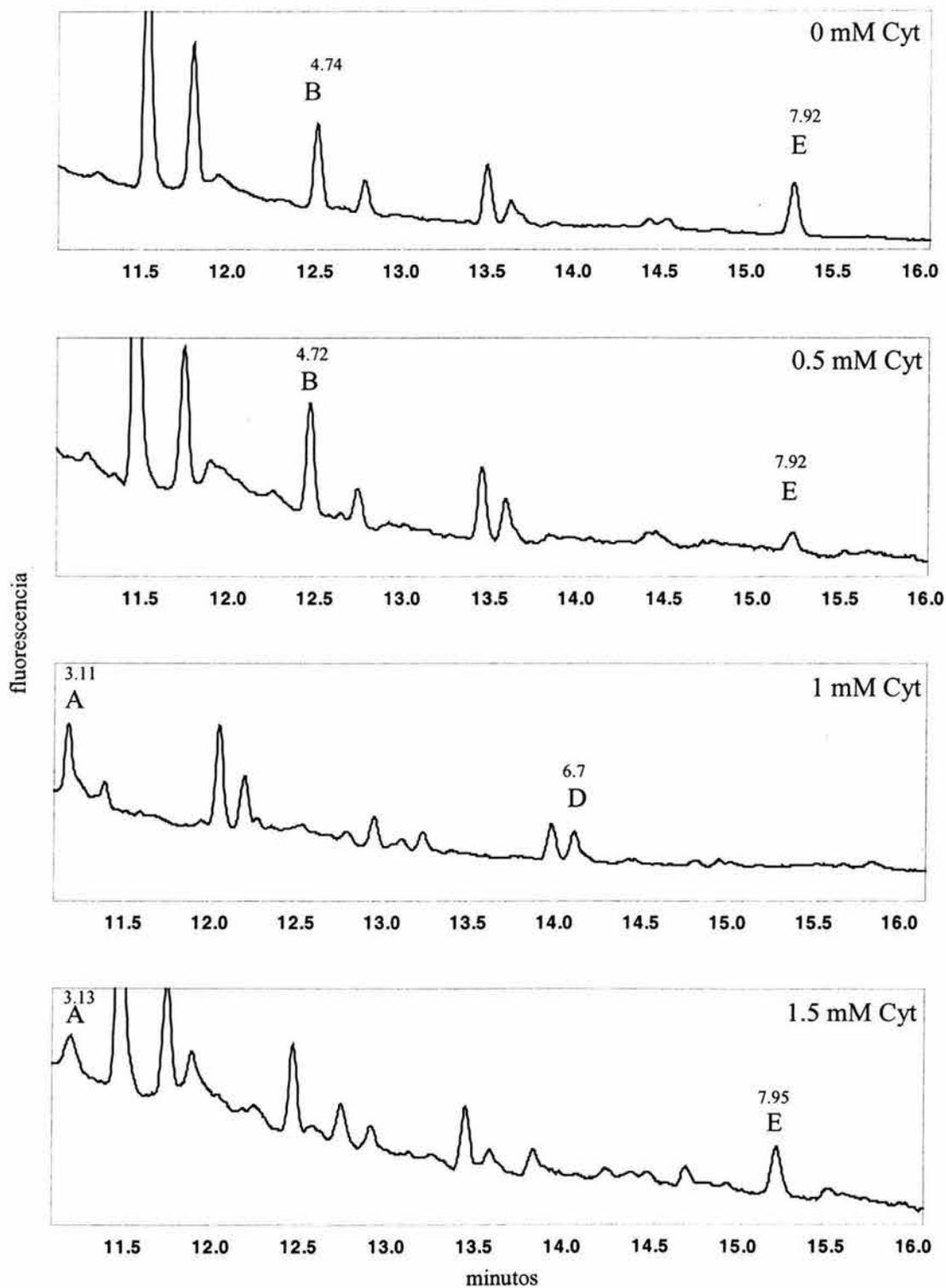


Fig. 5.10 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con citidina a 48 HPI. Las letras sobre los picos indican las estructuras propuestas representadas en la figura 5.7. Se indican con número las UG para las estructuras propuestas.

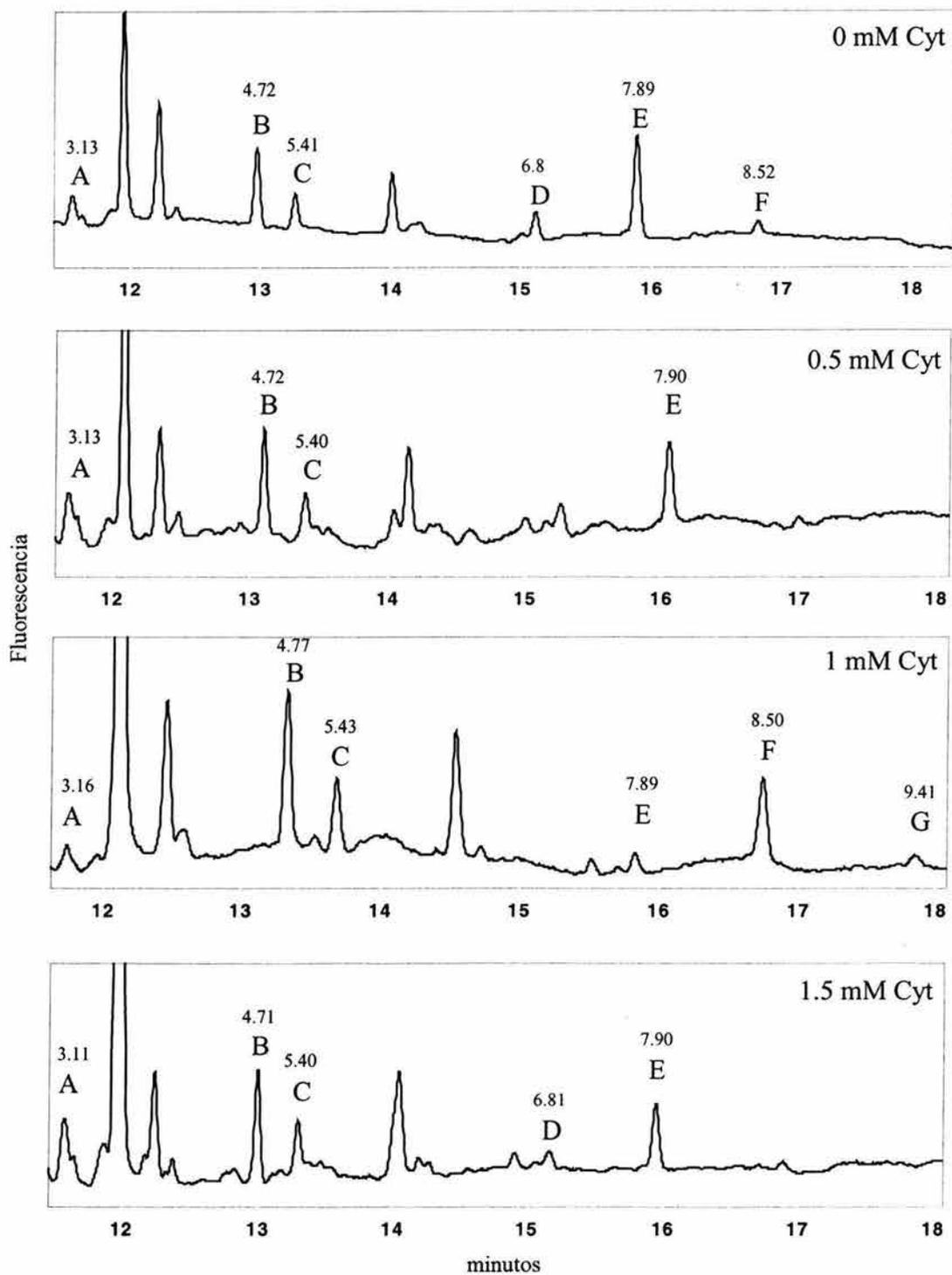


Fig. 5.11 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con citidina a 120 HPI. Las letras sobre los picos indican las estructuras propuestas representadas en la figura 5.7. Se indican con número las UG para las estructuras propuestas.

5.3.2 Tratamientos con N-acetilmanosamina

Las estructuras de oligosacáridos identificadas y sus porcentajes de abundancia obtenidos de la proteína analizada tanto a 48 como a 120 horas en los cultivos adicionados con ManNAc se muestran en las tablas 5.4a y 5.4b respectivamente.

a) ManNAc 48 h		0 mM	5 mM	10 mM	20 mM
UG	Estructura	%	%	%	%
3.1	MNN	18.28	20.75	16.89	6.75
4.78	M3N2	40.67	32.34	35.25	22.5
6.7	MAN5	nd	4.92	nd	nd
7.97	MAN6	41.04	nd	47.85	70.74
8.47	MAN7	nd	37.68	nd	nd
9.45	MAN8	nd	4.3	nd	nd

b) ManNAc 120 h		0 mM	5 mM	10 mM	20 mM
UG	%	%	%	%	%
3.1	MNN	18.14	18.8	24.39	5.85
4.78	M3N2	20.79	20.4	20.59	32.3
5.5	M3N2F	17.51	12.4	7.15	20.1
6.7	MAN5	nd	nd	9.43	nd
7.97	MAN6	41.08	45.3	28	34
8.47	MAN7	2.49	3.1	nd	nd
9.45	MAN8	nd	nd	6.2	nd
10.16	MAN9	nd	nd	4.2	nd
8.49	HYB	nd	nd	nd	4.8
9.95	G2N2M3N2	nd	nd	nd	2.89

Tabla 5.4 a) Estructuras de oligosacáridos propuestas y porcentaje de abundancia, cosecha a 48 HPI, b) Estructuras de oligosacáridos propuestas y porcentaje de abundancia, cosecha a 120 HPI. nd= no detectado.

La mayoría de las estructuras encontradas en los cultivos tratados con N-acetilmanosamina fueron del tipo alta manosa y paucimansa.

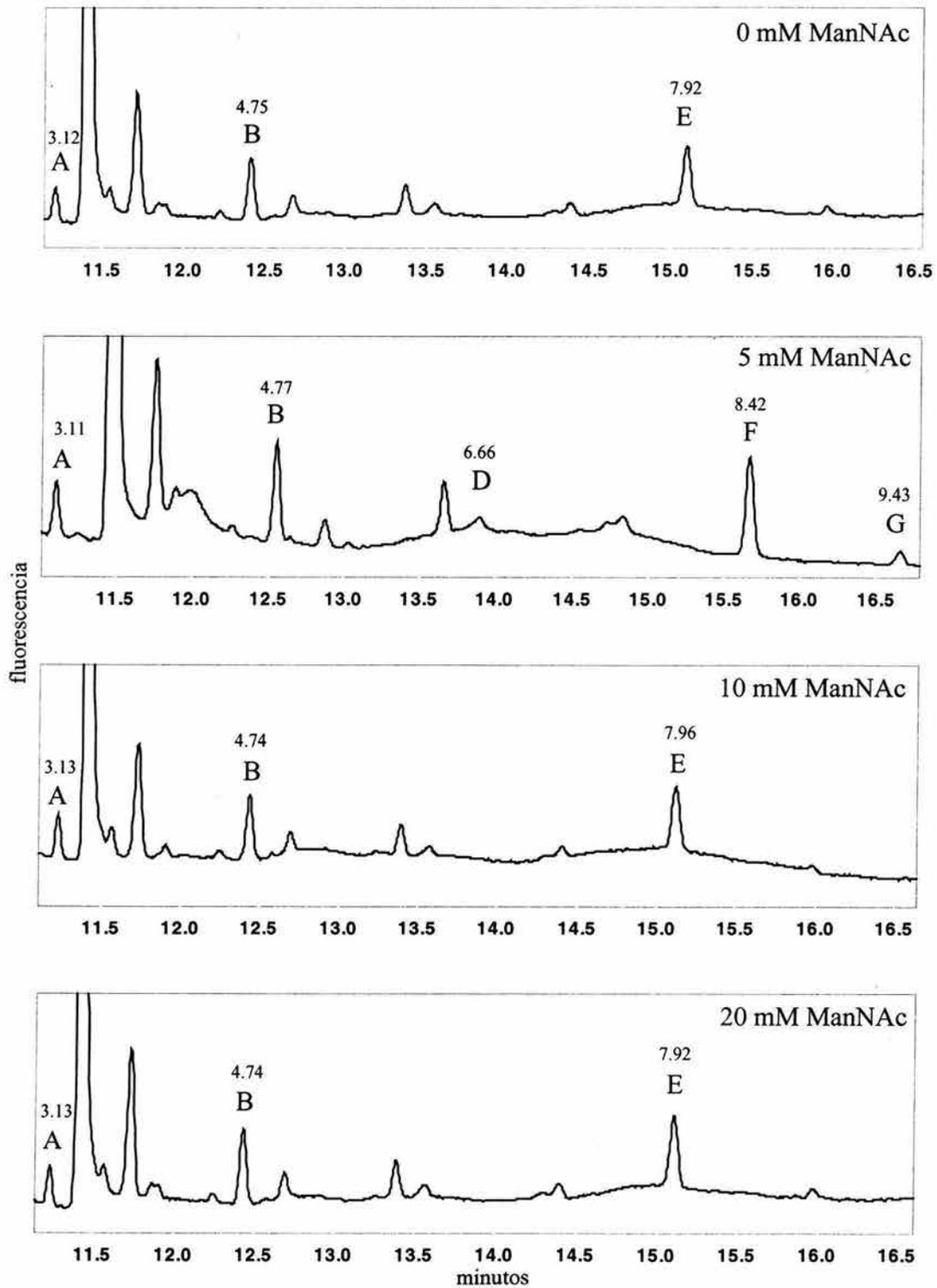


Fig. 5.12 Electroferogramas correspondientes a los oligosacáridos asociados a la proteína proveniente de los cultivos adicionados con N-acetilmanosamina cosechada a las 48 HPI. Las letras sobre los picos indican las estructuras propuestas representadas en la figura 5.7. Se indican con número las UG para las estructuras propuestas.

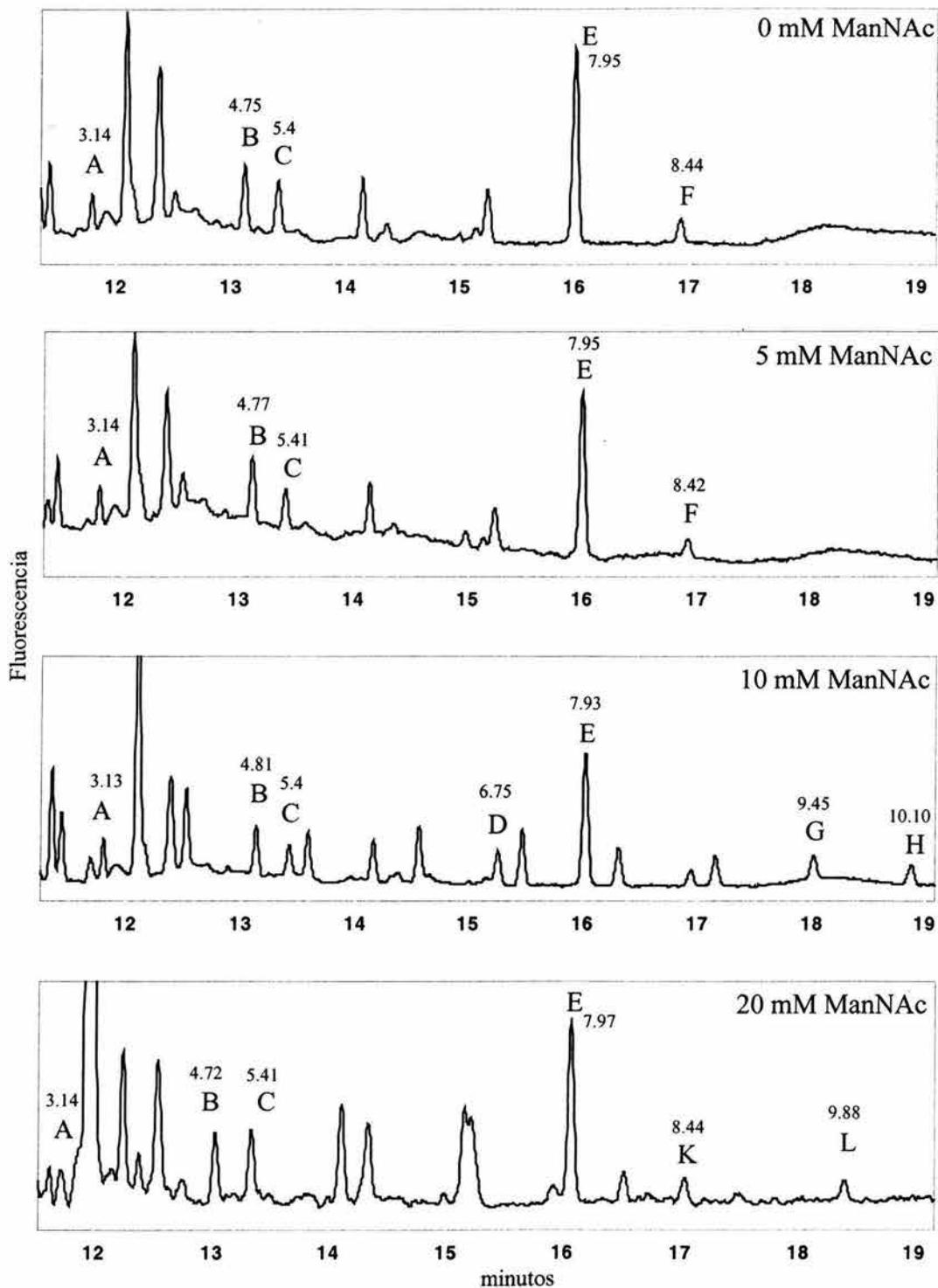


Fig. 5.13 Electroferogramas correspondientes a los oligosacáridos asociados a la proteína proveniente de los cultivos adicionados con N-acetilmanosamina cosechada a las 120 HPI. Las letras sobre los picos indican las estructuras propuestas representadas en la figura 5.7. Se indican con número las UG para las estructuras propuestas.

