



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS

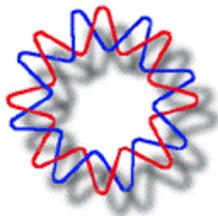
**ESTUDIO TRANSCRIPCIONAL DE LAS VÍAS DE  
N-GLICOSILACIÓN EN CÉLULAS DE OVARIO DE  
HÁMSTER CHINO (CHO) CULTIVADAS EN  
CONDICIONES DE HIPOTERMIA MODERADA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

**IBT. Martha Rosa Hidalgo Morales**



DIRECTOR DE TESIS: Dr. Octavio T. Ramírez Reivich

Cuernavaca, Morelos

Mayo, 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

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 dirección del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich.

Se agradece la asesoría de la Dra. Noemí Flores durante el montaje y realización del qPCR, a la M. en C. Vanessa Hernández y al Dr. José Antonio Serrato por su asesoría en cuanto al análisis de glicosilación y cultivo celular, así como a la Dra. Adriana Valdez por el apoyo durante la realización del proyecto.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca 202706, del proyecto DGAPA/UNAM IN-217007 y del proyecto CONACYT ciencia básica 104951.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

Abreviaturas.....	vi
<b>RESUMEN</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Las células de mamífero como sistema de expresión de proteínas recombinantes.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Estrategias para incrementar la productividad.....</b>	<b>4</b>
2.2.1. Efecto de la disminución de la temperatura sobre la productividad de proteínas recombinantes.....	5
2.2.2. ¿Por qué aumenta la productividad al disminuir la temperatura?.....	8
2.2.3. Respuesta al estrés por frío en células de mamífero.....	9
<b>2.3. Glicosilación.....</b>	<b>12</b>
2.3.1. N-glicosilación.....	13
2.3.2. Efecto de la hipotermia moderada sobre la glicosilación de proteínas recombinantes.....	18
<b>2.4. Modelo de estudio: anticuerpo monoclonal contra interleucina 8 (AcMoiL8)</b>	<b>21</b>
2.4.1. Estructura y glicosilación de inmunoglobulinas humanas.....	23
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>26</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Objetivo general.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>26</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
<b>5.1. Estrategia experimental.....</b>	<b>27</b>
<b>5.2. Cultivo celular</b>	
5.2.1. Cultivos adherentes y adaptación a medio sin suero.....	28
5.2.2. Cultivos escalonados a temperaturas subfisiológicas.....	29
<b>5.3. Determinación de metabolitos, concentración y viabilidad celular.....</b>	<b>30</b>
5.3.1. Cuantificación de la proteína recombinante.....	30
<b>5.4. Análisis transcripcional.....</b>	<b>31</b>
5.4.1. Selección de los genes de interés, diseño de oligonucleótidos.....	31
5.4.2. Extracción, limpieza, cuantificación e integridad de ARN total, síntesis de ADNc.....	33
5.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	35
5.4.3.1. Estandarización y condiciones de reacción.....	35
5.4.3.2. Eficiencia de amplificación, rango dinámico y validación del método de cuantificación relativa.....	37

5.4.3.3. Cuantificación relativa, método del doble delta $C_q$ .....	37
<b>5.5. Actividad de exoglicosidasas extracelulares.....</b>	<b>38</b>
<b>5.6. Purificación e identificación del AcMo-IL8.....</b>	<b>39</b>
<b>5.7. Análisis de glicosilación.....</b>	<b>40</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>6.1. Adaptación de los cultivos a crecer en suspensión y medio sin suero.....</b>	<b>41</b>
<b>6.2. Efecto de la disminución de la temperatura sobre el metabolismo y productividad de cultivos escalonados.....</b>	<b>44</b>
6.2.1. Tiempo óptimo de cambio de temperatura.....	45
6.2.2. Cultivos escalonados en suspensión a 30 y 32°C: reducción del metabolismo.....	51
6.2.2.1. Incremento de la productividad específica y volumétrica al disminuir la temperatura.....	58
6.2.2.2. El diámetro celular incrementa únicamente a 30°C.....	61
6.2.2.3. Reducción del metabolismo e incremento de la productividad: ¿cómo se genera energía a baja temperatura?.....	64
<b>6.3. Análisis transcripcional: efecto de la disminución de la temperatura sobre la expresión de genes relacionados con las vías de N-glicosilación</b>	<b>67</b>
6.3.1. Selección de los genes de interés, diseño de oligonucleótidos.....	67
6.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	68
6.3.2.1. Cuantificación y calidad del ARN total.....	68
6.3.2.2. Estandarización de las condiciones de reacción.....	69
6.3.2.3. Eficiencia de amplificación, intervalo dinámico y validación del método de cuantificación relativa.....	75
6.3.2.4. Efecto de la disminución de la temperatura sobre los niveles de expresión de genes relacionados con las vías de N-glicosilación....	79
6.3.2.5. Efecto de la disminución de la temperatura sobre los niveles de expresión de genes codificantes para: la proteína recombinante, chaperonas del RE y proteínas de choque frío.....	87
<b>6.4. Actividad de exoglicosidasas extracelulares.....</b>	<b>95</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>103</b>
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>105</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>106</b>
<b>ANEXO I. Análisis del patrón de glicosilación.....</b>	<b>114</b>
<b>APÉNDICE A. Métodos de cálculo.....</b>	<b>120</b>
<b>APÉNDICE B. Comparación del consumo y producción de metabolitos, entre cultivos con suero y sin suero.....</b>	<b>122</b>
<b>APÉNDICE C. El metabolismo de células animales: desperdicio de la fuente de carbono mediante glutaminólisis.....</b>	<b>123</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Esquema de un cultivo escalonado o bifásico de células animales.....	6
<b>Figura 2.</b>	Modulación de la transcripción y traducción por las proteínas de choque frío.....	12
<b>Figura 3.</b>	Vía principal de N-glicosilación en mamíferos.....	15
<b>Figura 4.</b>	Estructura general de una IgG humana y los N-glicanos asociados.....	24
<b>Figura 5.</b>	Esquema de la estrategia experimental.....	27
<b>Figura 6.</b>	Esquema del experimento para la determinación del tiempo óptimo de cambio de temperatura .....	29
<b>Figura 7.</b>	Morfología de los cultivos de células CHO productoras de un AcMo-IL8	42
<b>Figura 8.</b>	Cinéticas de crecimiento de células CHO-AcMoIL8 en medio con y sin suero.....	43
<b>Figura 9.</b>	Cultivos escalonados de 37° a 32°C y de 37° (A) a 30°C (B).....	46
<b>Figura 10.</b>	Efecto de la disminución de la temperatura sobre el metabolismo.....	47
<b>Figura 11.</b>	Cultivos escalonados de 37° a 32°C y de 37° (A) a 30°C (B) en suspensión.....	53
<b>Figura 12.</b>	Efecto de la temperatura sobre el metabolismo de cultivos a 30 y 32°C en spinner flask.....	55
<b>Figura 13.</b>	Efecto de la disminución de la temperatura sobre la concentración de AcMo-IL8.....	59
<b>Figura 14.</b>	Efecto de la disminución de la temperatura sobre la productividad específica del AcMo-IL8.....	60
<b>Figura 15.</b>	Efecto de la disminución de la temperatura sobre el tamaño celular....	63
<b>Figura 16.</b>	Modelo del cambio de combustible metabólico durante la hibernación de redores.....	66
<b>Figura 17.</b>	Prueba de amplificación de oligos.....	68
<b>Figura 18.</b>	Integridad y pureza del ARN <sub>tot</sub> .....	69
<b>Figura 19.</b>	Optimización de la concentración de oligonucleótidos.....	70
<b>Figura 20.</b>	Estabilidad de los genes de referencia.....	72
<b>Figura 21.</b>	Eficiencia de amplificación de los transcritos.....	76
<b>Figura 22.</b>	Curvas típicas para validar el método del C <sub>q</sub> comparativo.....	78
<b>Figura 23.</b>	Efecto de la disminución de la temperatura sobre la expresión de genes involucrados con la síntesis de precursores lipídicos (A) y transportadores de azúcares activados (B).....	82
<b>Figura 24.</b>	Efecto de la disminución de la temperatura sobre la expresión de genes codificantes para glicosiltransferasas (A) y glicosidasas (B).....	85