A diferencia de los resultados obtenidos con citidina, con la adición de N-acetilmanosamina en la cosecha a 120 horas se lograron identificar estructuras complejas, esto fue sólo a la mayor concentración de N-acetilmanosamina (20 mM). Los picos a los que hacen referencia estas estructuras corresponden en unidades de glucosa a una estructura biantenaria galactosilada (G2N2M3N2) y una estructura híbrida (dos manosas terminales y una GlcNAc terminal) según la tabla que se ha tomado como referencia (Glyko) (Fig.5.7). Esto no se observó en ninguna de las muestras analizadas de la proteína cosechada a las 48 horas. En la figura 5.14 se muestran las abundancias relativas para las formas paucimanosa, alta manosa y en su caso, híbridas y complejas tanto a 48 como a 120 horas de cosecha. Es con la adición de éste precursor en el que se identificaron las estructuras más grandes de las formas alta manosa encontradas en todos los cultivos (MAN9 en 10 mM) excepto la estructura MAN8 que se encuentra también en el cultivo adicionado con 1 mM de citidina. En las figuras 5.12 y 5.13 se muestran los electroferogramas del análisis de la proteína obtenida a las 48 y 120 horas respectivamente de los cultivos adicionados con N-acetilmanosamina. Reportes en células de mamífero muestran un aumento en la sialilación al adicionar N-acetilmanosamina, la ManNAc es fosforilada (ManNAc-6-P) (Fig. 2.7) y al condensarse con fosfo-enol-piruvato (PEP) forma NeuNAc-9-P, posteriormente entra al núcleo en donde es activado con CTP para dar como resultado CMP-NeuNAc, el cual es transportado a Golgi y adicionado como NeuNAc a la cadena de oligosacáridos por una sialiltransferasa [6]. Tomiya y Betenbaugh [8] reportan la ausencia de CMP-NeuNAc en las líneas celulares Sf-9 y H5; al expresar en células Sf-9 dos de las enzimas involucradas en la biosíntesis de CMP-NeuNAc en mamíferos (ácido acetilneuramínico sintasa y

CMP-ácido acetilNeuramínico sintasa) logran detectar niveles de casi la mitad de los encontrados en células CHO, y al incubar éstas células con 10 mM de N-acetilmanosamina logran elevar en más de 10 veces la concentración intracelular de CMP-NeuNAc. Kim y colaboradores [61] reportan una deficiencia en la enzima encargada de fosforilar la N-acetilmanosamina (fig. 2.7) en células de insecto, por lo cual

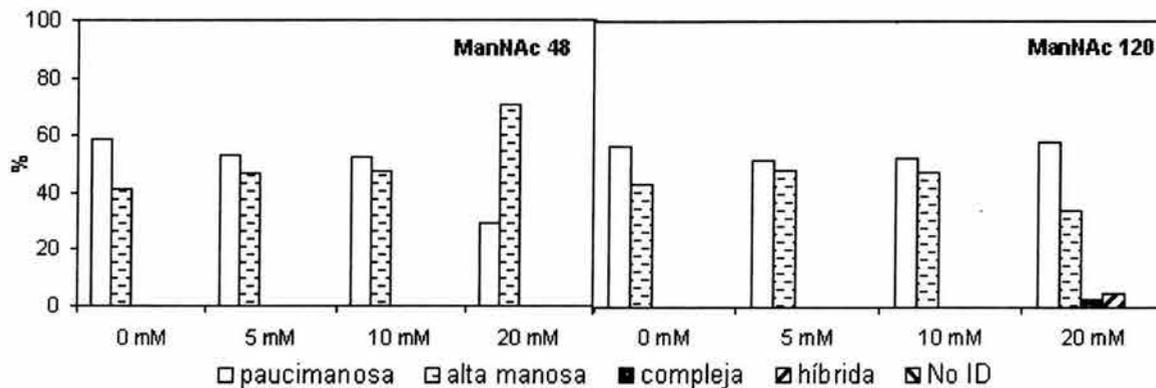


Fig. 5.14 Abundancia relativa de formas paucimanosa, alta manosa, compleja e híbrida en los cultivos tratados con N-acetilmanosamina

el Neu5Ac no puede ser sintetizado. Sin embargo, otros grupos de investigación reportan resultados que contradicen el hecho de que las células de insecto no son capaces de sintetizar el donador activado del ácido siálico. Watanabe y colaboradores [62] publican la obtención de una glicoproteína sialidada producida en células H5 adicionando un inhibidor de la β -N-Acetilglucosaminidasa, esto sugiere que el paso limitante en la sialilación de proteínas en células de insecto podría ser la alta actividad β -N-Acetilglucosaminidasa, pero que todos los precursores y las enzimas involucradas en la formación de estructuras complejas y sialidadas están presentes y funcionando correctamente. Por esta razón, si bien en células de mamífero y otras líneas celulares de insecto [25, 56, 60], se han logrado producir proteínas recombinantes sialidadas bajo ciertas condiciones de cultivo, en nuestro caso lo que pudiera estar evitando obtener estructuras sialidadas aún agregando N-acetilmanosamina, sea una alta actividad β -N-

Acetilglucosaminidasa. Otros estudios realizados en células de insecto sugieren una incapacidad propia de la línea celular para sintetizar el precursor del ácido siálico [8], sin embargo, con los resultados obtenidos en este trabajo no pueden hacerse conjeturas de ésta naturaleza. Aunado a esto, otro factor determinante en el procesamiento de glicanos son los nutrientes proporcionados por el medio de cultivo, en estudios realizados con otras líneas celulares derivadas de *Trichoplusia ni* (Tn-4s, Tn-4h) [39, 60, 63], se han logrado estructuras complejas e incluso sialidadas utilizando medios de cultivo adicionados con suero fetal bovino (TNM-FH), o utilizando medios de cultivo específicos para líneas derivadas de *Trichoplusia ni* (EXPRESS-FIVE[®], EX-CELL401[®]). Hollister y colaboradores [64] logran producir una glicoproteína sialidada en una línea celular transgénica derivada de Sf9 que expresa constitutivamente una galactosiltransferasa y una sialiltransferasa de mamífero, pero únicamente cuando se cultivan en medio suplementado con suero fetal bovino o con fetuína (glicoproteína bovina sialidada), por lo que sugieren una vía alterna para la incorporación de ácidos siálicos a las glicoproteínas producidas en células de insecto que involucra una ruta de salvamento de los ácidos siálicos de proteínas presentes en el medio de cultivo.

5.3.3 Tratamientos con manosamina

Los resultados de las estructuras propuestas para los oligosacáridos asociados a la proteína obtenida a 48 y 120 horas en los cultivos adicionados con manosamina se muestran en las tablas 5.5a y 5.5b respectivamente en donde se muestran las unidades de glucosa, el tipo de estructura y el porcentaje de abundancia

a) ManN 48 h		0 mM	5 mM	10 mM	20 mM
UG	Estructura	%	%	%	%
3.1	MNN	17.2	24.65	11.8	24.73
4.78	M3N2	35.9	19.45	11.1	14.35
6.0	No ID	nd	nd	42.7	20.33
7.97	MAN6	33.9	55.89	30	40.57
8.47	MAN7	13	nd	4.35	nd

b) ManN 120 h		0 mM	5 mM	10 mM	20 mM
UG	%	%	%	%	%
3.1	MNN	11.41	11.91	17.08	nd
4.78	M3N2	30.08	26.84	24.65	21.13
5.5	M3N2F	15.9	20.35	11.84	16.5
6.0	No ID	nd	nd	nd	11.1
6.7	MAN5	8.42	4.38	nd	nd
7.97	MAN6	30.4	25.39	36.51	42.94
8.47	MAN7	3.72	4.44	nd	3.37
7.07	N2M3N2	nd	6.67	nd	nd
8.85	N4M3N2	nd	nd	7.23	4.96
10.09	G2N2M3N2F	nd	nd	2.69	nd

Tabla 5.5 a) Estructuras de oligosacáridos propuestas y porcentaje de abundancia, cosecha a 48 HPI, b) Estructuras de oligosacáridos propuestas y porcentaje de abundancia, cosecha a 120 HPI. nd= no detectado.

Al igual que en los resultados mostrados para los cultivos adicionados con ManNAc, la mayoría de las estructuras propuestas tienen manosas terminales. En el caso de la adición de manosamina, se encuentran formas complejas asociadas a la proteína cosechada a las

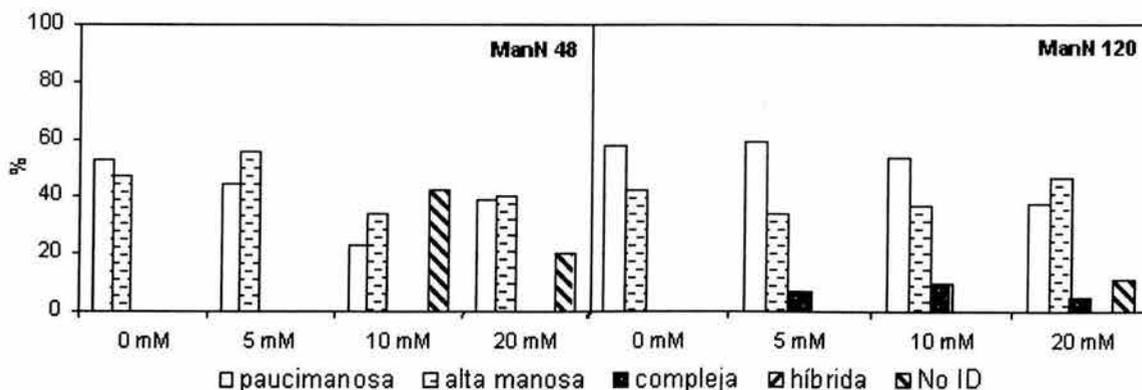


Fig. 5.15 Abundancia relativa de formas paucimanosa, alta manosa, compleja y No ID en los cultivos tratados con manosamina

120 horas en las tres concentraciones ensayadas. Para el caso del cultivo adicionado con 5 mM de manosamina la única estructura compleja con una abundancia del 6.68% es una estructura N2M3N2 (sin siálicos, sin galactosas, biantenaria con N-acetilglucosaminas (GlcNAc) terminales), con la adición de 10 mM de manosamina se proponen dos estructuras complejas, una tetraantenaria con GlcNAc terminales (N4M3N2) y una biantenaria con galactosas terminales (G2N2M3N2F). En el cultivo adicionado con 20 mM de manosamina volvemos a encontrar la estructura N4M3N2 y también una estructura que no ha sido identificada (*No ID). En el análisis de los oligosacáridos asociados a la proteína cosechada a 48 horas, solo se encuentran formas paucimanosa y alta manosa y nuevamente encontramos una estructura No ID que está presente en 10 y 20 mM. En la figura 5.15 se muestran las abundancias relativas para las formas paucimanosa, alta manosa, y complejas en la proteína cosechada a 48 y 120 horas en los cultivos adicionados con Manosamina.

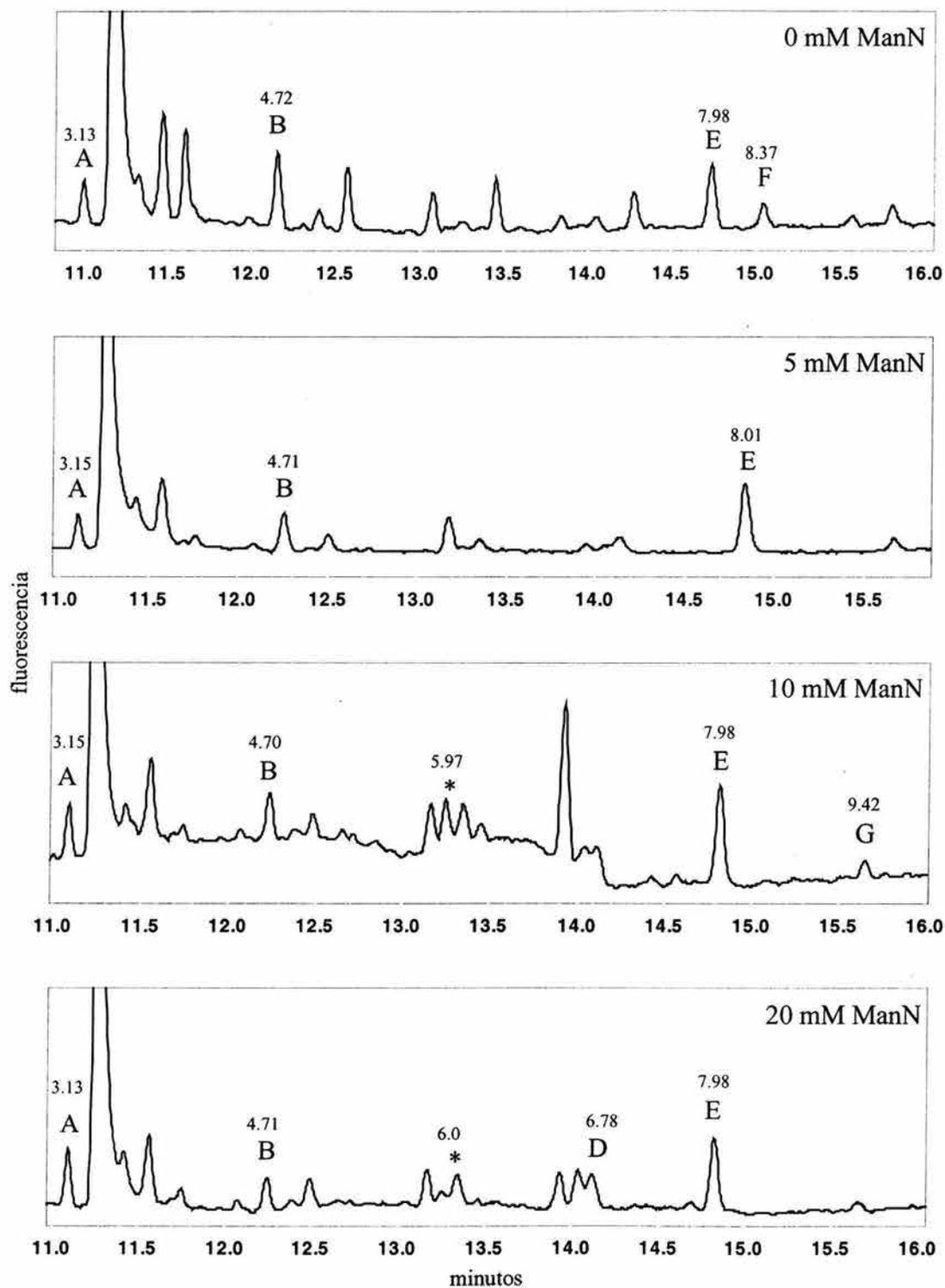


Fig. 5.16 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con manosamina 48 HPI. Las letras sobre los picos indican las estructuras propuestas representadas en la figura 5.7. Se indican con número las UG para las estructuras propuestas.

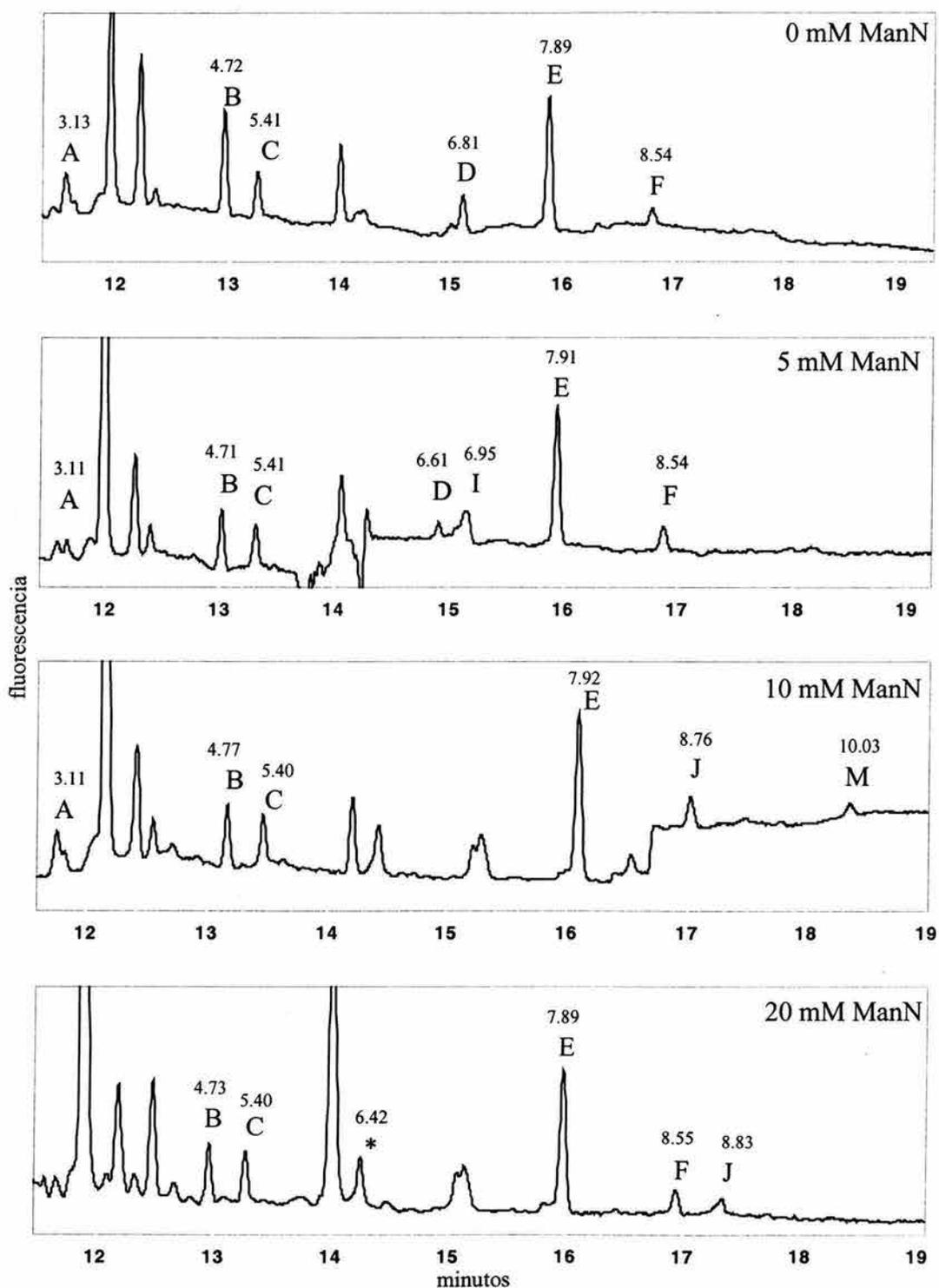


Fig. 5.17 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con manosamina 120 HPI. Las letras sobre los picos indican las estructuras propuestas representadas en la figura 5.7. Se indican con número las UG para las estructuras propuestas.

Si bien la mayoría de las estructuras corresponden a paucimanosa y alta manosa, es evidente la formación de estructuras complejas desde la primer concentración ensayada en el caso de la proteína obtenida a las 120 HPI. En las figuras 5.16 y 5.17 se muestran los electroferogramas del análisis de los oligosacáridos asociados a la proteína obtenida a las 48 y 120 horas respectivamente de los cultivos adicionados con manosamina. La aparición de estructuras complejas con la adición de manosamina no podría explicarse en función del aumento de precursores activados ya que este aminoazúcar no figura en ninguna de las rutas de biosíntesis (Fig. 2.6). Donaldson y colaboradores [41] reportan un aumento en estructuras resistentes a manosidasa en cultivos de células de insecto adicionados con manosamina, y lo atribuyen a una posible inhibición de la β -N-acetilglucosaminidasa. Watanabe y colaboradores [62] utilizando 2-acetamido-1,2-dideoxynojirimycin como inhibidor de la β -N-Acetilglucosaminidasa, demostraron que la línea celular Tn5B1-4 posee la maquinaria enzimática para lograr un procesamiento completo de N-glicanos. Si bien en los cultivos adicionados con manosamina que se reportan en este trabajo se determinó un mayor número de estructuras complejas, el hecho de no identificar sialidades hace suponer deficiencias en la vía de síntesis del donador del ácido siálico (CMP-NeucNAc) y/o la ausencia de la actividad sialiltransferasa. Esto recalca la importante repercusión de la actividad β -N-Acetilglucosaminidasa sobre el procesamiento de N-glicanos en células de insecto, y deja al aire la interrogante de si el tratamiento con manosamina está logrando de alguna manera reducir la actividad β -N-Acetilglucosaminidasa y por lo tanto favoreciendo la formación de estructuras complejas. Con la finalidad de esclarecer estos resultados se realizó un ensayo de la actividad hexosaminidasa en extractos celulares con y sin adición de Cyt, ManNAc y ManN.

5.4 ACTIVIDAD β -N-ACETILGLUCOSAMINIDASA

En los cultivos tratados con manosamina se identificaron estructuras complejas, tal vez indicando que la presencia de manosamina permitió su síntesis. En estudios realizados anteriormente [41] en células de insecto se sugiere que la manosamina pueda estar actuando como un inhibidor de la β -N-Acetilglucosaminidasa (hexosaminidasa) (fig. 2.7), sin embargo, no proponen ningún mecanismo ni muestran evidencia de ello. La inhibición a la hexosaminidasa provocaría una reducción de las formas paucimanosa, aumentando la disponibilidad de formas que si serían sustrato de las transferasas encargadas de originar formas complejas y sialidadas.

En un reporte de Watanabe y colaboradores [62] logran la obtención de estructuras sialidadas en una proteína expresada por el sistema células de insecto-baculovirus bajo la

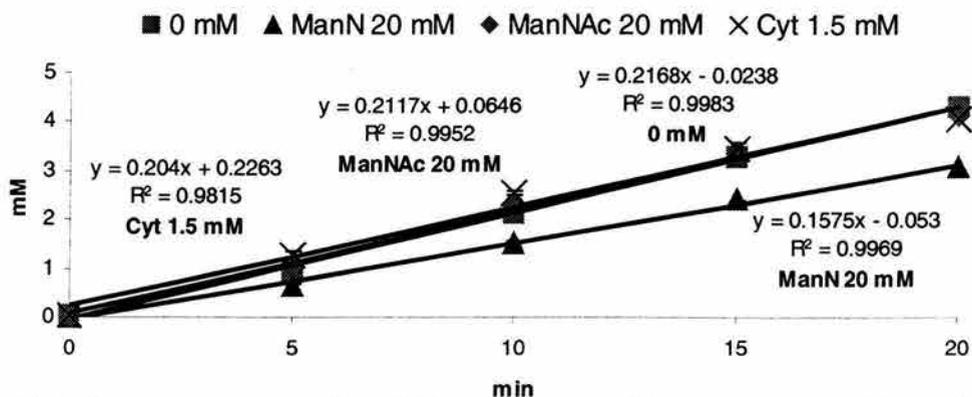


Fig 5.18 Ensayo para actividad β -N-Acetilglucosaminidasa en extractos celulares, la pendiente de las rectas representa la velocidad (mM/min) de degradación del sustrato. Las barras de error no alcanzan a observarse por ser más pequeñas que la viñeta.

acción de 2-acetamido-1,2-dideoxynojirimycin como inhibidor de la actividad hexosaminidasa. En el tratamiento con manosamina se observó la aparición de N-glicanos complejos, lo cual sugiere que las enzimas respectivas están activas y dispusieron del

sustrato necesario. Para probar si el tratamiento con manosamina era capaz de inhibir la actividad hexosaminidasa se realizó un ensayo en extractos celulares. En el ensayo se probaron las concentraciones 1.5 mM para citidina y 20 mM para manosamina y N-acetilmanosamina (el ensayo fue realizado como se describe en el capítulo Materiales y Métodos). En la figura 5.18 se muestra el comportamiento de la degradación de sustrato a lo largo de 20 minutos, lo que vemos en cada caso es una recta en la que la pendiente es la velocidad de consumo de sustrato (mM/min); se observa claramente que los ensayos realizados en presencia de Cyt y ManNAc tienen una velocidad prácticamente igual al ensayo realizado únicamente con el extracto y el sustrato (0 mM), sin embargo, el ensayo al que se le agregó ManN muestra una pendiente menor.