<b>Figura 25.</b>	Efecto de la disminución de la temperatura sobre la expresión de genes codificantes para la cadena pesada (HC) y ligera (LC) del AcMo-IL8.....	88
<b>Figura 26.</b>	Cociente de la expresión relativa HC/LC y producción de cadena pesada y ligera del AcMo-IL8.....	89
<b>Figura 27.</b>	Efecto de la disminución de la temperatura sobre la expresión de genes codificantes para chaperonas del RE (A) y proteínas de choque frío (B)..	91
<b>Figura 28.</b>	Actividad extracelular de exoglicosidasas en cultivos de células CHO a 30, 32 y 37°C.....	96
<b>Figura 29.</b>	Actividad extracelular de exoglicosidasas en células CHO cultivadas a baja temperatura.....	97
<b>Figura 30.</b>	Actividad normalizada de las exoglicosidasas en los cultivos a 30 y 32°C	99
<b>Figura 31.</b>	Relación entre la expresión de ARNm y la actividad extracelular de las exoglicosidasas.....	102
<b>Figura 32.</b>	Cromatograma característico obtenido durante la purificación.....	115
<b>Figura 33.</b>	Identificación y pureza del AcMo-IL8 purificado.....	116
<b>Figura 34.</b>	Patrón de glicosilación del AcMo-IL8 a 37°C.....	118
<b>Figura 35.</b>	Perfiles de consumo y producción de metabolitos.....	122
<b>Figura 36.</b>	Esquema de las vías metabólicas más relevantes en células CHO.....	124

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales ventajas y desventajas de las células de mamífero como sistema de producción de proteínas recombinantes.....	3
<b>Tabla 2.</b> Efecto de la hipotermia moderada en la productividad de proteína recombinante en diferentes líneas celulares de mamífero.....	7
<b>Tabla 3.</b> Respuestas coordinadas al estrés por frío en células de mamífero.....	10
<b>Tabla 4.</b> Estudios que evalúan el efecto de la disminución de la temperatura sobre el patrón de glicosilación en cultivos de células CHO.....	20
<b>Tabla 5.</b> Anticuerpos monoclonales aprobados para uso terapéutico.....	22
<b>Tabla 6.</b> Oligonucleótidos diseñados para realizar el análisis transcripcional.....	32
<b>Tabla 7.</b> Matriz de primers empleada para optimizar la concentración de oligonucleótidos.....	35
<b>Tabla 8.</b> Parámetros cinéticos y estequiométricos de la línea celular CHO-AcMoIL8 cultivada en adherencia y en suspensión.....	44
<b>Tabla 9.</b> Parámetros cinéticos y estequiométricos determinados para los cultivos escalonados y control a 37°, 32° y 30°C.....	49
<b>Tabla 10.</b> Parámetros cinéticos y estequiométricos determinados para los cultivos escalonados y control a 37°, 32° y 30°C en spinner flasks.....	57
<b>Tabla 11.</b> Concentración máxima, productividad específica [qp] y volumétrica [Pv] de AcMo-IL8 de los cultivos a baja temperatura.....	59
<b>Tabla 12.</b> Candidatos a genes de referencia evaluados y su estabilidad de expresión.....	71
<b>Tabla 13.</b> Estadística descriptiva para los 3 candidatos a genes de referencia basados en el valor promedio de C <sub>q</sub> .....	74
<b>Tabla 14.</b> Análisis de correlación de pares para los candidatos a genes de referencia.....	75
<b>Tabla 15.</b> Resultados del experimento de validación del método del C <sub>q</sub> comparativo.....	78
<b>Tabla 16.</b> Estructuras propuestas del patrón de glicosilación para el AcMo-IL8 producido en cultivos en suspensión a 37°C.....	119
<b>Tabla 17.</b> Temperatura y pH óptimos para enzimas clave de la glicólisis, TCA, glutaminólisis, vía de las pentosas, síntesis y degradación de ácidos grasos.....	125

# ABREVIATURAS

<b>AcMo-IL8</b>	Anticuerpo Monoclonal contra Interleucina 8
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido Desoxirribonucleico complementario
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido Ribonucleico mensajero
<b>CDM4</b>	Chemical Defined Medium 4
<b>CHO cells</b>	Chinese Hamster Ovary cells o Células de Ovario de Hámster Chino
<b>CIRP</b>	Proteína de unión a ARN inducida por frío (cold inducible RNA binding protein)
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>CSP</b>	Cold shock proteins o proteínas de choque térmico frío
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay o Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
<b>Fc</b>	Fracción cristalizable de una inmunoglobulina
<b>GRP78</b>	Proteína regulada por glucosa de 78kDa (glucose-regulated protein)
<b>HC</b>	Cadena pesada del AcMo-IL8 (Heavy Chain)
<b>ICV</b>	Integral de células viables
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>LC</b>	Cadena ligera del AcMo-IL8 (Light Chain)
<b>MTX</b>	Metotrexato
<b>qPCR</b>	Real Time -Polymerase Chain Reaction o Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
<b>PDI</b>	Proteína disulfuro isomerasa (protein disulfide isomerase)
<b>Pv</b>	Productividad volumétrica
<b><math>\mu</math></b>	Velocidad específica de crecimiento
<b>q<sub>glc</sub></b>	Velocidad específica de consumo de glucosa
<b>q<sub>gin</sub></b>	Velocidad específica de consumo de glutamina
<b>q<sub>glu</sub></b>	Velocidad específica de producción de glutamato
<b>q<sub>lac</sub></b>	Velocidad específica de producción de lactato
<b>q<sub>p</sub></b>	Productividad específica
<b>RBM3</b>	Proteína 3 de unión al motivo de ARN: RRN,RNPI (RNA binding motif protein 3)
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>SBF</b>	Suero Bovino Fetal
<b>SV40</b>	virus vacuolado del simio 40

<b>T<sub>a</sub></b>	Temperatura de alineamiento (annealing)
<b>TCA</b>	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de fusión (melting)
<b>Y<sub>glu/gln</sub></b>	Rendimiento mol de glutamato por mol de glutamina
<b>Y<sub>lac/glc</sub></b>	Rendimiento mol de lactato por mol de glucosa

## ENZIMAS RELACIONADAS CON LA N-GLICOSILACIÓN

<b>UGPase</b>	UDP-glucosa pirofosforilasa
<b>DPM1</b>	Dolicol-fosfato manosiltransferasa subunidad 1
<b>DPM2</b>	Dolicol-fosfato manosiltransferasa subunidad 2
<b>DPAGT1</b>	UDP N-acetil glucosamina-1-fosfato transferasa
<b>GDPFucT</b>	Transportador de GDP-fucosa
<b>UDPgalT</b>	Transportador de UDP-galactosa
<b>CMPSAT</b>	Transportador de CMP-ácido siálico
<b>GlcNAc-TI</b>	N-Acetil glucosaminiltransferasa I
<b>4galT</b>	$\beta$ -(1,4)-galactosiltransferasa
<b>SialT IV</b>	$\alpha$ -(1,3)-sialiltransferasa IV

---

## RESUMEN

La disminución de la temperatura de cultivo por debajo de 37°C ha sido considerada como una estrategia eficiente para incrementar la productividad de glicoproteínas recombinantes terapéuticas producidas en células de mamífero. La utilidad de tal estrategia para optimizar procesos a gran escala dependerá del entendimiento de las respuestas moleculares involucradas para asegurar la productividad y calidad de la proteína recombinante. En este trabajo el efecto de la hipotermia moderada sobre el metabolismo, la productividad, la expresión de genes relacionados con las vías de N-glicosilación y genes codificantes para un anticuerpo monoclonal anti-interleucina 8 [AcMo-IL8], y sobre la actividad extracelular de exoglicosidasas, fue determinado para células derivadas de ovario de hámster chino [CHO] cultivadas a 30 y 32°C en una modalidad de cultivo escalonado.

En general, la disminución de la temperatura retrasó la caída de la viabilidad y disminuyó la actividad metabólica. Sin embargo, sólo en los cultivos escalonados con cambio a las 72 h se observó menor desperdicio de las fuentes de carbono en forma de lactato ( $Y_{lac/glc} < 1.5$ ) y un incremento de hasta 21% en la productividad específica de AcMo-IL8. El análisis transcripcional sobre las vías de N-glicosilación mostró una disminución en la expresión de los genes codificantes para enzimas localizadas en el Golgi como la N-acetil glucosaminiltransferasa I,  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa,  $\alpha(2,3)$ -sialiltransferasa IV, transportador de UDP-galactosa, y sialidasa. Mientras que los genes relacionados con la síntesis de oligosacáridos unidos a lípidos en el RE (UGPase, DPM1 y DPM2), fueron sobreexpresados en casi todas las condiciones evaluadas, con excepción del gen codificante para UDP-N-acetil glucosaminil-1-fosfato transferasa, cuya expresión disminuyó hasta un 40% en los cultivos control a baja temperatura. La expresión de los genes codificantes para los transportadores de CMP-siálico y GDP-fucosa se mantuvo constante a 30°C pero fue sumamente variable a 32°C. Únicamente en los cultivos escalonados con cambio a las 72 h, la expresión de todos los genes relacionados con la N-glicosilación incrementó o fue similar al control a 37°C.

---

Una sobreexpresión del gen codificante para la cadena pesada del AcMo pero no para la cadena ligera fue observada al disminuir la temperatura. En contraste, los genes codificantes para ambas chaperonas del retículo endoplásmico [GRP78 y PDI] sólo fueron sobreexpresados en los cultivos escalonados a 30°C con cambio a las 72 h, en el resto de los cultivos su expresión fue variable. La expresión de los genes codificantes para las proteínas de choque frío RBM3 y CIRP, incrementó hasta 7 y 3 veces respectivamente, en los cultivos control a 30 y 32°C, indicando la presencia del estrés ocasionado por la disminución de la temperatura. Finalmente, la actividad extracelular y producción de la hexosaminidasa, manosidasa y galactosidasa disminuyeron en todos los cultivos hipotérmicos, siendo la actividad y cantidad de la galactosidasa hasta 66 y 69% menor respecto a 37°C. No se observó correlación alguna entre la actividad extracelular normalizada de la galactosidasa y manosidasa respecto a la expresión de los genes codificantes correspondientes (*Gibi* y *Manea*), sugiriendo una regulación a nivel postraduccional.