En la tabla 5.6 se detallan los resultados del ensayo de actividad hexosaminidasa mostrando el valor de las velocidades de consumo de sustrato ($\mu\text{M}/\text{min}$) para cada uno de los ensayos realizados, así como el margen de error para cada caso (cada ensayo fue realizado por duplicado).

		Velocidad ($\mu\text{M}/\text{min}$)	+/-
Control	0 mM	217	11
Cyt	1.5 mM	204	5
ManNAc	20 mM	212	8
ManN	20 mM	157	0

Tabla 5.6 Velocidad de consumo de sustrato para hexosaminidasa en extracto celular. (+/-) Rango de variación entre dos experimentos.

Estos resultados muestran un efecto de la manosamina sobre la velocidad de consumo de sustrato de la β -N-Acetilglucosaminidasa, responsable tal vez de la aparición de formas complejas. Utilizando 5mM de 2-acetamido-1,2-dideoxynojirimycin, Watanabe

logra una disminución de la actividad hexosaminidasa de hasta 79.1%, y en nuestro caso, la adición de 20 mM de manosamina reduce la velocidad de consumo de sustrato en un 27.65%, esta diferencia pudiera estar condicionando el encontrar o no estructuras sializadas y observándose únicamente la reducción de formas paucimanosa y la aparición de estructuras complejas en los cultivos tratados con manosamina, sin embargo, es sólo un acercamiento y queda aún como una propuesta para explicar el porqué de los resultados obtenidos en el análisis de glicanos.

Capítulo VI CONCLUSIONES

En la primera parte de este trabajo se caracterizó el efecto de la adición de citidina (0.5, 1.0 y 1.5 mM), N-acetilmanosamina (5, 10 y 20 mM) y manosamina (5, 10 y 20 mM) sobre el crecimiento, consumo de glucosa, generación de lactato y producción de proteína recombinante de cultivos de células Tn5B1-4.

Sólo a la mayor concentración de citidina (1.5 mM) y manosamina (20 mM) se vio arrestado el crecimiento, disminuyendo la velocidad específica de crecimiento en un 30% con respecto a los cultivos control (0 mM). En los cultivos restantes, ni la velocidad específica de crecimiento ni el índice de crecimiento muestran este efecto sobre el crecimiento.

Los cultivos no infectados agotan la glucosa antes de las 96 HPI y a partir de este punto comienzan a consumir el lactato generado para obtener energía. Esto no se observa en los cultivos no infectados, por lo que no se encuentran limitados en fuente de carbono para el mantenimiento celular y síntesis de proteínas.

Respecto a la producción de proteína recombinante no se encontraron variaciones significativas ni en la producción específica ni en la velocidad específica de producción. De tal manera, la integración de todas estas características de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de proteína recombinante, permiten aseverar que las diferencias encontradas en la N-glicosilación de la proteína recombinante producida, pueden ser atribuidas a la incubación con las sustancias ensayadas y no a factores como alteración en la asimilación de nutrientes, acumulación de metabolitos tóxicos o saturación de la maquinaria de expresión de la proteína heteróloga.

En la segunda parte del trabajo se evaluó el efecto de la adición de citidina, N-acetilmanosamina y manosamina sobre la glicosilación de SeAP producida en células Tn5B1-4. En los tres tratamientos (Cyt, ManN y ManNAc) tanto a 48 como a 120 HPI la mayoría de estructuras propuestas corresponden a formas alta manosa y paucimansa, lo cual indica un procesamiento incompleto y una alta actividad hexosaminidasa respectivamente. Para la proteína cosechada a 120 HPI en la mayor concentración de ManNAc (20 mM) se identificó un 2.89% de estructuras complejas y 4.8% de una estructura híbrida; sin embargo, el efecto más drástico se observó en la proteína proveniente de los cultivos tratados con manosamina, en los cuales se observa una tendencia de aumento en la formación de estructuras complejas que pareciera ser dependiente de la concentración de manosamina adicionada al medio de cultivo.

La medición en extractos celulares de la actividad hexosaminidasa en presencia de Cyt, ManNAc y ManN, muestra una reducción en la velocidad de consumo de sustrato en presencia de 20 mM ManN, lo cual justifica la aparición de formas complejas y correlaciona con la aparente reducción de las formas paucimansas en los tratamientos con manosamina.

Es evidente que el aumento de la disponibilidad de nucleótido-azúcares no es condición suficiente para la obtención de formas complejas. Para lograr esto último es necesario también considerar las capacidades propias de cada línea celular en cuanto a la actividad de glicosiltransferasas y glicosidasas involucradas en el procesamiento de oligosacáridos complejos.

Capítulo VII PERSPECTIVAS

Hasta hace algunos años, los estudios con células de insecto estaban enfocados principalmente a la caracterización de líneas celulares y de los factores relacionados con las condiciones de cultivo. Actualmente el sistema está perfectamente establecido para la expresión de cientos de proteínas recombinantes, sin embargo, para la expresión de proteínas de interés terapéutico se siguen llevando a cabo estudios para el mejoramiento de medios de cultivo y para la “humanización” de líneas celulares mediante manipulación genética.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que manipulando las condiciones de cultivo de células de insecto, se puede modificar la glicosilación de la proteína recombinante producida. Un factor muy importante que debe ser considerado en estudios posteriores está relacionado con la maquinaria enzimática involucrada desde la síntesis de los precursores hasta la incorporación de azúcares en la cadena de oligosacáridos asociados a la proteína.

La sobreexpresión de glicosiltransferasas y de enzimas que participan en la síntesis del CMP-NeuNAc, así como la reducción de la actividad hexosaminidasa mediante la inhibición química o silenciamiento del gen involucrado, serían estrategias viables para mejorar el procesamiento postraducciona l en el sistema células de insecto-baculovirus.

REFERENCIAS

1. Palomares, L.A., Ramírez O.T., *Insect cell culture: recent advances, Bioengineering challenges and implications in protein production*. En: Advances In Bioprocess Engineering, E. Galindo y O.T. Ramírez (eds), Kluwer Academic Publishers, 1998. **2**: p. 25-32.
2. Palomares, L.A., Ramírez O.T., *Complex N-glycosilation of recombinant proteins by insect cells*. Bioprocessing, 2002: p. 70-73.
3. Goochee, C.F., Monica, T., *Environmental effects on protein glycosylation*. Biotechnology Review, 1990. **8**(5): p. 421-427.
4. Altamirano, C., Paredes, C., Cairó, J.J., Godia, F., *Improvement of CHO cell culture medium formulation: Simultaneous substitution of glucose and glutamine*. Journal of American Chemical Society, 1999.
5. Rijcken, P.R., Overdijk B., Van Den Eijnden D., Ferwerda W., *The effect of increasing nucleotide-sugar concentration on the incorporation of sugars into glucoconjugates in rat hepatocytes*. Journal of Biochemistry, 1995. **305**: p. 865-870.
6. Wang, C., Daniel I., Gu Xuenjun, *Improvement of interferon- γ sialilation in Chinese Hamster Ovary cell culture by feeding of N-acetylmannosamine*. Biotechnology and Bioengineering, 1997. **58**(6): p. 642-648.
7. Tomiya, N., Ailor E., Lawrence M. Betenbaugh J, *Determination of nucleotides and sugar nucleotides involved in protein glycosilation by High-Performance Anion-Exchange Chromatography: Sugar nucleotide contents in cultured insect cells and mammalian cells*. Analytical Biochemistry, 2001. **293**: p. 129-137.
8. Tomiya, N., Betenbaugh M.J., Yuan C. Lee, *Humanization of lepidopteran insect-cell-produced glycoproteins*. Acc. Chem. Res, 2003. **36**(8): p. 613-620.
9. Freeze, H., *Monosaccharide metabolism*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, Cummings R., Esko J., Freeze H., Hart G., Marth J., Editor. 1999, CSHL press: New York. p. 69-83.

10. Makrides, S.C., *Expression systems, E. coli*, in *Encyclopedia of Bioprocess Technology*, M.C. Flickinger, Drew S.W., Editor. 1999, Wiley Biotechnology Encyclopedias. p. 1123-1133.
11. Riad, M., Padh H., *Expression systems for production of heterologous proteins*. current Science, 2001. **80**(9): p. 1121-1128.
12. Sreekrishna, K., *Pichia, optimization of protein expression*, in *Encyclopedia of Bioprocess Technology*, M.C. Flickinger, Drew S.W., Editor. 1999, Wiley Biotechnology Encyclopedias. p. 1971-1986.
13. Ganguly, G., Shatzman AR, *Expression systems, mammalian cells*, in *Encyclopedia of Bioprocess Technology*, M.C. Flickinger, Drew S.W., Editor. 1999, Wiley Biotechnology Encyclopedias. p. 1134-1145.
14. Betenbaugh, M.J., Ailor, E., Whiteley, E., *Insect cells and larvae, gene expression systems*, in *Encyclopedia of Bioprocess Technology*, M.C. Flickinger, Drew S.W., Editor. 1999, Wiley Biotechnology Encyclopedias. p. 1457-1476.
15. Vaughn, J., *Insect cell culture, Protein expression*, in *Encyclopedia of Bioprocess Technology*, M.C. Flickinger, Drew S.W., Editor. 1999, Wiley Biotechnology Encyclopedias. p. 1444-14456.
16. O'Reilly, D.R., Miller, L.K., Luckow, V.A., *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. 1994, Oxford University Press, Luc.
17. Smith, G., Summers, M., Fraser, M., *Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector*. Molecular cell biology, 1983. **3**: p. 2156-2165.
18. Jenkins, N., Shah, P.M., *Protein glycosylation*, in *Encyclopedia of Bioprocess Technology*, M.C. Flickinger, Drew S.W., Editor. 1999, Wiley Biotechnology Encyclopedias. p. 2169-2178.
19. Marth, J., *N-Glycans*, in *Essentials of Glycobiology*, C.R. Varki A, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J, Editor. 1999, CSHL press: New York. p. 85-100.
20. März, L., Altmann F., Staudacher E., Kubelka V., *Protein glycosylation in insects*, in *Glycoproteins*, H.S. J. Montreuil, and J.F.G. Vliegenthart, Editor. 1995, Elsevier Science: Vienna, Austria. p. 543-563.

21. Kuroda, K., Geyer, H., Geyer, R., Doefler, W., Klenk, H., *The oligosaccharides of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells by baculovirus vector*. Virology, 1990. **147**: p. 418-429.
22. Davidson, D.J., Castellino, F.J., *Structures of the Asparagine-289-linked oligosaccharides assembled on recombinant human plasminogen expressed in a Mamestra brassicae*. Biochemistry, 1991. **30**: p. 6689-6696.
23. Altmann, F., Schwihla, H., Staudacher, E., Glossl, J., Marz, L., *Insect cells contain an unusual membrane bound β -N-acetylglucosaminidase probably involved in the processing of protein N-glycans*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(9): p. 17344-17349.
24. Ögonah, O.W., Freedman, R.B., Jenkins, N., Patel, K., Rooney, B.C., *Isolation and characterization of an insect cell line able to perform complex N-linked glycosylation on a recombinant protein*. Bio/technology, 1996. **14**: p. 197-202.
25. Palomares, L.A., Joosten, C.E., Hughes, P.R., Granados R.R., Shuler M.L., *Novel insect cell line capable of complex N-glycosylation and sialylation of recombinant proteins*. Biotechnology Progress., 2003. **19**(1): p. 185-192.
26. Bédar, C., Tom, R., and A. Kamen, *Growth, nutrient consumption, and end-product accumulation in Sf-9 and BTI-EAA insect cell cultures: insights into growth limitation and metabolism*. Biotechnology Progress., 1993. **9**: p. 615-624.
27. Drews, M., Paalme, T., Vilu, R., *The growth and nutrient utilization of insect cell line Spodoptera frugiperda Sf-9 in batch and continuous culture*. Journal of Biotechnology, 1995. **40**: p. 187.
28. Grace, T., Brzostowski, H., *Analysis of the amino acids and sugars in an insect cell culture*. Journal of Insect Physiology, 1966. **12**: p. 652-633.
29. Reuveny, S., Kemp, C., Shiloach, J., *Carbohydrate metabolism in insect cell cultures during cell growth and recombinant protein production*. Annual N.Y. Academic Science., 1992. **665**: p. 230-237.
30. Öhman, L., Ljunggreen, J., Hagsstrom, L., *Introduction of a metabolic switch in insect cells by substrate-limited fed batch cultures*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995. **43**: p. 1-8.

31. Nermann, J., Wagner R., *Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cells lines, insects and primary cells.* Journal of Cell Physiology, 1996. **166**(1): p. 152-159.
32. Ferrance, J., Goel, A., Ataa, M., *Utilization of glucose and amino acids in insect cells cultures: Quantifying the metabolic flows within the primary pathways and medium development.* Biotechnology and Bioengineering, 1993. **42**: p. 697-707.
33. Yang, J.D., Gecik, P., Collins, A., Czarnecki, S., Solberklang, M., *Rational Scale-up of a baculovirus-insect cell batch process based on medium nutritional.* Biotechnology and Bioengineering, 1996. **52**: p. 696-706.
34. Power, J., Reid, S., Radford, K., Greenfield, P., Nielsen, L., *Modeling and optimization of the baculovirus expression vector system in batch suspension culture.* Biotechnology and Bioengineering, 1994. **44**: p. 710-719.
35. Kamen, A., Tom, R., Caron, A., Chavaire, C., Massie, B., Archambault, J., *Culture of insect cells in a helical ribbon impeller bioreactor.* Biotechnology and Bioengineering, 1991. **38**: p. 619-628.
36. Wong, T.K.K., Nielsen L. K., Greenfield P.F., Reid S., *Relationship between oxygen uptake rate and time of infection of Sf-9 insect cells infected with a recombinant baculovirus.* Cytotechnology, 1994. **15**: p. 157-167.
37. Wang, M.Y., Kwong, S., Bentley, W.E., *Effects of oxygen/glucose/glutamine feeding on an insect cell baculovirus protein expression: A study on epoxide hydrolase production.* Biotechnology Progress., 1996. **9**: p. 355-361.
38. Ailor, E., Betenbaugh, M., *Modifying secretion and post-traductional processing in insect cells.* Biochemical Engineering, 1999. **10**: p. 142-143.
39. Joshi, L., Shuler, M.L., Wood H. A., *Production of a Sialylated N-Linked Glycoprotein in Insect Cell.* Biotechnology Progress, 2001. **17**: p. 822-827.
40. Grammatikos, S.I., Valley, U., Conradt, H.S. and Wagner, R., *Intracellular UDP-N-Acetylhexosamine Pool Affects N-Glycan Complexity: A Mechanism of Ammonium Action on Protein Glycosylation.* Biotechnology Progress., 1998. **14**: p. 410-419.
41. Donaldson, M., Wood, H.A., Kulakosky, P.C., Wood, H.A., Shuler, M.L., *Use of mannosamine for inducing the addition of outer arm N-acetylglucosamine onto N-*

- linked oligosaccharides of recombinant proteins in insect cells*. Biotechnology Prog., 1999. **15**: p. 168-173.
42. Millian, J.L., *Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase*. Journal of Biological Chemistry, 1986. **261**: p. 3112-3115.
 43. Berger, J., Howard, A.D., Gerber, L., Cullen, B.R. Udenfriend, S., *Expression of active, membrane-bound human placental alkaline phosphatase by transfected simian cells*. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1987. **84**: p. 4885-4889.
 44. Berger, J., Hauber, J., Hauber, R., Geiguer, R., Cullen, B.R., *Secreted placental alkaline phosphatase: A powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells*. Gene, 1988. **66**: p. 1-10.
 45. Davis, T.R., Granados, R.R., Wood, H.A., *Baculovirus expression of alkaline phosphatase as a reporter gene for evaluation of production, glycosilation and secretion*. Biotechnology Progress, 1992.
 46. Meneses, A., *El potencial de óxido-reducción: implicaciones y efectos en el cultivo de células de eucariotes superiores*, Instituto de Biotecnología, UNAM., 2001, Cuernavaca, Morelos., Tesis de doctorado.
 47. Suzuki, S., Kelly, J.F., Locke, S.J., Thibault, P., Honda S, *Derivatization of Carbohydrates*, in *Capillary Electrophoresis of Carbohydrates*, P. Thibault, and Honda S., Editor. 2003, Humana Press: Totowa, New Jersey. p. 41-70.
 48. Rassi, Z., *High Performance Capillary Electrophoresis of Carbohydrates*. 1996, U.S.A.: Beckman.
 49. Xu, Y., *Tutorial: Capillary Electrophoresis*, in *The chemical educator*. 1996, Springer-Verlag New York. p. 1-14.
 50. Rassi, Z., *Introduction to Capillary Electrophoresis*. 1996, U.S.A.: Beckman. 3-11.
 51. Joshi, L., Davis T.R., Mattu T.S., Rudd P.M., Dwek R.A., Shuler M.L., and Wood H.A., *Influence of baculovirus-host cell interactions on complex N-linked glycosylation of a recombinant human protein*. Biotechnology Progress., 2000. **16**: p. 650-656.
 52. Ortega-García, A., *Efecto del tiempo de infección y de la multiplicidad de infección sobre la expresión de una proteína modelo expresada en dos líneas*

- celulares de insecto: High Five y Sf9 en cultivos en suspensión*, Instituto de Biotecnología, UNAM., 2003, Cuernavaca, Morelos., Tesis de maestría.
53. Rhiel, M., Mitchell-Logean, C.M., Murhammer D.W., *Comparision of Trichoplusia ni BTI-Tn-5B1-4 (Hig Five) and Spodoptera frugiperda Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures*. Biotechnology and bioengineering, 1997. **55**: p. 909-920.
 54. Nyberg, G.B., Follstad, B.D., Stephanopoulos, G., Wang, D.I., *Metabolic effects on recombinant interferon-gamma glycosylation in continuous culture of Chinese hamster ovary cells*. Biotechnology and Bioengineering, 1999. **62**(3): p. 336-347.
 55. Rearick, J.I., Kornfeld, S., *Glucose starvation alters lipid-linked oligosaccharide biosynthesis in Chinese hamster ovary cells*. Journal of Biological Chemistry., 1981. **256**(12): p. 6255-6261.
 56. Joosten, C.E., Shuler, M., *Effect of culture conditions on the degree of sialylation of a recombinant glycoprotein expressed in insect cells*. Biotechnology Progress., 2003. **19**: p. 739-749.
 57. Jarvis, D.L., Ziad, S.K., Hollister, J.R., *Engineering N-glycosylation pathways in the baculovirus-insect cell system*. Current Opinion in Biotechnology, 1998. **9**: p. 528-533.
 58. Fumingm, Z., Murhammer, D.W., Linhardt R.J., *Enzyme Kinetics and glycan structural characterization of secreted alkaline phosphatase prepared using the baculovirus expression vector system*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2002. **101**(3): p. 197-210.
 59. Donaldson, M., Wood, H.A., Kulakosky, P.C., Shuler, M.L., *Glycosylation of a recombinant protein in the Tn5B1-4 insect cell line: Influence of ammonia, time of harvest, temperature, and dissolved oxygen*. Biotechnology and Bioengineering, 1999. **63**(3): p. 255-262.
 60. Joosten, C., Shuler M.L., *Production of a sialylated N-linked glycoprotein in insect cells: role of glycosidases and effect of harvest time on glycosylation*. Biotechnology Progress., 2003. **19**: p. 193-201.
 61. Kildong, K., Lawrence S.M., Park J., Pitts L., Betenbaugh M., Palter K.B., *Expression of a functional Drosophila melanogaster N-acetylneuraminic acid*

- (Neu5Ac) phosphate syntase gene: evidence for endogenous sialic acid biosynthetic ability in insects.* Glycobiology, 2002. **12**(2): p. 73-83.
62. Watanabe, S., Kokuho, T., Takahashi, H., Takahashi M, Kubota T, Inumaru S., *Sialylation of N-glycans on the recombinant proteins expressed by a baculovirus-insect cell system under N-acetylglucosaminidase inhibition.* The Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(7): p. 5090-5093.
63. Joosten, C., Joshi, L., *Glycoform analysis of Secreted human Alkaline Phosphatase (SeAP).* 2000. p. 1-12.
64. Hollister J, C.H., Jarvis DL., *Evidence for a sialic acid salvaging pathway in lepidopteran insect cells.* Glycobiology, 2003. **13**(6): p. 487-495.
65. Quintero, R., *Ingeniería Bioquímica, Teoría y Aplicaciones.* 1993, México, D.F.: Ed. Alhambra Mexicana.
66. Luan, Y.T., Mutharasan R., Magee W.E., *Strategies to extend longevity of hybridomas in cultures and promote yield of monoclonal antibodies.* Biotechnology Letters, 1987. **9**: p. 691-696.
67. Yamaji, H., Tagai S., Fukuda H., *Optimal production of recombinant protein by the baculovirus-insect cell system in shake-flask culture with medium replacement.* Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999. **87**: p. 636-641.