---

# 1. INTRODUCCIÓN

Las células derivadas de ovario de hámster chino (CHO) se han convertido en el sistema preferido para la producción a gran escala de glicoproteínas recombinantes con uso terapéutico, debido a su capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales similares a las encontradas en las proteínas humanas [20,33,54,62,63,134,139]. Sin embargo, su principal desventaja sigue siendo la baja productividad obtenida en comparación con sistemas de expresión basados en procariotes [54,73,98,139].

En la actualidad, entre 30 y 50% de los biofármacos aprobados por agencias reguladoras internacionales son glicoproteínas recombinantes [57,134] y cerca del 70% de ellas son producidas en células CHO [57]; de esta forma se ha estimado que para este año (2010) dichos productos constituirán el 57% del mercado farmacéutico mundial [99]. Bajo este contexto, el mercado actual requiere procesos altamente productivos para generar biofármacos con calidad (patrón de glicosilación) y eficacia reproducible y consistente [73,134].

Se ha demostrado que la disminución de la temperatura entre los 22 y 36°C (hipotermia moderada) incrementa la productividad de diversas proteínas recombinantes [8,15,17,39,40,43,45,54,66,112,116,122,130,131,141-146], pero pocos trabajos han evaluado el efecto que tiene este cambio sobre el patrón de glicosilación del producto. La poca información disponible, ha demostrado que existe una gran variabilidad entre las diferentes condiciones de cultivo y líneas celulares empleadas, por lo que aún se desconoce si la disminución de la temperatura modifica el patrón de glicosilación de biofármacos recombinantes [8,17,45,54,92,112,130,131,145,146]. Nuestra propuesta es que la disminución de la temperatura de cultivo afecta la calidad de la glicoproteína recombinante, probablemente induciendo un cambio en la expresión y actividad de las enzimas involucradas en las vías de N-glicosilación.

---

Por lo tanto, en este proyecto se estudió por qPCR, el efecto de la hipotermia moderada [30 y 32°C] sobre la expresión de 14 genes codificantes para enzimas participantes en las vías de N-glicosilación, y sobre la transcripción de un anticuerpo monoclonal anti-interleucina 8 [AcMo-IL8] producido en células CHO, como glicoproteína recombinante modelo. También se determinó la actividad de 3 exoglicosidasas para establecer el grado de degradación extracelular de la glicoproteína. Ambas aproximaciones permiten un mejor entendimiento de la respuesta al estrés por frío que conducirá a un control racional del cultivo a favor de una mayor producción con calidad consistente (perfil de glicosilación homogéneo y deseado), con el objetivo de ser implementada como una herramienta útil y económica para la optimización de procesos industriales.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. LAS CÉLULAS DE MAMÍFERO COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Originalmente las células animales comenzaron a cultivarse en 1907 para mantener cortes de tejidos y estudiar la fisiología celular [52]; sin embargo, fue en los años 50 cuando la necesidad de producir vacunas virales aceleró el diseño de bioprocesos a gran escala para células de mamífero [37]. A partir de entonces, el progreso del cultivo celular continuó y entre 1960 y 1980, se desarrollaron una gran variedad de líneas celulares para la expresión y producción industrial de proteínas recombinantes [72,88]. Hoy en día, las células de mamífero son el sistema dominante para producir biofármacos recombinantes, justamente por sus ventajas sobre otros sistemas de expresión, concretamente por su capacidad de realizar modificaciones postraduccionales complejas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Principales ventajas y desventajas de las células de mamífero como sistema de producción de proteínas recombinantes

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"><li>◦ <b>Realizan modificaciones postraduccionales complejas</b> (p.ej. glicosilación, tiosilación, etc.)</li><li>◦ Tienen chaperonas que ayudan al correcto plegamiento de la proteína recombinante</li><li>◦ Secretan la proteína al medio de cultivo facilitando su purificación</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>◦ El tiempo de establecimiento del cultivo es mayor y más costoso que el de células procariotas y eucariotes inferiores<ul style="list-style-type: none"><li>◦ Los cultivos crecen más lento</li></ul></li><li>◦ <b>Baja productividad comparada con la de procariotes</b></li></ul>

Las células derivadas de ovario de hámster chino *Cricetulus griseus* (CHO) fueron desarrolladas en 1957 por Puck et al. [107], y se han convertido en el sistema preferido para la producción a gran escala de glicoproteínas recombinantes con uso terapéutico, debido a que presentan un crecimiento rápido, tienen un bajo número de cromosomas, presentan una mayor estabilidad genética con respecto al tiempo de cultivo [107], pueden-

---

ser transfectadas con facilidad y realizan modificaciones post-traduccionales complejas similares a las humanas, requeridas para la actividad biológica de las proteínas [45,62,73,107,148]. Además, esta línea junto con las de mieloma de ratón NSO y SP2/O, han sido **clasificadas como nivel de bioseguridad 1** por autoridades federales suizas como la Oficina Federal del Ambiente (FOEN por sus siglas en inglés), lo cual implica la ausencia de riesgo o riesgo insignificante para la salud humana y el ambiente [68].

A pesar de la gran variedad de procesos industriales y múltiples productos terapéuticos comercialmente exitosos desarrollados en células de mamífero, durante los últimos 10-20 años la tendencia a nivel industrial se ha enfocado principalmente en: el uso de medios libres de cualquier derivado de origen animal (suero y/o proteínas), debido al incremento en el costo del suero y a las estrictas normas de seguridad que exige la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) para la aprobación de biofármacos [29,88]. Así como a mejorar el rendimiento de proteína recombinante manteniendo la calidad y eficacia del producto, pues la desventaja más importante del sistema es su baja productividad (Tabla 1), representando uno de los puntos más críticos de optimización [33,40,98,141].

## **2.2. ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR LA PRODUCTIVIDAD**

Debido a que el rendimiento de proteína recombinante en células CHO está directamente relacionado con la concentración celular y la longevidad del cultivo, las estrategias de optimización están encaminadas al control de la proliferación, fisiología y comportamiento celular ante situaciones de estrés [14,73], así como a mejorar funciones celulares al expresar enzimas carentes en el sistema o con bajo nivel de expresión [88]. En este sentido, las estrategias estudiadas para incrementar la productividad abarcan tres grandes rubros: las técnicas de ingeniería celular, el control de parámetros de cultivo y la adición de compuestos químicos o suplementos al medio de cultivo [20,73].

Los efectos de la manipulación de diversos parámetros de cultivo, entre ellos pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, osmolaridad, formulación de medios de cultivo, etc., han sido ampliamente estudiados, arrojando resultados satisfactorios en cuanto a productividad pero variados en cuanto a la calidad del producto [14,75,141,147]. Concretamente en los últimos años, la -

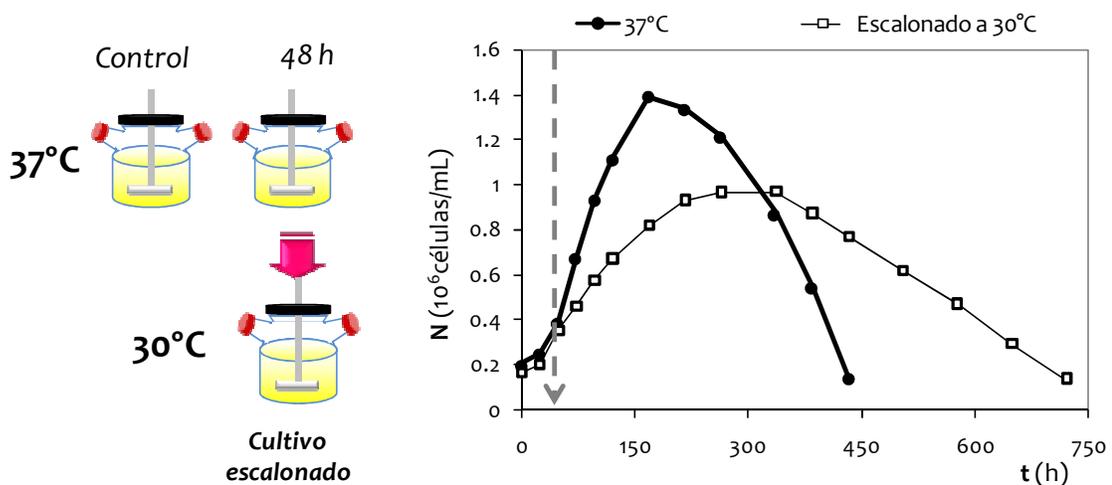
---

disminución de la temperatura de cultivo ha tomado un interés particular, pues se ha demostrado que esta estrategia mejora la productividad específica de diversas líneas celulares (tabla 2), además de regular la proliferación celular de forma más fiable y eficiente en comparación con los enfoques de ingeniería celular y adición de compuestos químicos al medio de cultivo, los cuales tienen resultados variables y en algunos casos ejercen efectos adversos en el rendimiento de proteína recombinante [73]. Incluso, se ha demostrado que en células modificadas por ingeniería genética cultivadas a menos de 37°C, el efecto que predomina sobre la productividad es el de la temperatura [73]; por ejemplo, Galbraith et al. [2006] reportaron un incremento de 3 veces en la productividad de IgG<sub>4</sub> producida en células CHO transfectadas con polietilenoimina (expresión transitoria a gran escala) y cultivadas a 32°C [45]. De esta forma, la manipulación de la temperatura de cultivo se presenta como una opción factible y económica para aumentar la productividad de procesos a gran escala [3,30,54,137,147].

### 2.2.1. Efecto de la disminución de la temperatura sobre la productividad de proteínas recombinantes

Un número considerable de estudios han demostrado que la disminución de temperatura entre los 22 y 36°C extiende la duración de la fase de producción en cultivos de células animales [8,15,17,39,40,43,45,54,66,113,117,123,132,133,143-148], provocando un aumento de entre 1.3 y hasta 47 veces en la productividad específica de proteína recombinante, y un incremento de 1.2 a 38 veces en la productividad volumétrica, respecto a las obtenidas a 37°C (Tabla 2). Dichos estudios han evaluado el comportamiento de una misma línea celular sometida a varias temperaturas subfisiológicas y diferentes líneas celulares que producen la misma proteína sometidas a una misma temperatura; tanto en cultivos monotérmicos, con cambios escalonados de temperatura y combinando la modificación de algún otro parámetro de cultivo (como el pH) [29,54,84,97,113,130-133,143-148]. No obstante, se ha demostrado que los resultados son variables entre las diferentes líneas celulares, modalidades de cultivo, temperaturas y proteínas de interés; haciendo más difícil proponer una explicación a dicho efecto y hasta no existir un entendimiento claro del fenómeno se realizan análisis individuales para cada sistema [3,40].

Entre los principales inconvenientes de esta estrategia están la reducción de entre 30 y 50% en el rendimiento total de proteína recombinante y la duplicación del tiempo de cultivo necesario para producir la misma cantidad de proteína que a 37°C [39]. Para solucionar esta problemática, se ha propuesto el uso de cambios **escalonados** en la temperatura o **procesos bifásicos** (Figura 1), en los cuales las células inicialmente se cultivan a 37°C hasta cierta concentración celular (fase de proliferación) y posteriormente se disminuye la temperatura, prolongando el tiempo de cultivo y extendiendo la fase de producción [17,40,113,132,133,145]. En la actualidad existen al menos doce estudios de procesos escalonados para la producción de diversas proteínas recombinantes en células CHO; de ellos, al menos nueve reportan un aumento en la productividad específica y diez, un aumento en la productividad volumétrica [Tabla 2, filas sombreadas].



**Figura 1. Esquema de un cultivo escalonado o bifásico de células animales**, en el cual las células son cultivadas inicialmente a 37°C y a las 48 h (flecha punteada gris) se cultivan a una menor temperatura (30°C) para prolongar el tiempo de cultivo y mejorar la productividad.