APÉNDICE A

A.1 Cálculo de la velocidad específica de crecimiento e índice de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento aparente (μ) de los cultivos fue calculada durante la fase exponencial de crecimiento en la que:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (A1)$$

donde x es la concentración celular del cultivo al tiempo t . Al integrar la ecuación A1 se obtiene

$$\ln(x/x_0) = \mu t \quad (A2)$$

donde x_0 es la concentración inicial de células viables. La ecuación A2 representa el crecimiento exponencial [65]. De esta manera, la μ es la pendiente de la recta que resulta al graficar $\ln(x/x_0)$ contra t . Utilizando la velocidad específica de crecimiento ya calculada, se puede obtener el tiempo de duplicación del cultivo con la siguiente expresión:

$$td = \ln 2 / \mu \quad (A3)$$

A.2 Determinación del índice de crecimiento

Debido a la infección por el baculovirus recombinante, la velocidad específica de crecimiento de células infectadas sufre una desaceleración y no se mantiene constante durante la fase de crecimiento. Por ésta razón, el crecimiento de células infectadas no ocurre de forma exponencial, por lo que no puede ser descrito por la ecuación A2. Con la finalidad de poder caracterizar las cinéticas de crecimiento en cultivos infectados se define el parámetro “índice de crecimiento” (IC) que representa el número de veces que creció el cultivo y se define como:

$$IC = x_{vm}/x_0 \quad (A4)$$

en donde x_{vm} es la concentración celular máxima alcanzada y x_o es la concentración celular en el momento de la infección.

A.3 Cálculo de la velocidad específica de producción de proteína recombinante

Basándose en el modelo de Luedeking-Piret, que describe la velocidad de producción de un determinado producto en función de su asociación con el crecimiento:

$$dP/dt = (\alpha * \mu + \beta) x_v \quad (A5)$$

donde dP/dt es la velocidad volumétrica de producción de proteína recombinante (mg/mL*h), α una constante estequiométrica y β una constante cinética. Como ya se mencionó anteriormente, los cultivos infectados no siguen un modelo exponencial de crecimiento y μ es muy pequeña, por lo que la ecuación A5 se reduce a la siguiente expresión:

$$dP/dt = \beta x_v \quad (A6)$$

donde β es la constante del producto no asociado al crecimiento (proteína recombinante).

Integrando entre los límites 0 y t la ecuación A6 resulta:

$$P = P_0 + \beta \int x_v dt \quad (A7)$$

en donde P_0 es la concentración de proteína recombinante al tiempo cero, considerándose cero para el sistema utilizado. El término $\int x_v dt$ se conoce como índice de viabilidad (células*h/L) y representa el área bajo la curva de la concentración celular viable (células/L) contra tiempo (h). El índice de viabilidad puede ser calculado fácilmente por el método de los trapecios [66]. El cálculo fue realizado de la siguiente manera, utilizando el programa de hoja de cálculo Excel[®]

1.- Calcular el promedio de la concentración celular viable a cada intervalo de tiempo:

tiempo (Hrs)	CV/L	CV/L promedio (cel/L)
0	1637125452	
24	2377170095	2007147774
48	2929057731	2653113913
72	1636060893	2282559312
96	564664699	1100362796
120	198866564	381765631.3

2.- Calcular la diferencia de los valores de tiempo a cada intervalo:

tiempo (Hrs)	CV/L	CV/L promedio (cel/L)	Delta tiempo (h)
0	1637125452		
24	2377170095	2007147774	24
48	2929057731	2653113913	24
72	1636060893	2282559312	24
96	564664699	1100362796	24
120	198866564	381765631.3	24

3.- Calcular el producto de concentración celular promedio y delta tiempo:

tiempo (Hrs)	CV/L	CV/L promedio (cel/L)	Delta tiempo (h)	(CV*h/L)
0	1637125452			
24	2377170095	2007147774	24	4.8172E+10
48	2929057731	2653113913	24	6.3675E+10
72	1636060893	2282559312	24	5.4781E+10
96	564664699	1100362796	24	2.6409E+10
120	198866564	381765631.3	24	9162375152

4.- Calcular el índice de viabilidad, acumulando el producto del paso 3:

tiempo (Hrs)	CV/L	CV/L promedio (cel/L)	Delta tiempo (h)	(cV*h/L)	Indice de viabilidad (cV*h/L)
0	1637125452				
24	2377170095	2007147774	24	4.8172E+10	48171546572
48	2929057731	2653113913	24	6.3675E+10	1.11846E+11
72	1636060893	2282559312	24	5.4781E+10	1.66628E+11
96	564664699	1100362796	24	2.6409E+10	1.93036E+11
120	198866564	381765631.3	24	9162375152	2.02199E+11

A partir de la ecuación A7 se puede determinar la velocidad específica de producción de proteína recombinante:

$$\underbrace{p - p_0}_{y} = \underbrace{\beta}_m \underbrace{\int x_v dt}_x$$

donde:

p = concentración de proteína recombinante en el tiempo t

p_0 = concentración de proteína recombinante en el tiempo cero

β = velocidad específica de producción de proteína recombinante

$\int x_v dt$ = índice de viabilidad

Así, β representa la pendiente de la recta que se obtiene al graficar la concentración de proteína recombinante contra el índice de viabilidad.

A.4 Cálculo de la velocidad específica de consumo de glucosa y velocidad específica de generación de lactato.

Las determinaciones de estos parámetros se hicieron con la ecuación propuesta por Yamaji [67]:

$$\underbrace{s_0 - s}_{y} = \underbrace{\beta}_m \underbrace{\int x_v dt}_x$$

s = concentración de glucosa o lactato en el tiempo t

s_0 = concentración de glucosa o lactato en el tiempo cero

β = velocidad específica de consumo de glucosa o de generación de lactato

$\int x_v dt$ = índice de viabilidad

De igual manera que en el cálculo de la velocidad específica de producción de proteína, el parámetro β representa la pendiente de la recta que se obtiene al graficar la concentración de glucosa (o lactato, según sea el caso) contra el índice de viabilidad.

APÉNDICE B

En este apéndice se muestran los electroferogramas correspondientes a las digestiones con exoglicosidasas de las muestras analizadas. En la figura B.2 se muestran varias escaleras de glucosa, como puede observarse, se tienen variaciones en el tiempo de migración de los picos correspondientes a las unidades de glucosa, entre una escalera y otra. Según lo indica la literatura consultada [48, 49, 59], estas variaciones pueden explicarse en función del voltaje aplicado, la densidad y pH del buffer, así como de la temperatura en el capilar al momento de realizar la corrida. En nuestro caso, si bien siempre se utilizó el mismo buffer de corrida proporcionado por Beckman, el hecho de reutilizar varias veces el mismo vial de buffer y los cambios en la densidad del mismo causado por la evaporación que ocurre al tenerlo almacenado, se vieron reflejados en el desfase del tiempo de migración para una misma muestra que fue analizada en días diferentes. Para evitar que esto nos afectara en la identificación de las estructuras, se corrió siempre una escalera de glucosa al comenzar el análisis de las muestras. De esta manera, un mismo pico que se presenta con tiempos de migración diferentes en dos electroferogramas generados en días diferentes, puede ser identificado ya que el valor de las unidades de glucosa (UG) es siempre el mismo al extrapolar los tiempos de migración con las UG de la escalera de glucosa que le corresponde.

En la figura B.3a se muestra el electroferograma del fluoróforo utilizado (APTS) al cual se le dio el mismo tratamiento que a las muestras de carbohidratos. Esto se hizo con el objetivo de asegurarnos que tanto el exceso de APTS como de las sustancias adicionadas al derivatizar los carbohidratos, no interfirieran con el análisis.

Así mismo, se derivatizó y analizó un estándar proporcionado por Glyko®, el electroferograma de este estándar se muestra en la figura B.2b y corresponde a una

estructura con 6 manosas terminales, en la figura B.2c se muestra la digestión con manosidasa de esta misma estructura.

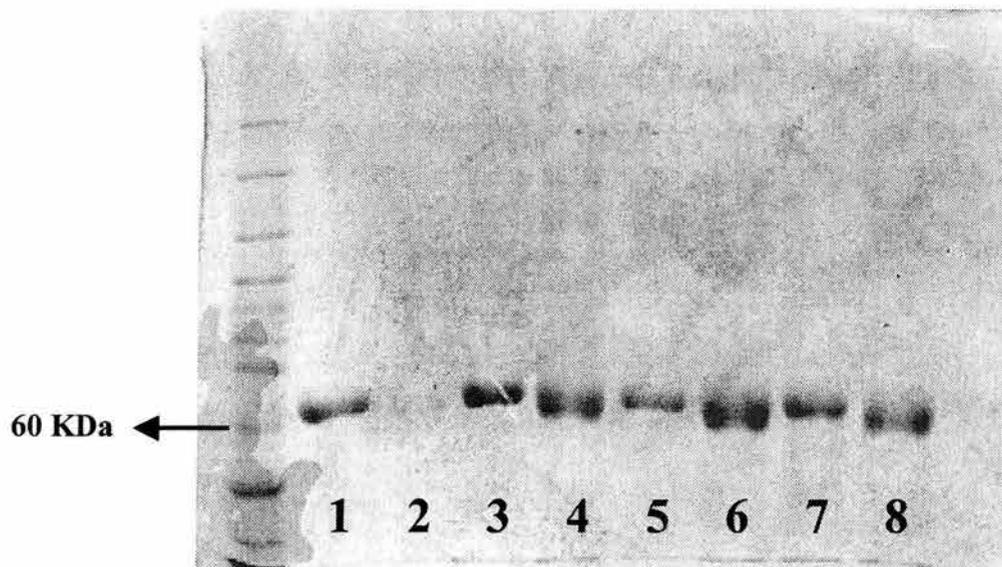


Figura B.1. Gel de acrilamida en el que se observa la migración de varias muestras de SeAP purificada de diferentes cultivos y sometida a digestión con PNG-asa-F para separar los carbohidratos asociados a la proteína. En el marcador de peso molecular se indica la banda que corresponde a 60 KDa, los carriles 1, 3, 5 y 7 corresponden a muestras de SeAP sin PNG-asa-F y los carriles 4, 6 y 8 a muestras de SeAP digeridas. Nótese el cambio en la migración en estas tres últimas muestras debido a la pérdida de los N-glicanos. En el carril 2 no se cargó ninguna muestra.

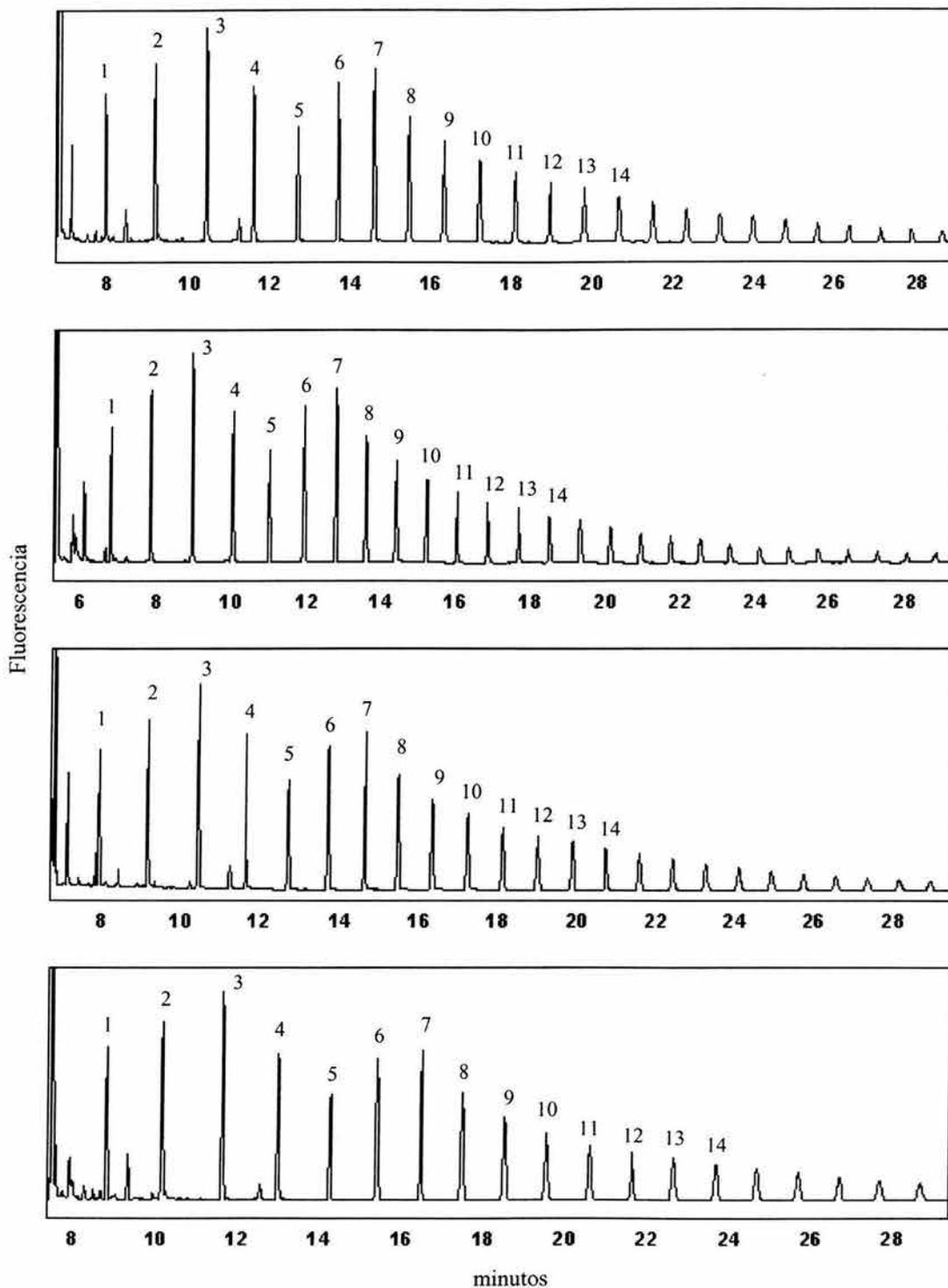


Figura B.2 Electroferogramas de escaleras de glucosa corridas en diferentes ocasiones, en todos los casos se trata del mismo estándar de glucosa proporcionado por Beckman. Se indican con un número las unidades de glucosa que corresponden para cada pico.

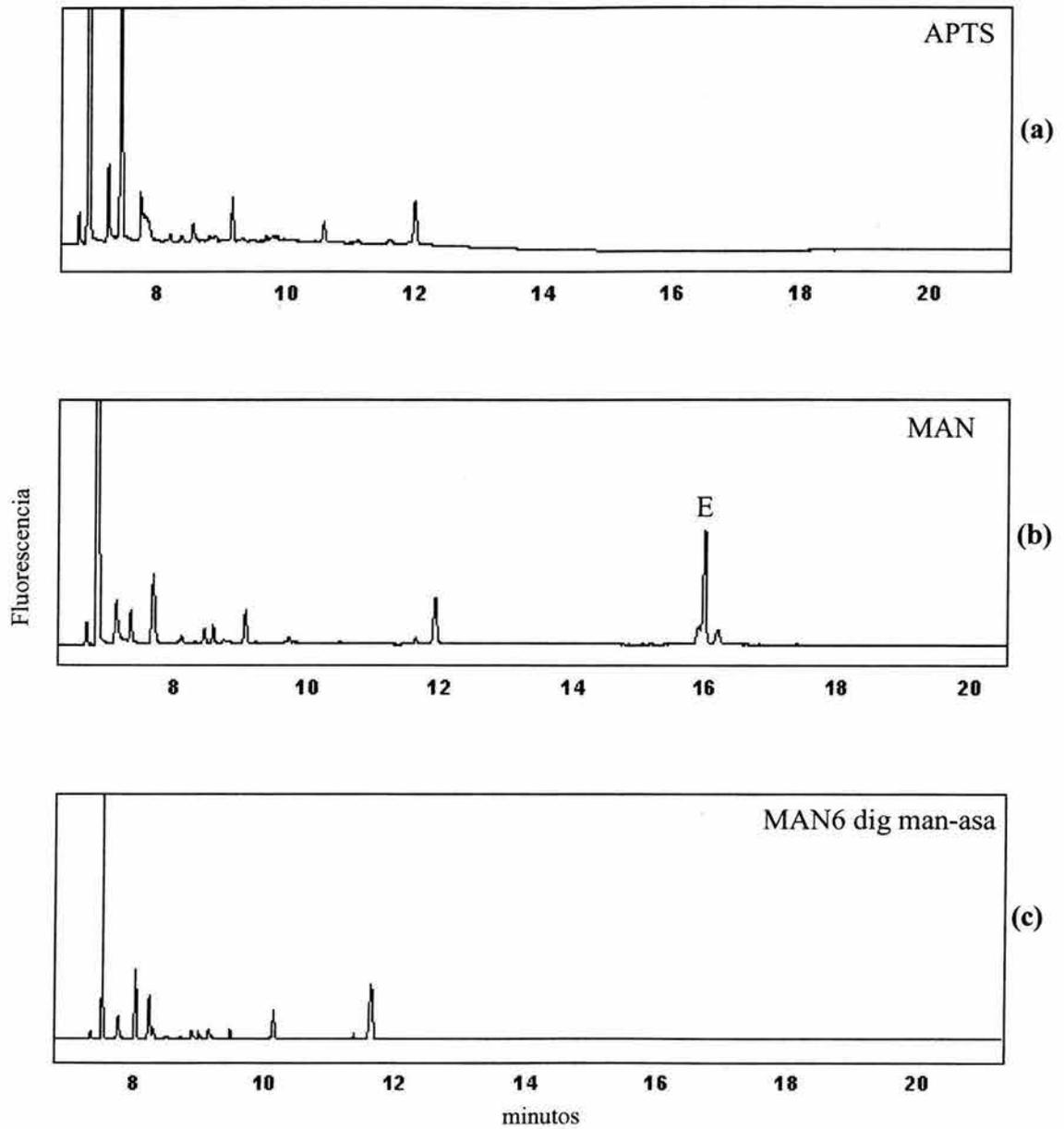


Figura B.3 Electroferograma del APTS (a) , y del estándar de manosa 6 (b) , así como de la digestión del estándar con manosidasa (c).