**Tabla 2.** Efecto de la hipotermia moderada en la productividad de proteína recombinante en diferentes líneas celulares de mamífero

Línea celular	Proteína recombinante	Temperatura (°C)	Productividad específica	Productividad volumétrica	Referencia
NSO	IgG <sub>4</sub> quimérico	22	10%↓	NR	Swiderek, et al., 2007
		34	6.4%↑	NR	
CHO	IgG <sub>4</sub>	37-32	17%↑	36%↓	Marchant, et al., 2008
		37-27	66%↓	90%↓	
		37-32	33%↑	Sin cambio	
		37-27	12%↑	28%↓	
	EPO	37-32	4.2x↑	3.7x↑	Anh, et al., 2008
		37-30	5x↑	3x↑	
		37-28	4x↑	2.5x↑	
	SEAP	37-25	3x↑	1.4x↑	Nam, et al., 2008
		37-33	2.3x↑	2.4x↑	
		37-33	NR	21.5x↑	
	IgG <sup>†</sup>	37-31	NR	9.4x↑	Wulhfard, et al., 2008
		37-29	NR	13.9x↑	
		37-33	NR	NR	
	Hormona estimuladora de folículos (FSH)	35	Sin cambio	NR	Yoon, et al., 2007
		32	5.8x↓		
		30	7.5x↓		
		28	13x↑		
		26	12x↑		
	Eritropoietina-Fc (EPO-Fc)	37-28	NR	5.2x↑	Trummer, et al., 2006B
		37-30 <sup>‡</sup>	1.85x↑	1.3x↑	
EPO	37-33 <sup>‡</sup>	30%↑	1.4x↑	Trummer, et al., 2006A	
	30	1.7x↑	↓3.1x		
	33	1.4x↑	↓1.5x		
EPO	35	Sin cambio	↑10%	Yoon, et al., 2006b	
	37-32 <sup>‡</sup>	NR	1.8-1.4x↑		
FSH	32	1.5x↑	1.2x↑	Yoon, et al., 2006a	
	32	1.5x↑	↓1.4x		
hAcMo	2.6x↑	2.6x↑	2.7x↑	Oguchi, et al., 2006	
	37-31 <sup>‡</sup>	2.3x↑	2.5 a 1.5x↑		
Fv-Fc-IL2	30	2.8x↑	NR	Shi, et al., 2005	
EPO	32.5	3x↑	1.4x↑	Yoon, et al., 2005	
Interferón γ	32	2 x ↑	1.9 x ↑	Fox et al., 2004	

**Tabla 2.** Efecto de la hipotermia moderada en la productividad de proteína recombinante en diferentes líneas celulares de mamífero (Continuación)

Línea celular	Proteína recombinante	Temperatura (°C)	Productividad específica	Productividad volumétrica	Referencia
CHO	hGM-CSF	37-33	2.1 x ↑	2.3 x ↑	Bollati-Fogollin, 2004
	Pro-urocinasa <sup>‡</sup>	37-35	1.3x↑	NR	Chen, et al., 2004
		37-34	1.7x↑		
		37-33	Sin cambio		
		37-31	1.3 x↑		
	EPO	32	1.8x↑	NR	Yoon, et al., 2004
	Anti- 4 I-BB	30	Sin cambio	3.9 x ↑	Yoon, et al., 2003a
		33	Sin cambio	Sin cambio	
	EPO	33	4x ↑	0.86x↓	Yoon, et al., 2003b
		30	5.6 x ↑	2.5 x ↑	
	Fab quimérico	28	20 a 47x ↑	14 a 38x ↑	Schatz et al.,2003
	tPA	32	NR	1.7 x ↑	Hendrick et al.,2001
	SEAP	30	1.7x ↑	3.4 x ↑	Kaufmann et al., 1999
	C-terminal enzima α-amidante	37-32	2.4x↑	5.7x↑	Furukawa y Ohsuye, 1999
		37-34	1.6x↑	1.6x↑	
30		2.8x↑	NR	Furukawa y Ohsuye, 1998	
32		4.1x↑			
33.5		2.8x↑			

Valores respecto al cultivo control a 37°C. x= número de veces ↑: aumenta, ↓: disminuye; SEAP: fosfatasa alcalina humana, hGM.CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos; IL 2: interleucina 2, tPA: activador de plasminógeno tisular, EPO: eritropoietina, los renglones sombreados corresponden a cultivos escalonados. ‡ diferentes tiempos de cambio, † expresión transitoria, ‡ combinan pH y temperatura para controlar el crecimiento, \*respecto al monotérmico a 28°C, NR= no reportado.

## 2.2.2. ¿Por qué aumenta la productividad al disminuir la temperatura?

Estudios recientes han demostrado que la reducción de la temperatura invoca una respuesta celular coordinada [Tabla 3] [2,12,40,30,43,42,54,73]; sin embargo, los mecanismos moleculares mediante los cuales se presenta una mejora en la productividad, son pobremente entendidos.

Hasta el momento, dos explicaciones se han propuesto para el aumento de la productividad en células CHO cultivadas en condiciones de hipotermia moderada, la primera propone que el arresto del ciclo celular en fase G<sub>1</sub> provoca un retraso de los -

---

procesos apoptóticos y por lo tanto la viabilidad y fase productiva del cultivo se prolongan [44,73,90]. La segunda, atribuye el aumento en la productividad a un incremento en la transcripción de ARNm de proteínas recombinantes [3,40,125,147].

La primera propuesta parte de la observación de que la producción de proteína recombinante es dependiente de la fase del ciclo celular y genes como los que participan en la biogénesis del ribosoma y la traducción de proteínas son sobreexpresados durante la fase G<sub>1</sub>. De esta forma, las células arrestadas en G<sub>1</sub> son metabólicamente más activas, de mayor tamaño y no tienen que “gastar” recursos para generar biomasa, respecto a aquellas células no arrestadas [17,44,66,90,146]. No obstante, la máxima velocidad de expresión de proteína recombinante ha sido observada también en otras fases e incluso se ha reportado que es independiente del ciclo celular [80]. Además, estudios previos realizados en nuestro laboratorio con la línea celular TF70R, demostraron que a 30°C el 76% de las células se arrestan en fase G<sub>2</sub>/M mientras la productividad se incrementa un 30% [15]; existiendo al menos otros dos estudios que reportan el mismo efecto [123,130]. Por lo tanto, el arresto el ciclo celular parece ser un evento concomitante y no la causa directa del incremento de la productividad.

Respecto a la segunda propuesta, algunos estudios han reportado un incremento en los niveles de ARNm recombinante al disminuir la temperatura, ya sea debido a un incremento en la expresión del gen recombinante o por un incremento en su estabilidad [39,40,54,84,147]. Este argumento se apoya en el hecho de que dos de las proteínas de choque térmico por frío (CIRP y RBM3) actúan como chaperonas de ARN, estabilizando y modulando la transcripción y traducción selectiva de ciertos ARNm celulares [2,3,27,36,106,138].

### 2.2.3. Respuesta al estrés por frío en células de mamífero

La mayoría de los organismos han desarrollado estrategias sofisticadas que les permiten sobrevivir en un intervalo dinámico de temperaturas [41,106]. Dichas estrategias involucran una reprogramación genética y metabólica, así como la expresión de diversas proteínas que ayudan a contrarrestar y aliviar el estrés producido [2,23,41,106]. La respuesta al estrés por frío (**cold shock**) es poco conocida y se ha estudiado principalmente en procariotes [2,106]. No obstante, se sabe que todos los organismos responden de manera-

similar, mediante la sobreexpresión rápida de un grupo selecto de proteínas pequeñas denominadas **proteínas de choque frío** [CSP por sus siglas en inglés [2,23,41,106]. En mamíferos, el conocimiento adquirido deriva principalmente de estudios sobre termogénesis adaptativa, tolerancia al frío, investigaciones clínicas sobre los efectos de congelación de órganos para transplantes y disminución de la temperatura en bioprocesos para producción de proteínas recombinantes [2,106]. Los datos recopilados, sugieren que la respuesta involucra una serie de eventos moleculares y fisiológicos coordinados (Tabla 3) que permiten a la célula adaptarse y sobrevivir a bajas temperaturas. Los estados de hipotermia se pueden dividir en **moderados**, comprendidos entre los 25 y 35°C, donde la célula puede adaptarse y continuar proliferando, y **extremos** (0-10°C), bajo los cuales la célula muere vía necrosis debido a la formación de cristales de hielo que provocan daño de membranas. Los efectos comprendidos entre estos dos intervalos de temperatura han sido poco estudiados y sólo se reporta una disminución de la viabilidad celular [2].

**Tabla 3.** Respuestas coordinadas al estrés por frío en células de mamífero

Respuesta molecular	Respuesta fisiológica
<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Atenuación de la transcripción causada por fosforilación de factores de transcripción [125]</li> <li>◦ Inhibición de la traducción (durante la iniciación y elongación) [2] <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Aumento de la transcripción de genes específicos (transcripción selectiva) [125]</li> <li>◦ Inhibición de la degradación del ARN [2]</li> <li>◦ Procesamiento alternativo del pre-ARNm, internalización de exones sin marcos de lectura correctos [11]</li> <li>◦ Traducción selectiva de ARNm con secuencias IRES (internal ribosome entry sites) [27]</li> </ul> </li> <li>◦ Expresión de proteínas de choque térmico por frío [CSP] [41]</li> <li>◦ La traducción global de proteínas se reduce [106]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Reducción del metabolismo, consumo de glutamina, glucosa, ATP y actividad de proteasas [13,30].</li> <li>◦ Disminución en la generación de radicales libres y productos de desecho metabólico [147]</li> <li>◦ Arresto del ciclo celular (principalmente en fase G<sub>1</sub>) y desensamble del citoesqueleto [90]</li> <li>◦ Aumento de la viabilidad y disminución de apoptosis [43]</li> <li>◦ Reducción de la velocidad específica de crecimiento [147] <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Aumento de la resistencia al estrés hidrodinámico [79]</li> </ul> </li> </ul>

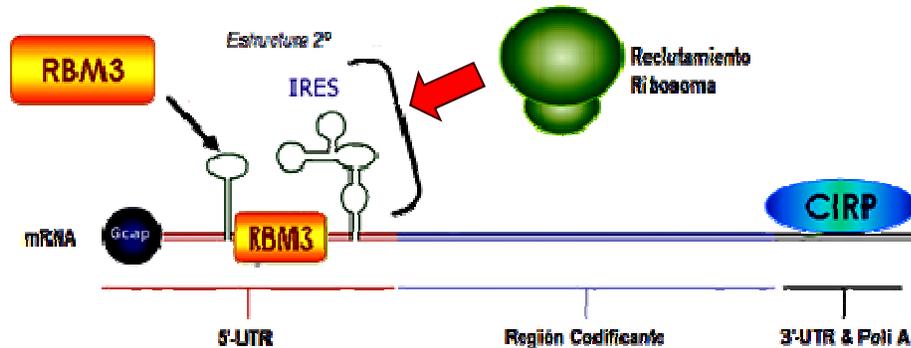
---

Actualmente, más de 20 proteínas inducidas por frío han sido identificadas, incluyendo la proteína disulfuro isomerasa (PDI), vimentina, NDK B, ERP57, fosfoglicerato cinasa, HSP71, HSP90-β, NSR-1 y EF2, entre otras [2,12,73,106,125]. Sin embargo, las CSP mejor caracterizadas hasta el momento son la proteína de unión a ARN inducible por frío (**CIRP**) y la proteína con motivos de unión a ARN (**RBM3**) [41,106].