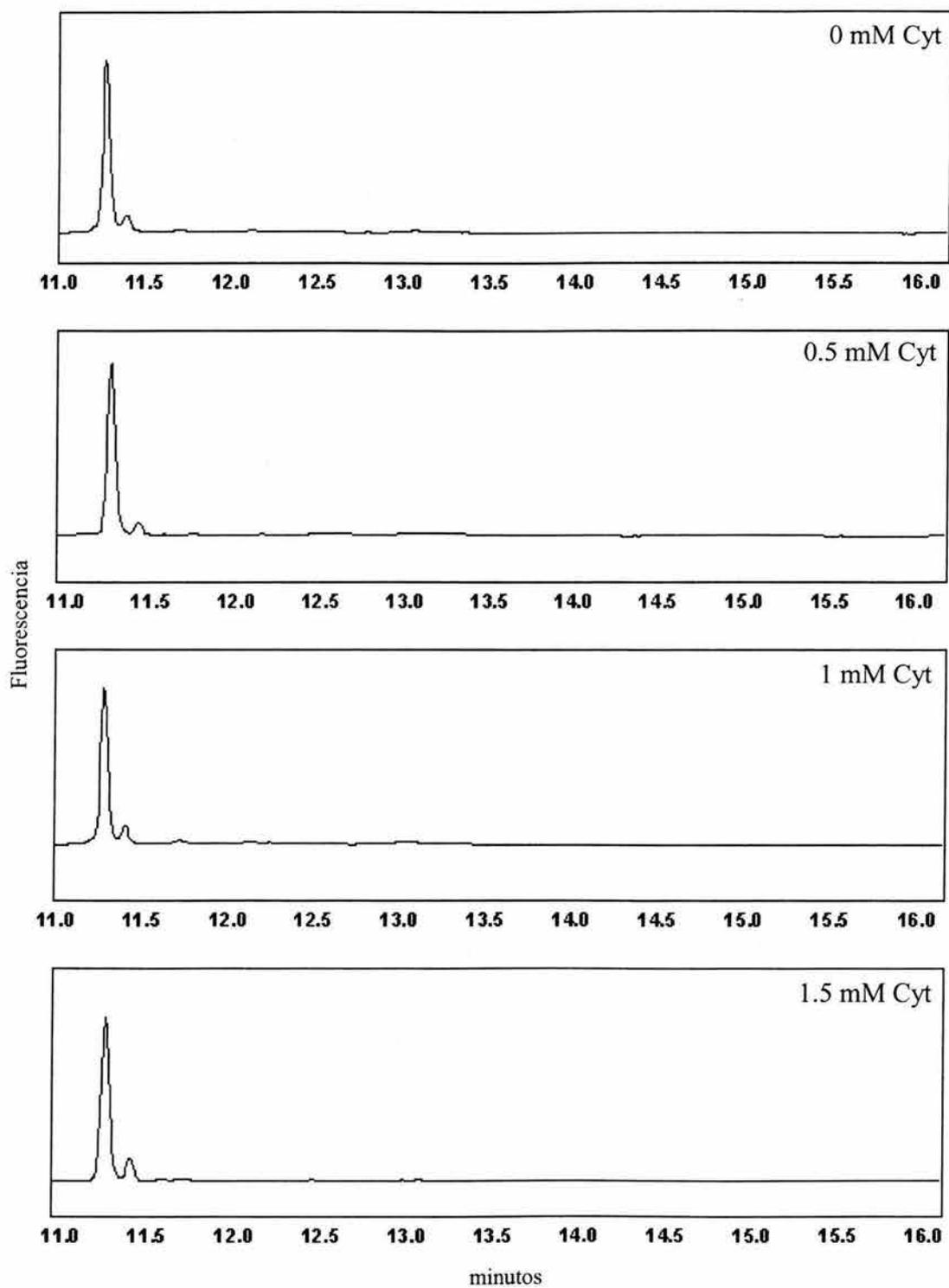


Figura B.4 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con citidina a 48 HPI después de ser sometidas a digestión con manosidasa.

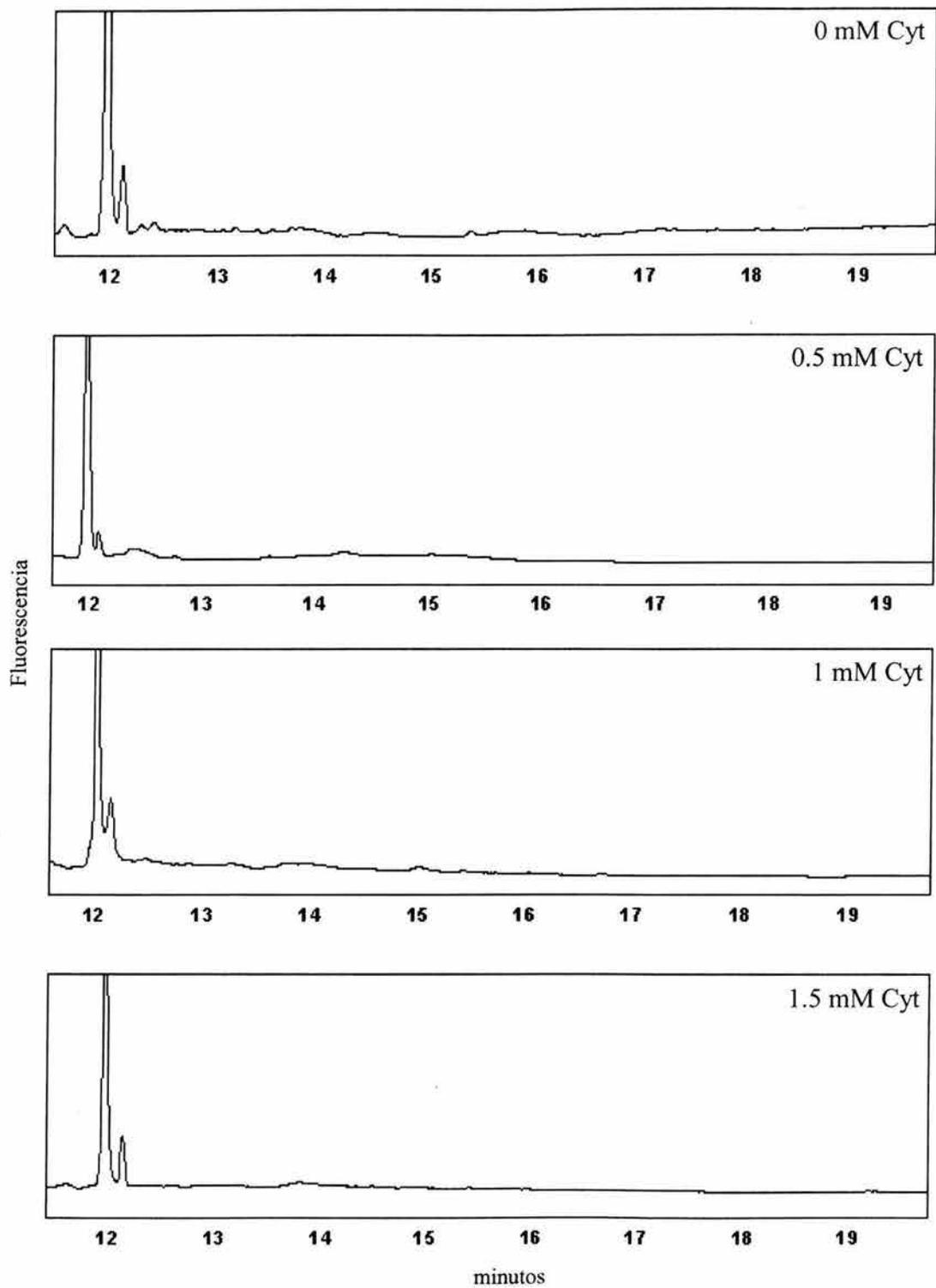


Figura B.5 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con citidina a 120 HPI después de ser sometidas a digestión con manosidasa.

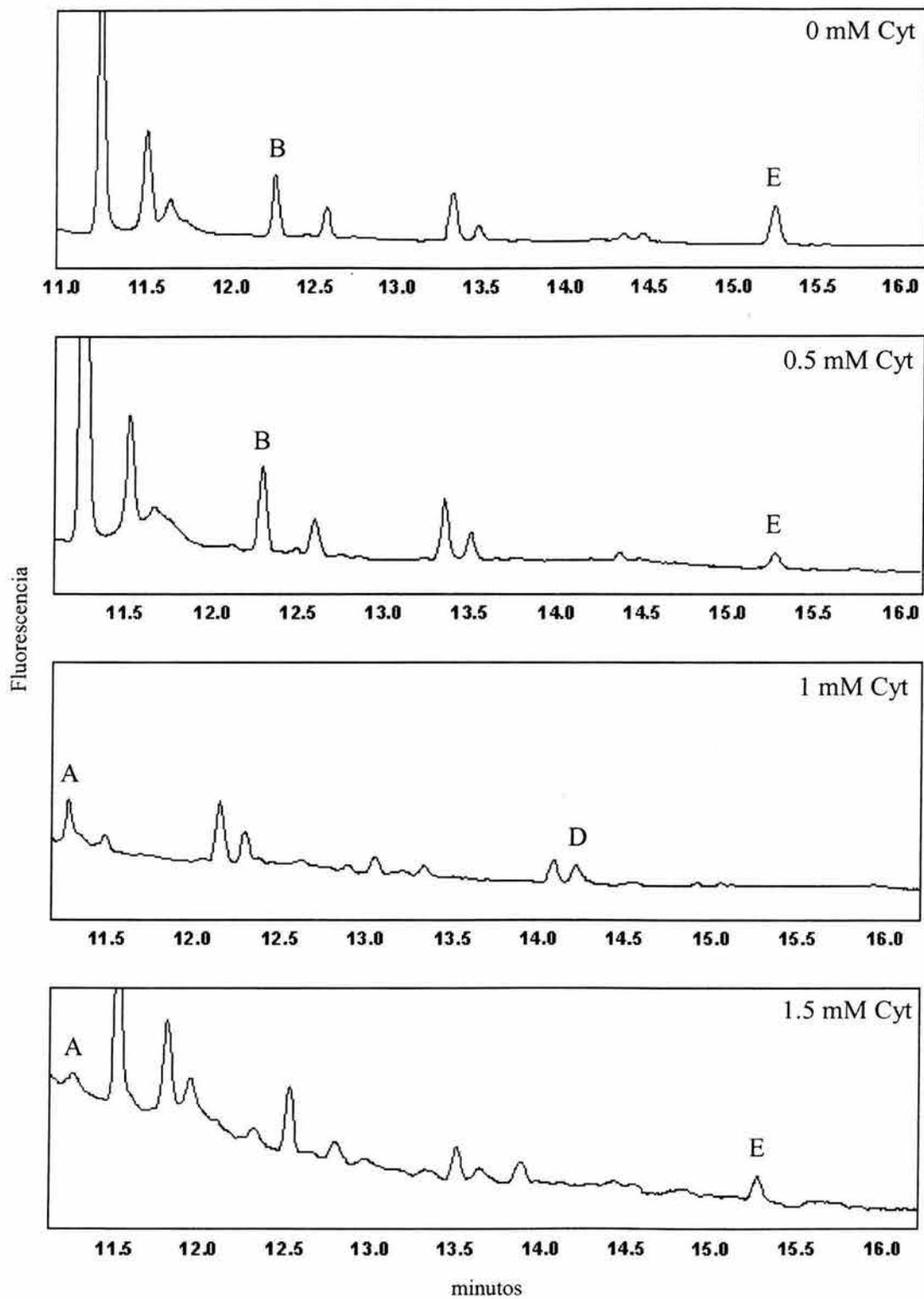


Figura B.6 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con citidina a 48 HPI después de ser sometidas a digestión con β -N-acetilglucosaminidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

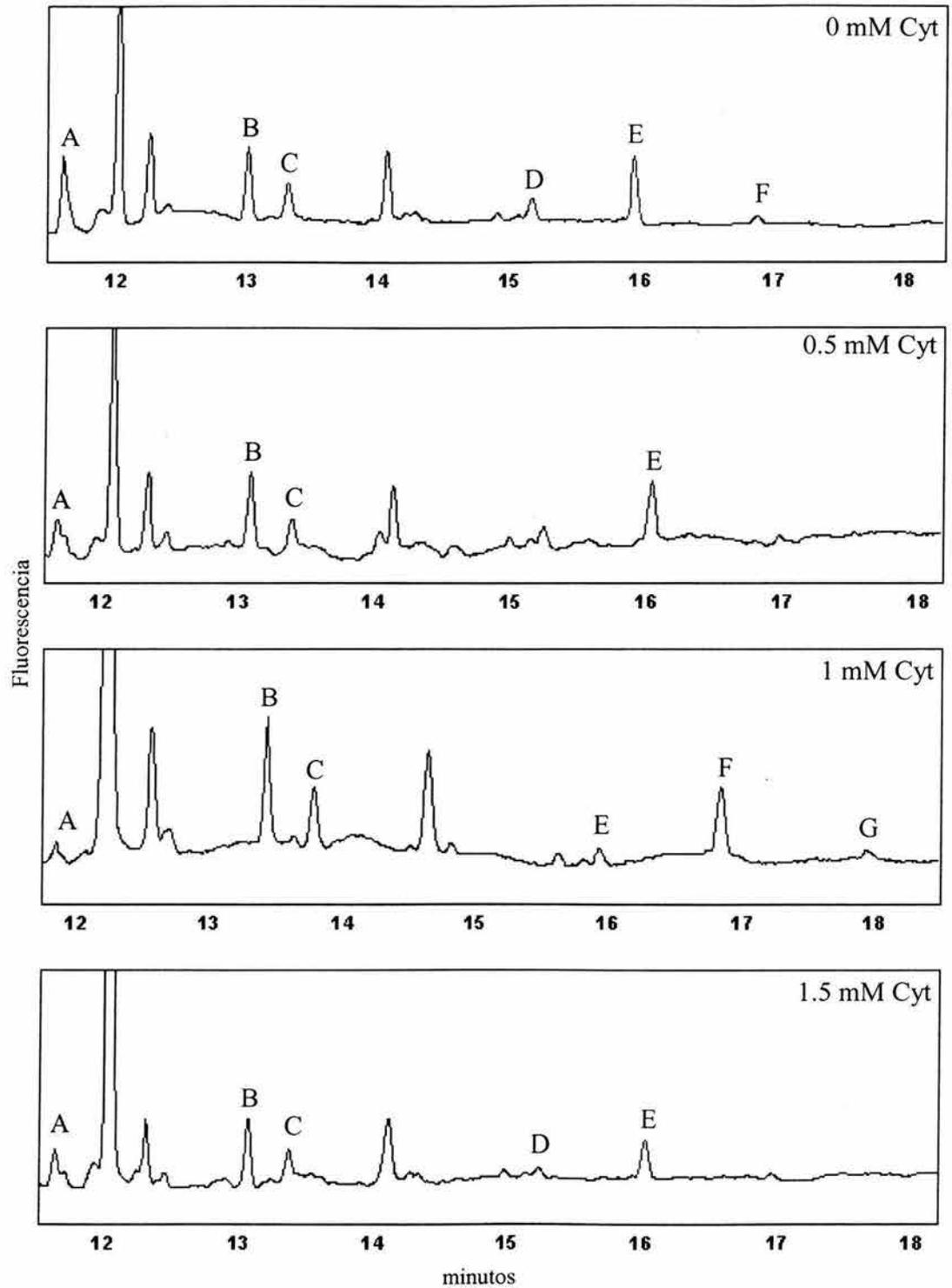


Figura B.7 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con citidina a 120 HPI después de ser sometidas a digestión con β -N-acetilglucosaminidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

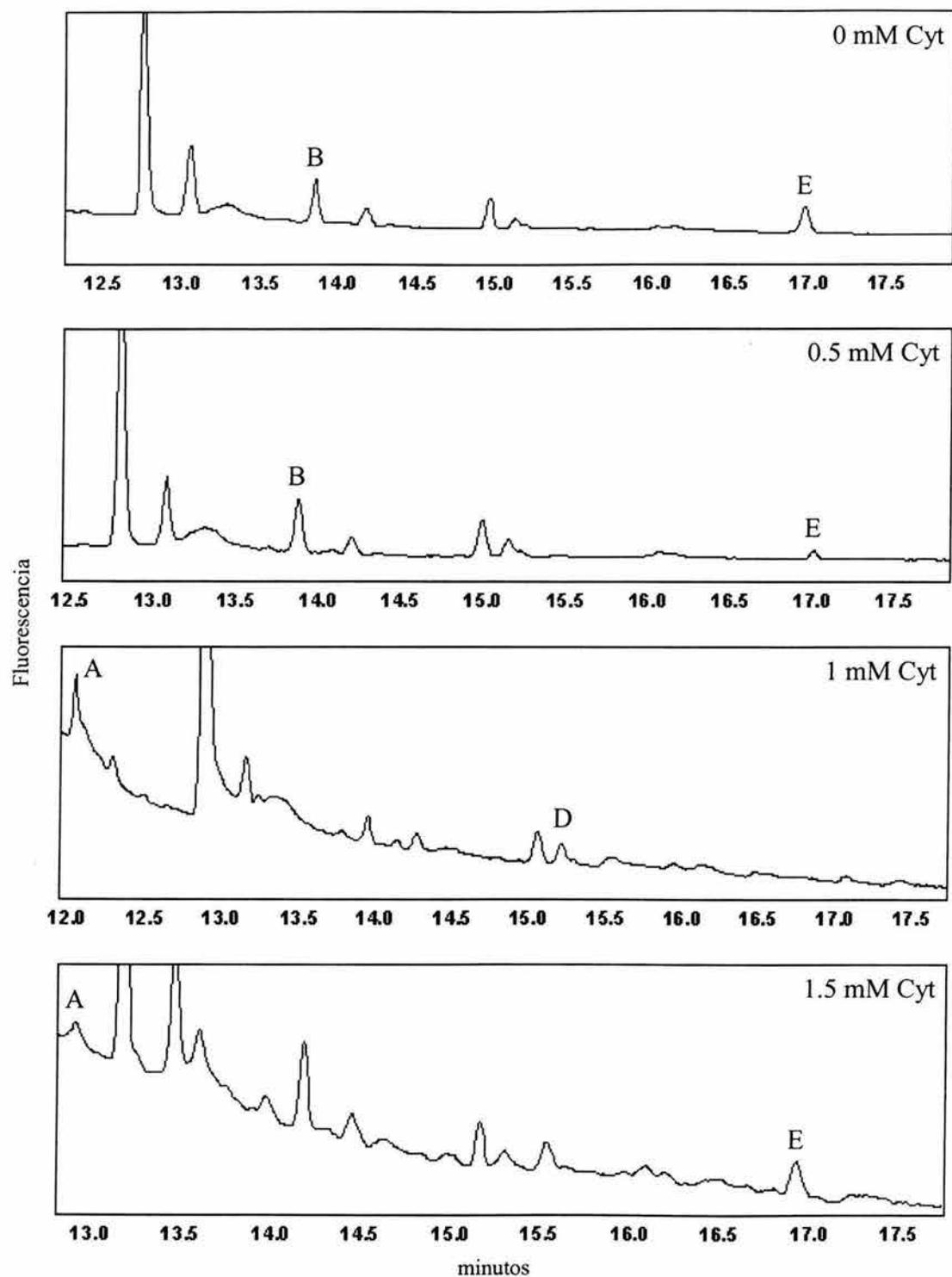


Figura B.8 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con citidina a 48 HPI después de ser sometidas a digestión con β -galactosidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

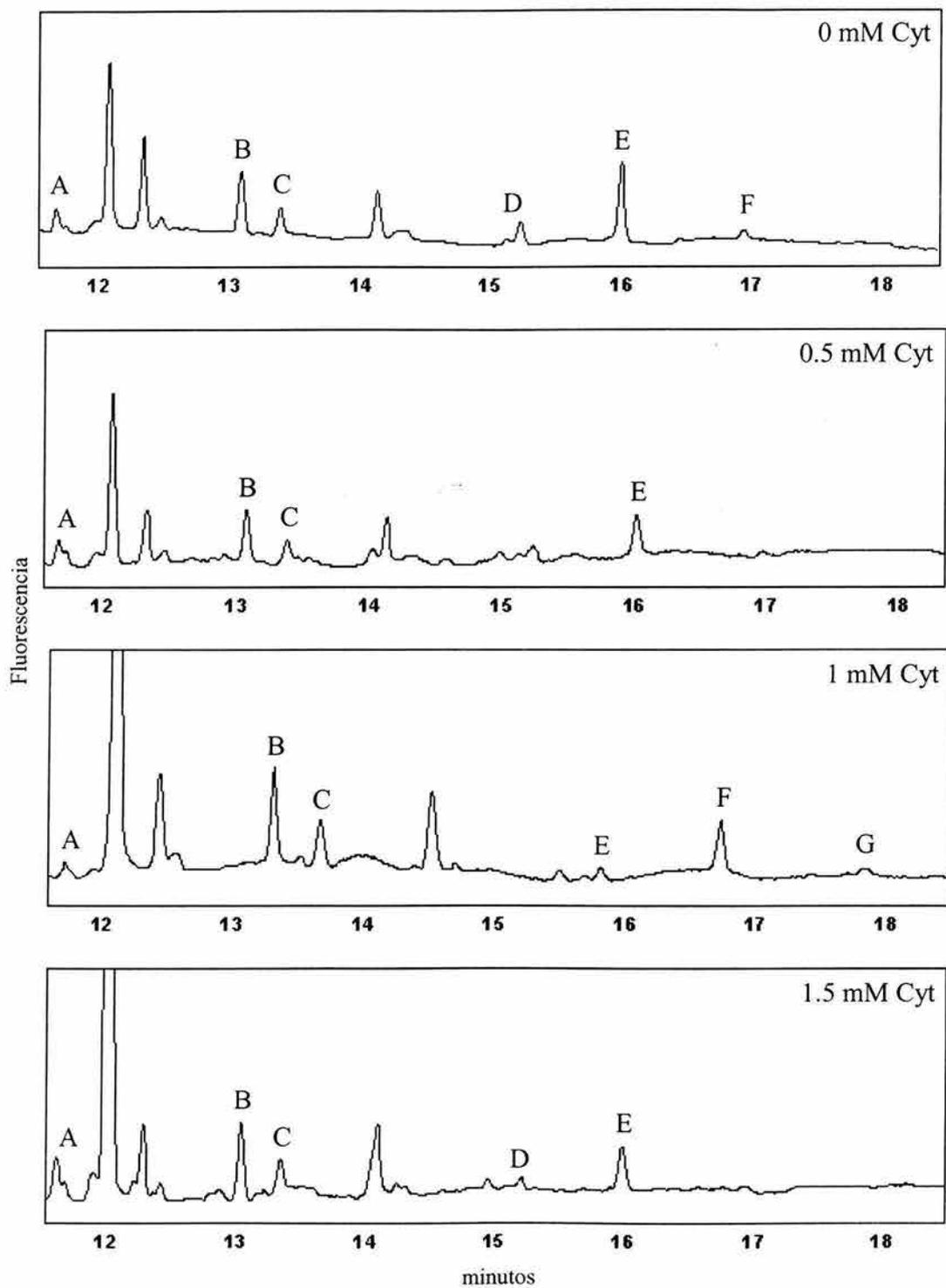


Figura B.9 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con citidina a 120 HPI después de ser sometidas a digestión con β -galactosidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

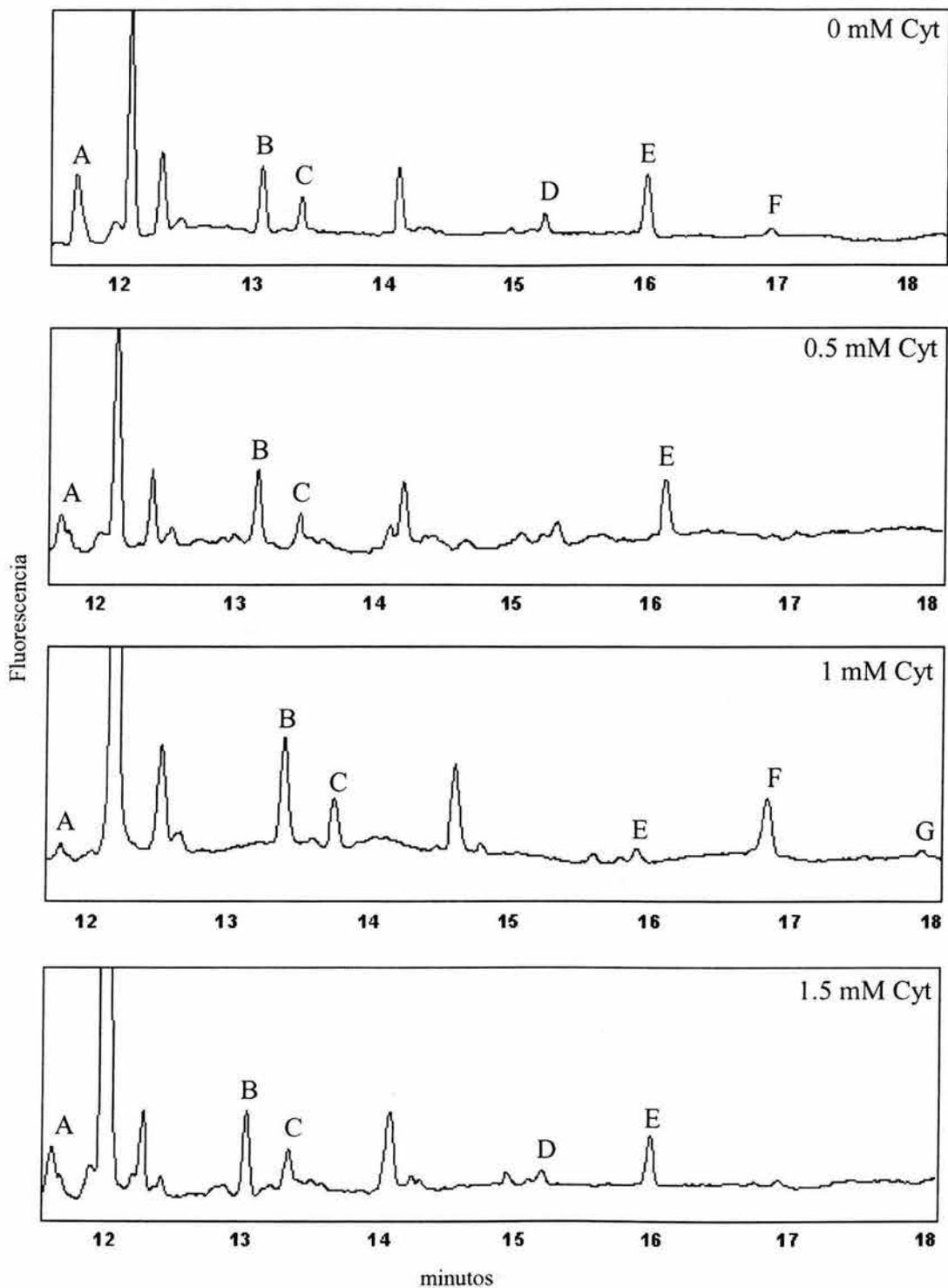


Figura B.10 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con citidina a 120 HPI después de ser sometidas a digestión con sialidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

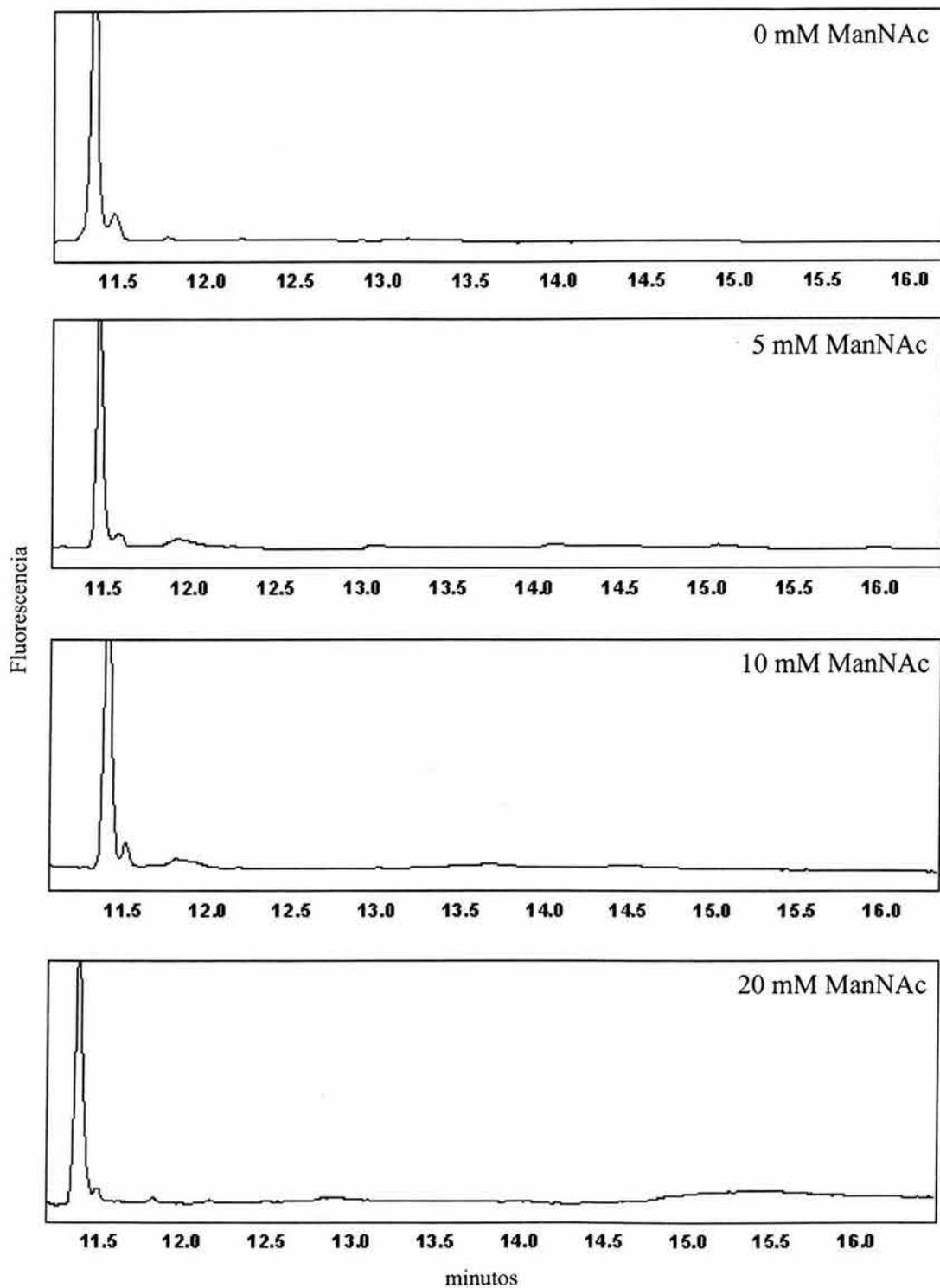


Figura B.11 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con N-acetilmanosamina a 48 HPI después de ser sometidas a digestión con manosidasa.

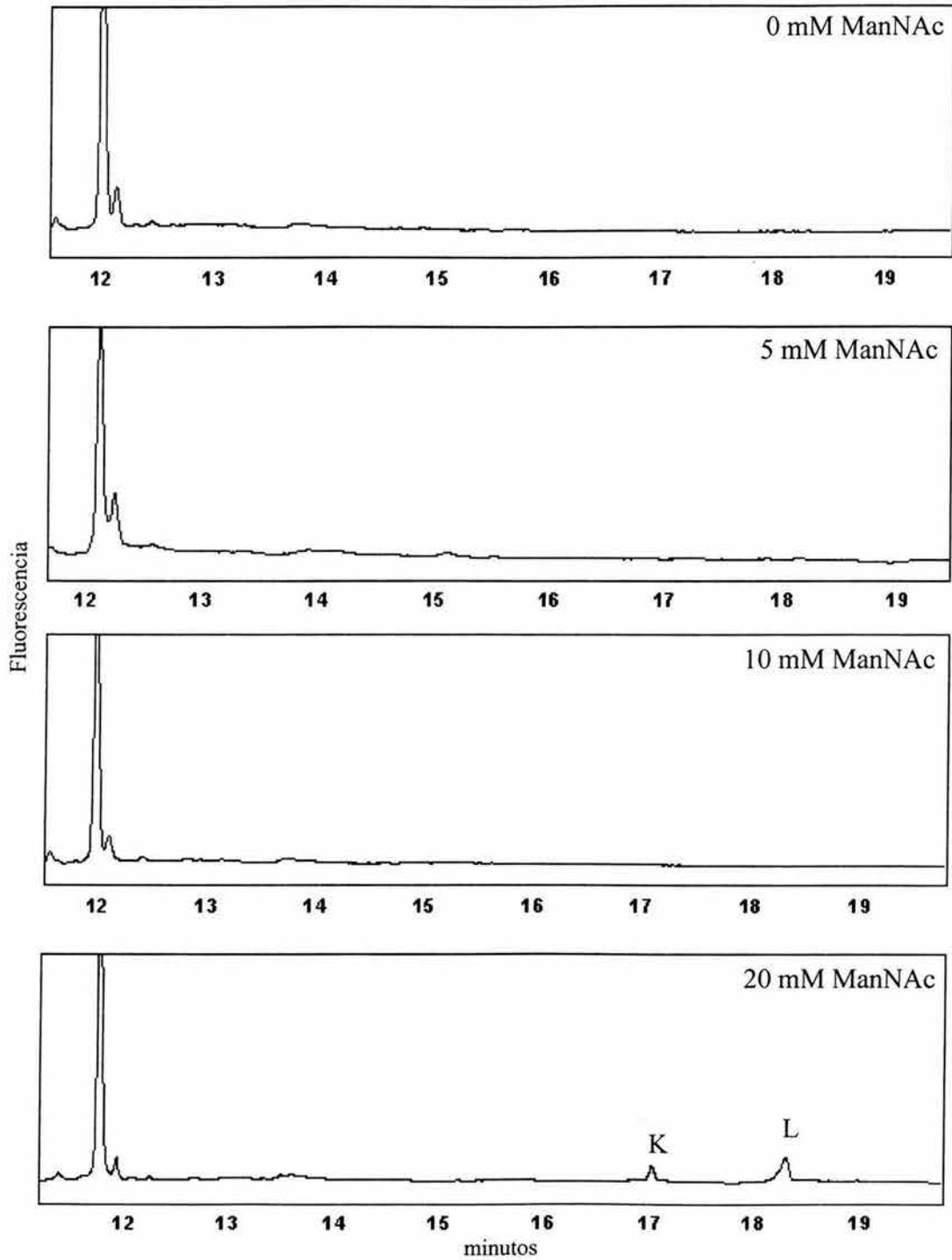


Figura B.12 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con N-acetilmanosamina a 120 HPI después de ser sometidas a digestión con manosidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

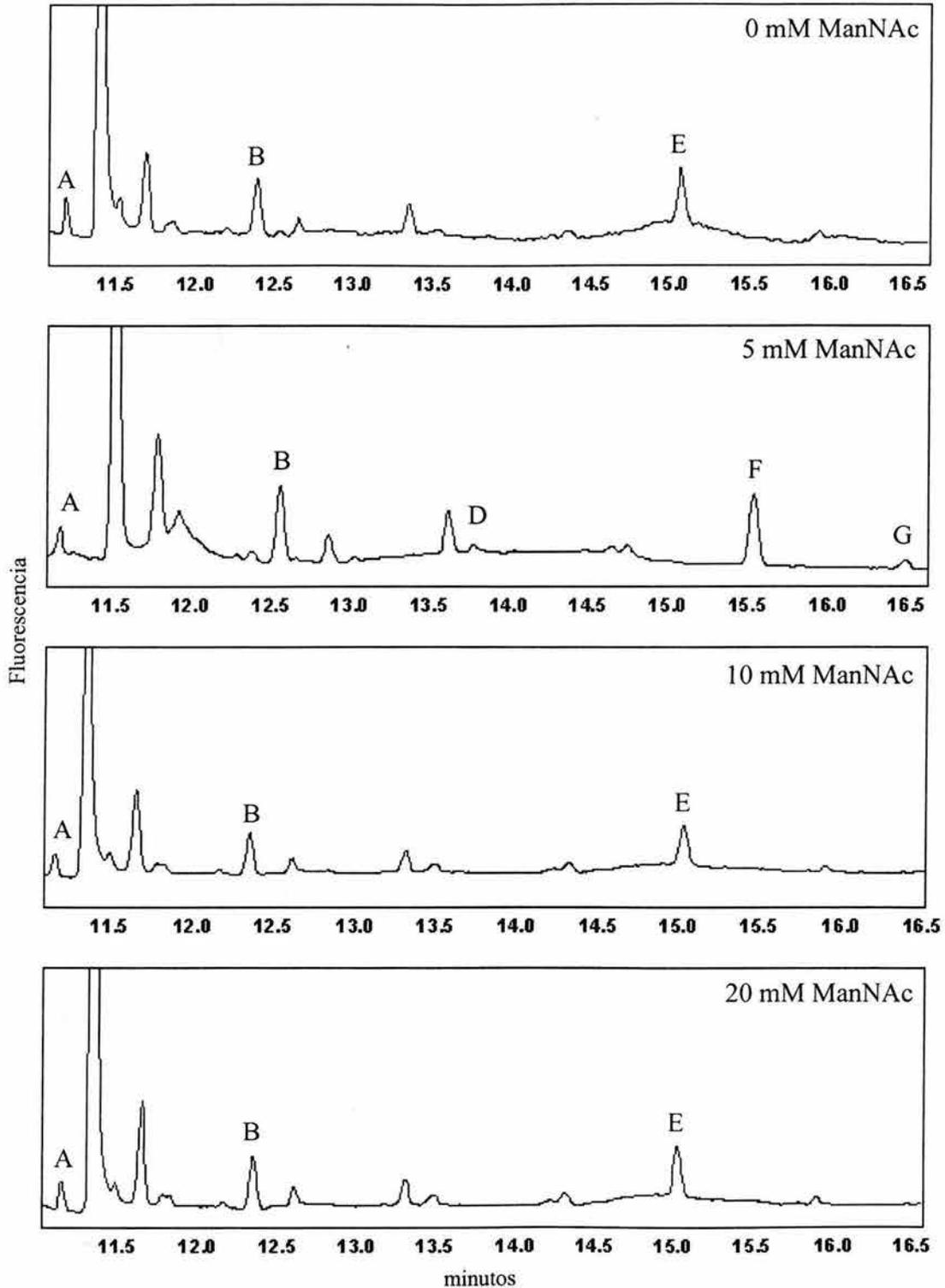


Figura B.13 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con N-acetilmanosamina a 48 HPI después de ser sometidas a digestión con β -N-acetilglucosaminidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

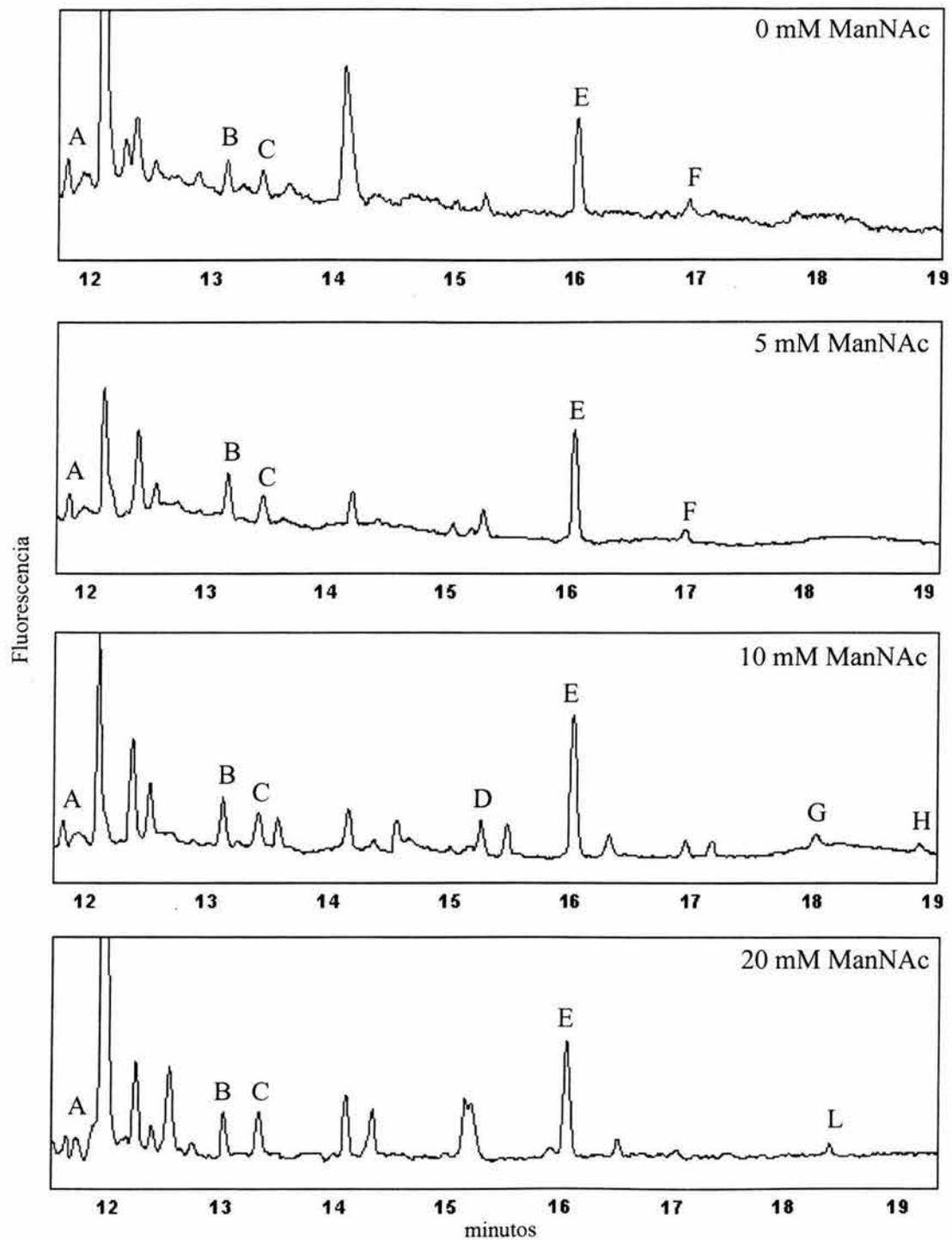


Figura B.14 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con N-acetilmanosamina a 120 HPI después de ser sometidas a digestión con β -N-acetilglucosaminidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

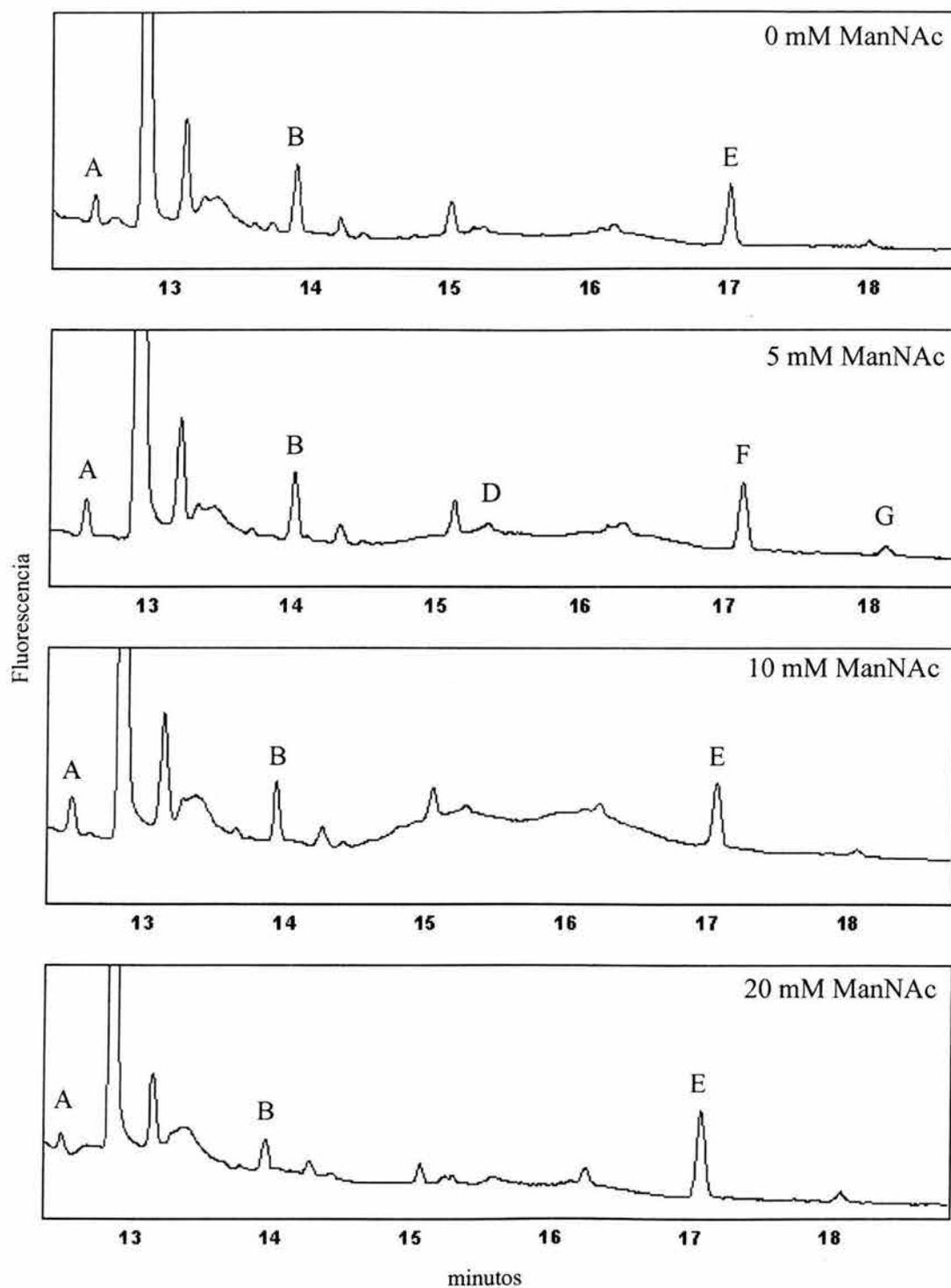


Figura B.15 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con N-acetilmanosamina a 48 HPI después de ser sometidas a digestión con β -galactosidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

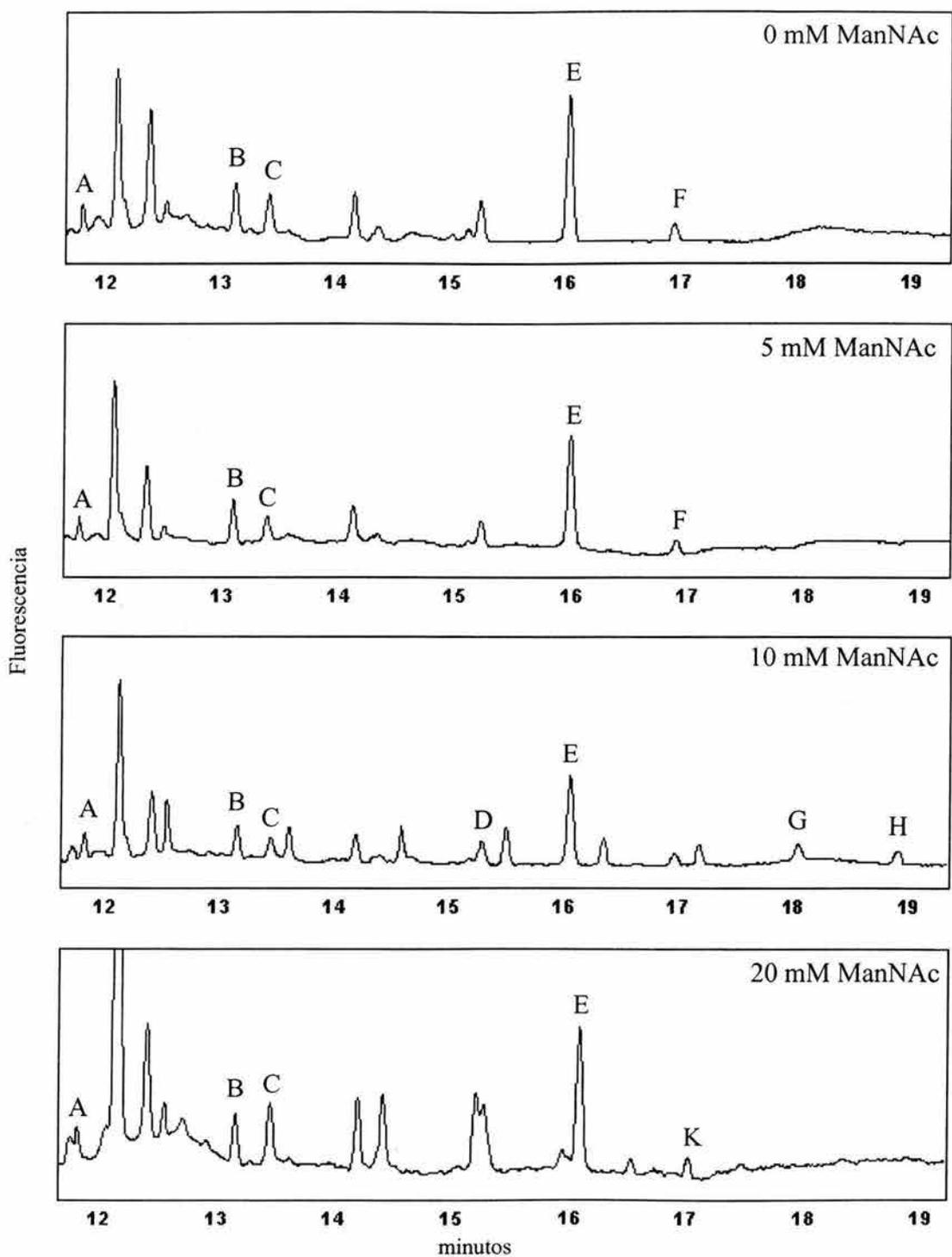


Figura B.16 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con N-acetilmanosamina a 120 HPI después de ser sometidas a digestión con β -galactosidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

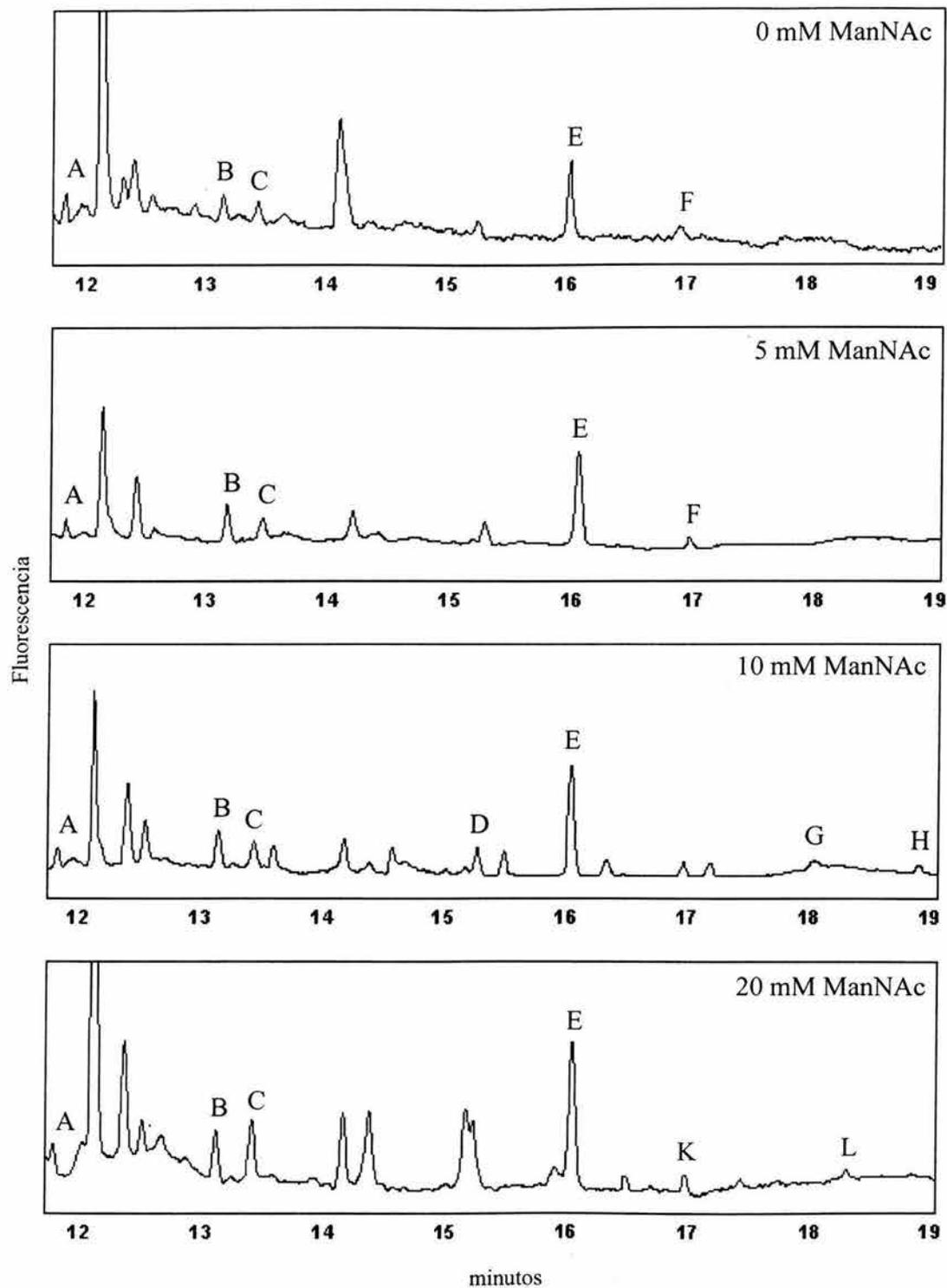


Figura B.17 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con N-acetilmanosamina a 120 HPI después de ser sometidas a digestión con sialidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

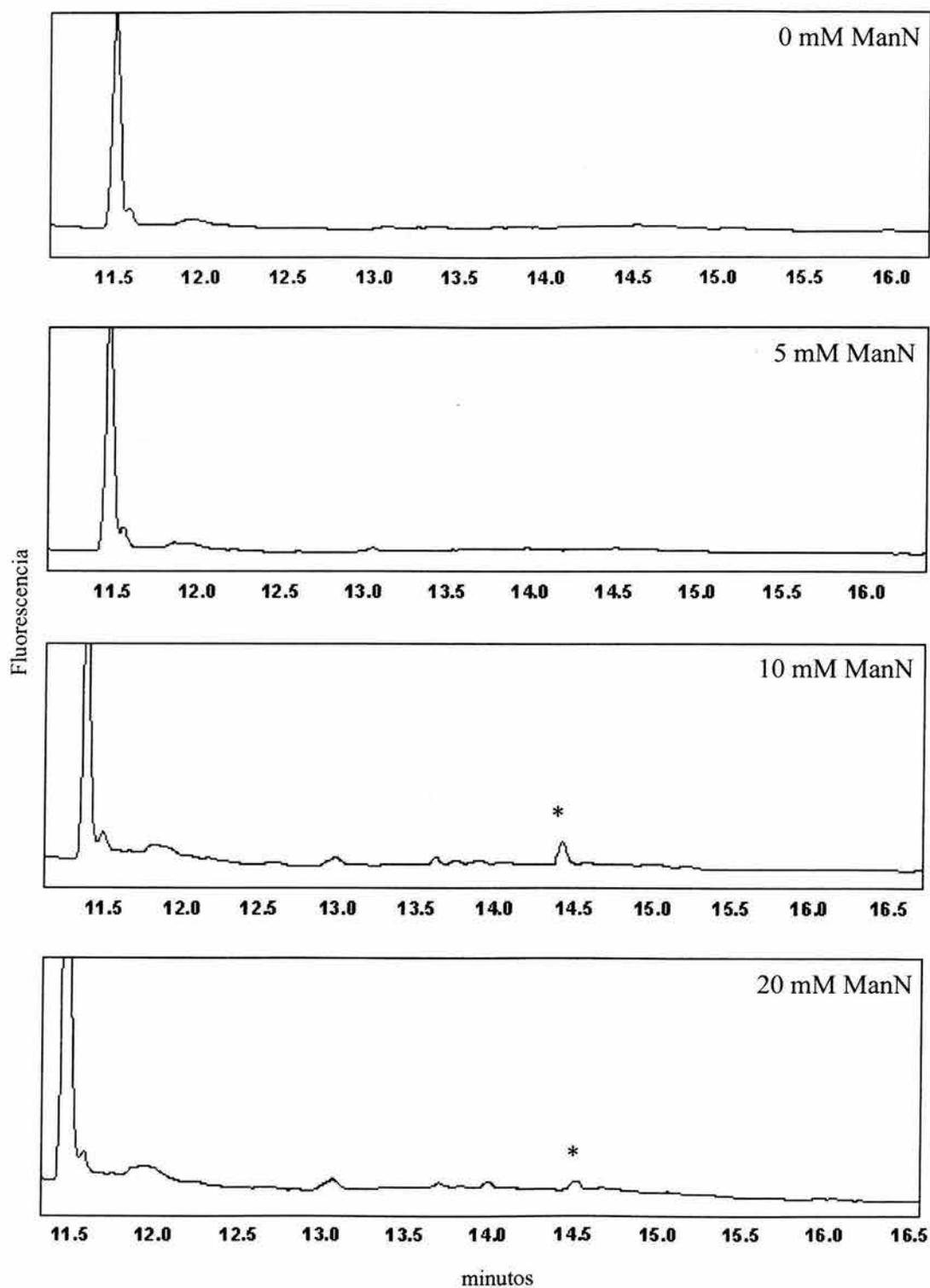


Figura B.18 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con manosamina a 48 HPI después de ser sometidas a digestión con manosidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

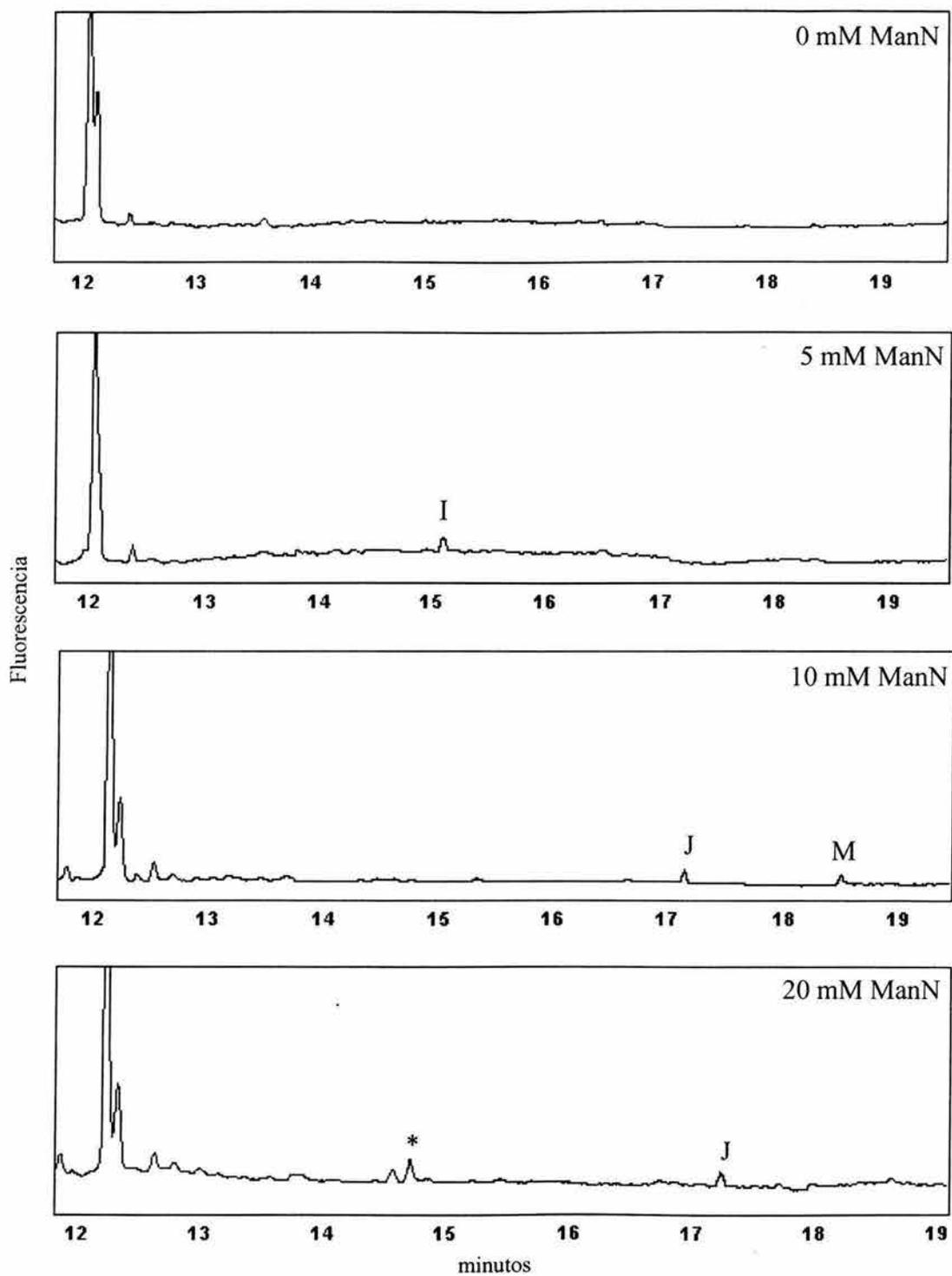


Figura B.19 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con manosamina a 120 HPI después de ser sometidas a digestión con manosidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

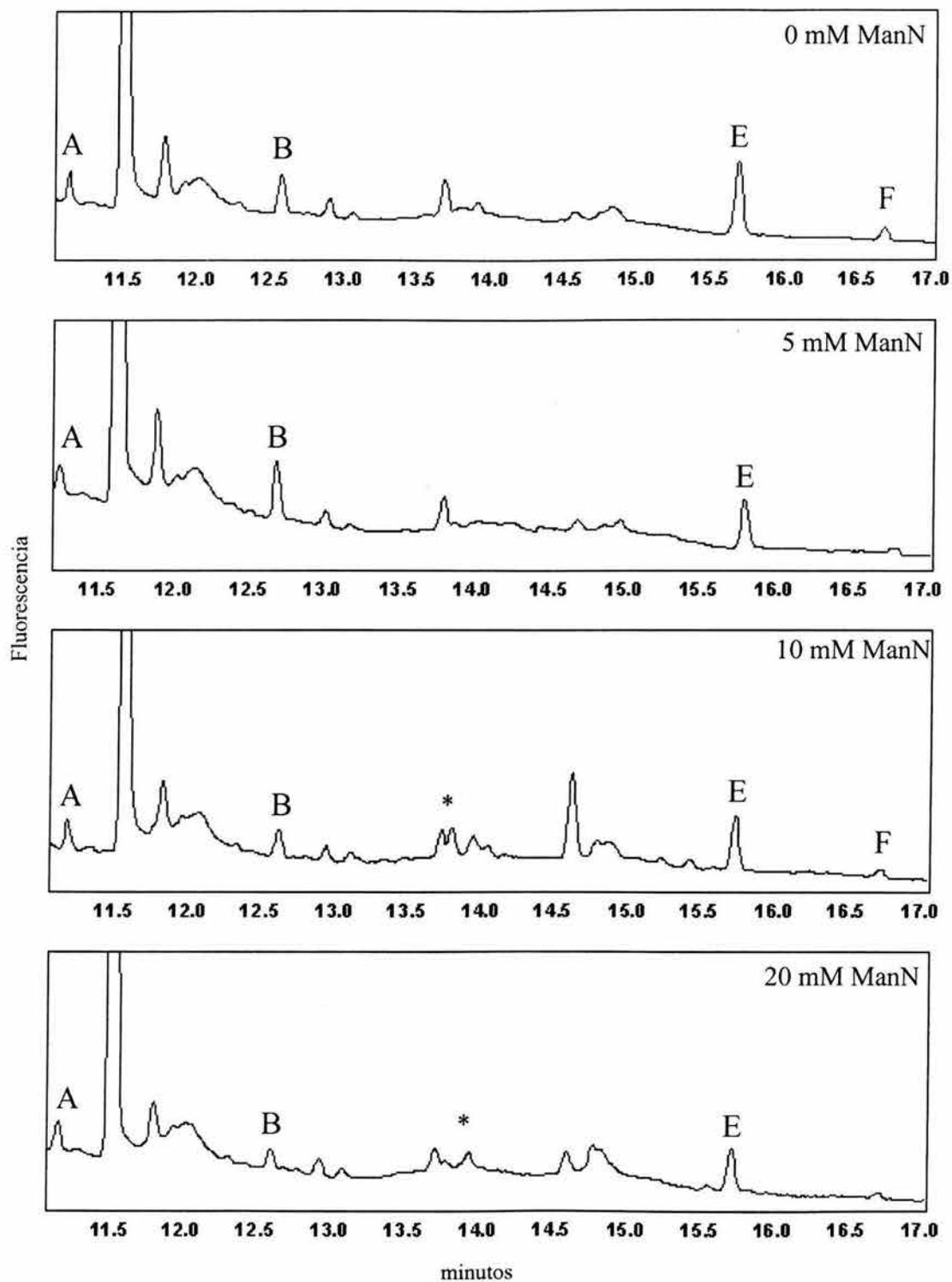


Figura B.20 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con manosamina a 48 HPI después de ser sometidas a digestión con β -N-acetilglucosaminidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

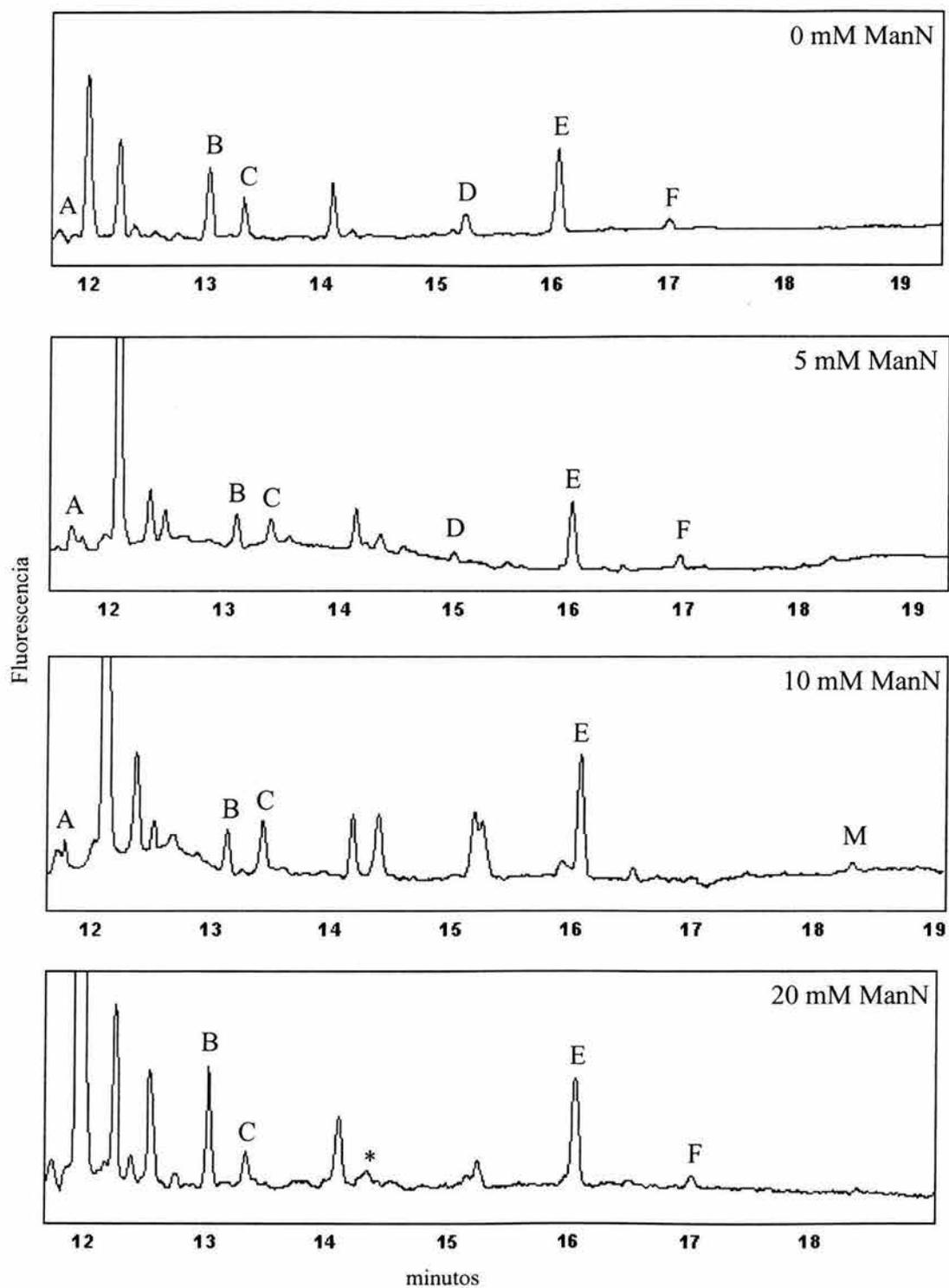


Figura B.21 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con manosamina a 120 HPI después de ser sometidas a digestión con β -N-acetilglucosaminidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

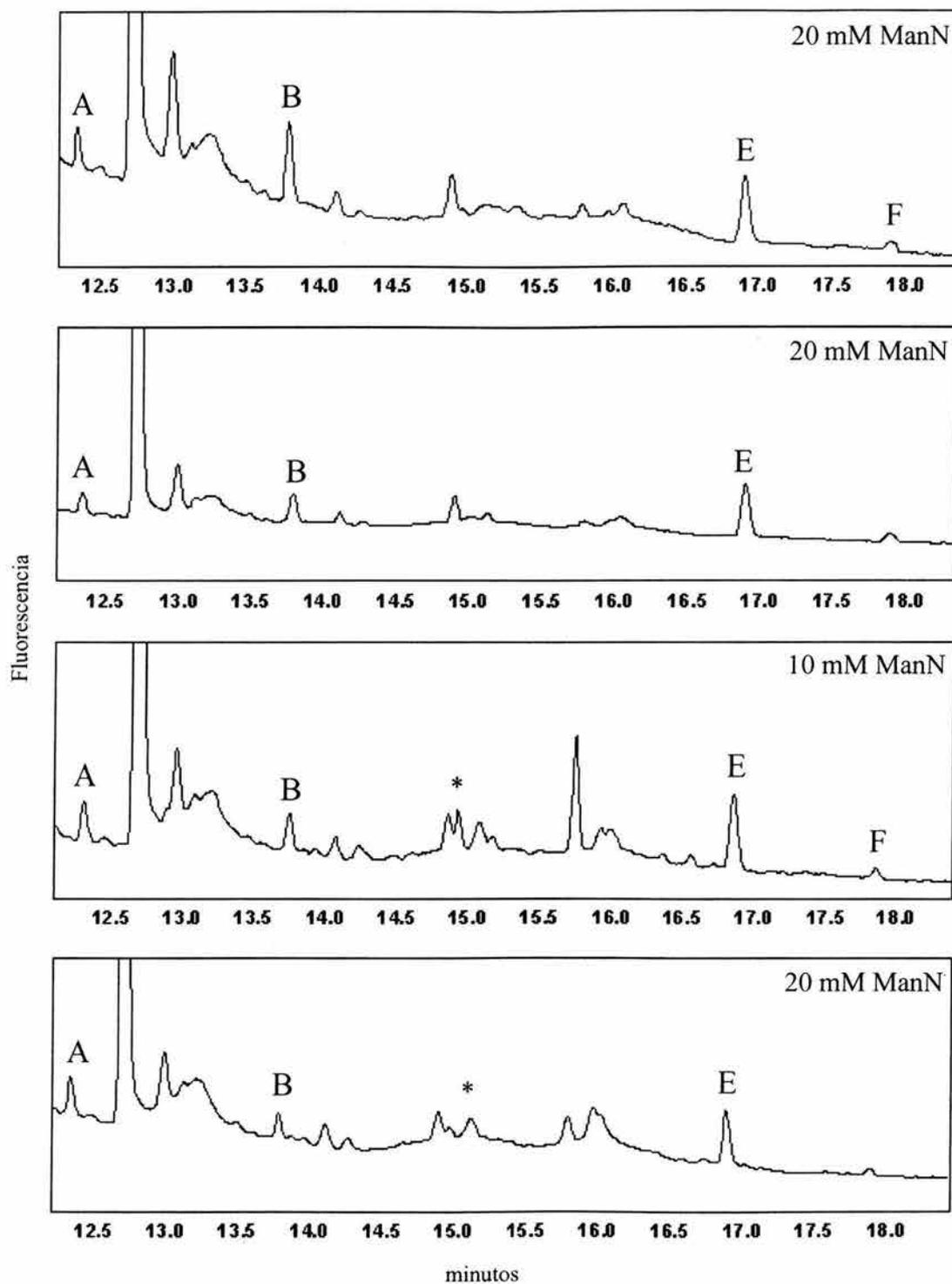


Figura B.22 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con manosamina a 48 HPI después de ser sometidas a digestión con β -galactosidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

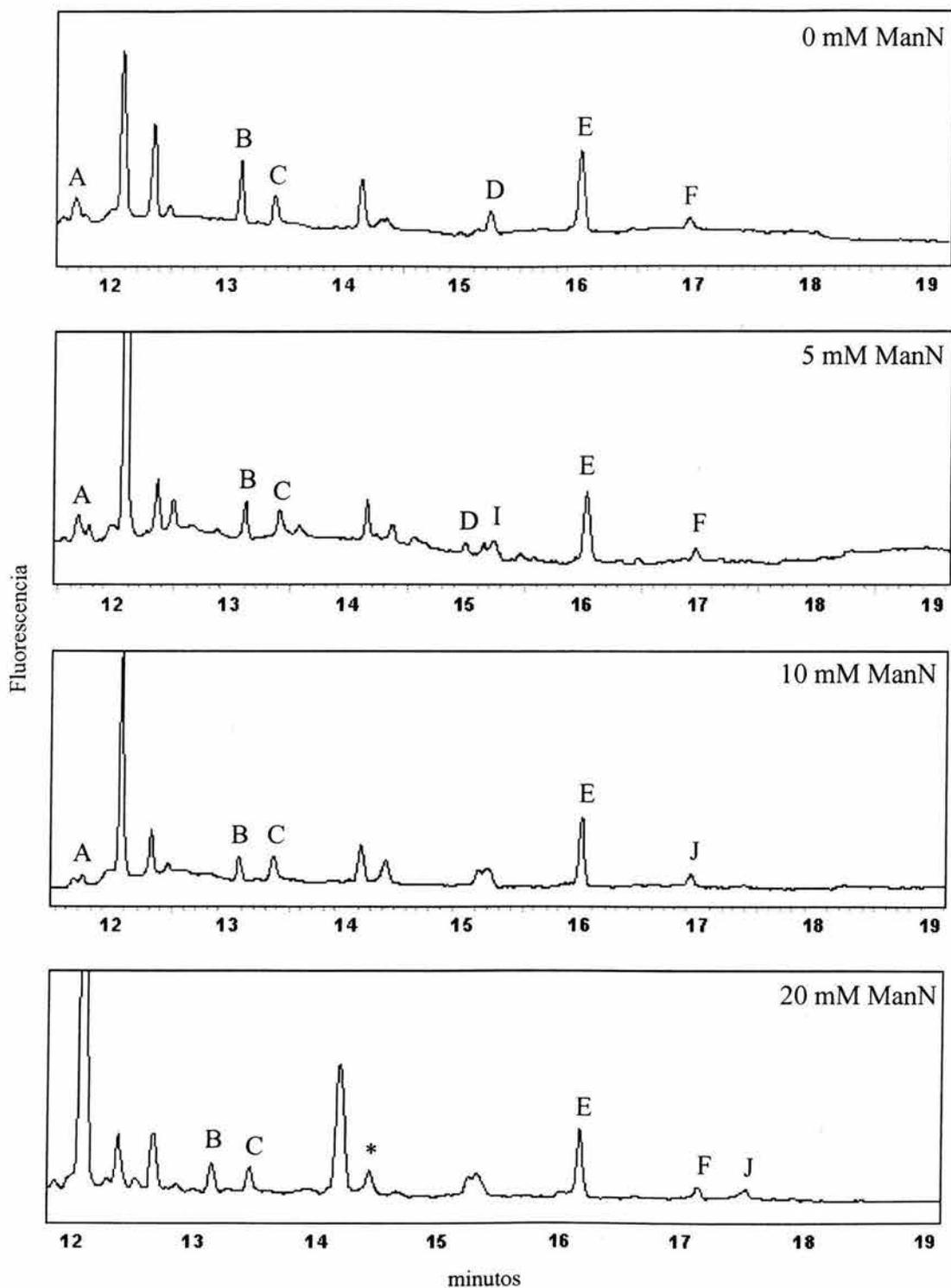


Figura B.23 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con manosamina a 120 HPI después de ser sometidas a digestión con β -galactosidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

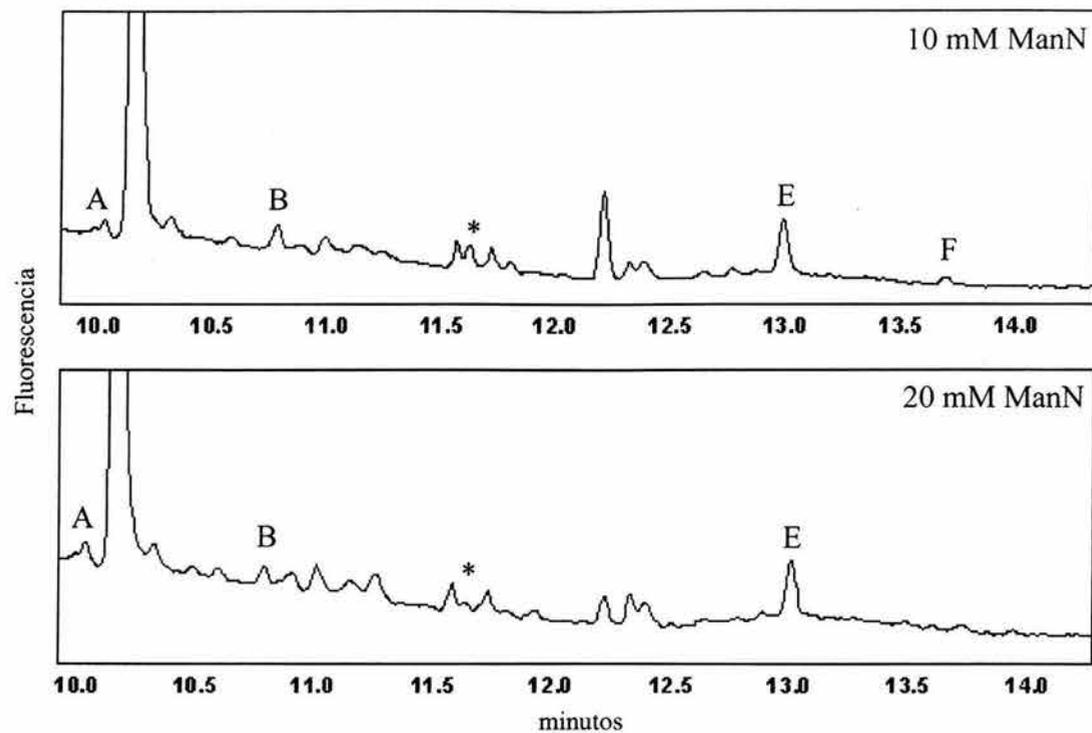


Figura B.24 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con manosamina a 48 HPI después de ser sometidas a digestión con sialidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).

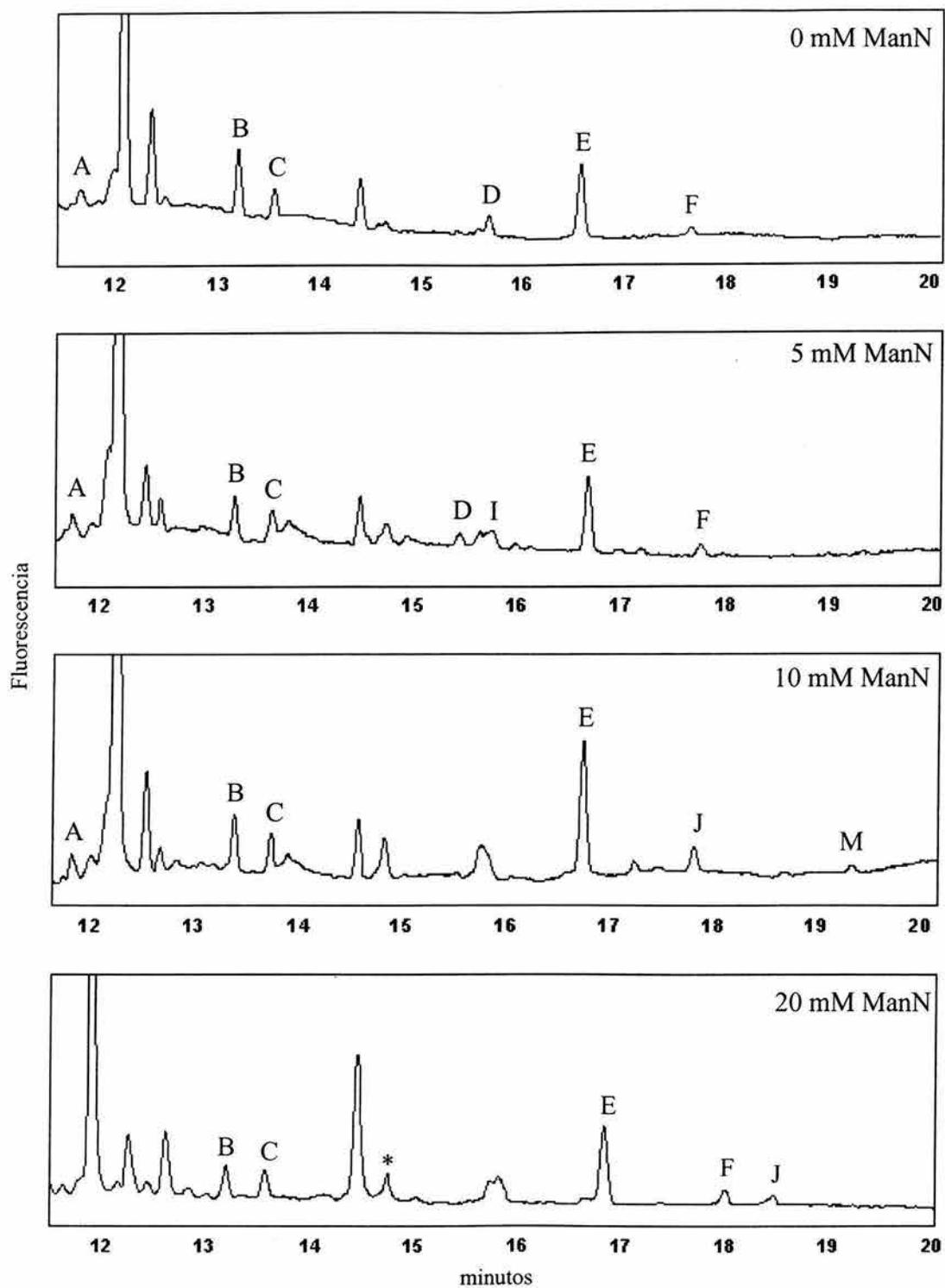


Figura B.25 Electroferogramas de las muestras analizadas de los cultivos adicionados con manosamina a 120 HPI después de ser sometidas a digestión con sialidasa. Las letras sobre los picos indican las estructuras identificadas que no fueron digeridas (fig. 5.6).