**CIRP** es una proteína ubicua de 18 kDa con un dominio de unión a ARN conservado (CS-RBD) en el extremo amino terminal y un dominio rico en glicinas en el extremo carboxilo terminal; se expresa de forma constitutiva o periódica según el tejido en el que se encuentre; está altamente conservada en ratón, rata, humano y hámster. CIRP es al menos uno de los componentes que inducen el arresto del ciclo celular a baja temperatura, además de que se une a la región poliadenilada y a la no codificante (UTR) en el extremo 3' de ARNm susceptibles a degradación (Figura 2), protegiéndolos y restaurando su conformación nativa durante condiciones de estrés [2,3,41,73,106,125]. Un incremento importante en la expresión de CIRP ha sido observado en células expuestas a otros tipos de estrés, como por ejemplo radiación ultravioleta e hipoxia, pero no en células sometidas a estrés por calor [41,73,106]. Por su parte, **RBM3** es estructuralmente parecida a CIRP, se expresa en tejidos específicos y se caracteriza por poseer en la región no codificante 5' de su ARNm una secuencia **IRES** (internal ribosome entry sites) y otras secuencias especializadas, que le permiten ser reconocido por el ribosoma independientemente de la estructura CAP, facilitando su transcripción a bajas temperaturas. Su expresión a baja temperatura resulta en un incremento en el nivel relativo de monosomas y polisomas 80s, consistente con un incremento en la asociación de las subunidades del ribosoma durante los pasos de iniciación de la síntesis de proteínas [2,3,27,36,41,138].

RBM3 está involucrada en diversas funciones celulares tales como: la proliferación dependiente de citocinas, replicación de poxvirus, desarrollo de cáncer; regula los niveles de micro ARN (miRNA) que a su vez participan en el silenciamiento de genes, regula la síntesis global de proteínas y la degradación de su propio mensajero, previene la apoptosis y funciona como chaperona de ciertos ARNm uniéndose a su extremo 5' (Fig. 2) [3,27,36,41,70,73,125,147]. Se sabe que RBM3 al igual que CIRP, está regulada por —

cambios en los niveles de oxígeno, lo cual indicaría una conexión entre las respuestas a choque por frío e hipoxia [138].



**Figura 2. Modulación de la transcripción y traducción por las proteínas de choque frío.** CIRP y RBM3 modulan la síntesis global de proteínas uniéndose a las regiones no codificantes (UTR, por sus siglas en inglés) de ciertos ARNm (CIRP se une a la UTR 3' y a la cola poliA, mientras que RBM3 a la UTR 5'), para estabilizarlos, protegerlos de la degradación y promover su traducción (RBM3 recluta al ribosoma) en condiciones de hipotermia [Modificado de Al-Fageeh, et al., 2006].

Hasta este punto, la disminución de la temperatura parece ser una estrategia prometedora para mejorar la producción comercial de proteínas recombinantes en células CHO. Esto será factible en la medida que el conocimiento generado sea consistente y permita establecer una explicación coherente que integre la respuesta celular con la caracterización del sistema utilizado. No obstante, uno de los retos más importantes implica la producción de proteínas con un patrón de modificaciones co- y postraduccionales predecible, reproducible y consistente. Entre ellas, la que destaca por su estrecha relación con la calidad del producto, es la glicosilación.

### 2.3. Glicosilación

La glicosilación consiste en la adición covalente de carbohidratos a secuencias consenso dentro de las proteínas, en un proceso enzimático complejo tipo célula, tejido y sitio específico. En principio, todos los organismos vivos son capaces de sintetizar enlaces péptido-carbohidrato, existiendo una gran variedad de ellos distribuidos en todo el espectro filogenético (desde eubacterias hasta animales) [126]. Sin embargo, la complejidad de las estructuras formadas incrementa de manera proporcional a la del organismo y a sus necesidades particulares; por lo tanto, dependiendo de la maquinaria -

---

enzimática disponible y de la proteína en sí, en una misma proteína de vertebrados se pueden presentar 5 diferentes tipos de enlaces carbohidrato-péptido: C-manosilación, glicpiación, N-glicosilación, O-glicosilación y P-glicosilación [19,126].

Considerando además, que los oligosacáridos pueden tener grupos fosfato, sulfato o metilo unidos a su estructura y que estos pueden unirse entre sí de manera lineal o como cadenas ramificadas, se generan un gran número de cadenas estructuralmente complejas, diferentes y de longitud variable [18]. Así, dependiendo de la estructura del oligosacárido y de la proteína a la cual esté unido, la glicosilación participa en funciones tales como: adhesión y reconocimiento celular, señalización, ayuda al correcto plegamiento de las proteínas, evita la desnaturalización y proteólisis, y participa en los procesos de transporte a través de la vía secretoria [18,60,62,53,55,126,136].

### 2.3.1. N-glicosilación

De los tipos de glicosilación, la más estudiada e importante para glicoproteínas recombinantes destinadas al uso terapéutico humano es la **N-glicosilación**, porque determina la actividad biológica de las proteínas y participa en el correcto plegamiento de las mismas [19,55,62,100,126]. Por ello, para garantizar la estabilidad y eficacia del producto, la industria biotecnológica tiene particular interés por mantener la consistencia en el perfil de N-glicosilación. Incluso, las tendencias actuales apuestan al mejoramiento de la maquinaria enzimática de ciertos organismos (particularmente levaduras) con la finalidad de diseñar la glicosilación de las proteínas para mejorar sus propiedades biológicas [18], aunque “como vehículos de producción comercial, dichos sistemas están todavía en su infancia” [33].

La N-glicosilación es un proceso co-traduccionaL complejo y secuencial que involucra una gran variedad de enzimas citoplásmicas y transmembranales localizadas a lo largo de la vía secretoria del retículo endoplásmico (RE) y aparato de Golgi. Aunque la maquinaria enzimática está determinada genéticamente, su desempeño dependerá de la disponibilidad de ribonucleótidos, oligosacáridos y lípidos precursores, permitiendo una regulación tejido-específica sensible a cambios ambientales [19].

---

La vía principal está conservada en todos los eucariotes (también se ha observado en arqueobacterias y eubacterias), mientras que el mayor grado de diversificación estructural de una glicoproteína, se alcanza en el aparato de Golgi [55]. El proceso comienza en la cara citoplásmica del RE, donde se sintetiza la primera parte de un N-oligosacárido conservado unido a dolicol fosfato formado por cinco manosas y dos N-acetilglucosaminas:  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ . Posteriormente una flipasa internaliza dicho N-oligosacárido, donde termina de formarse el núcleo presintetizado con la estructura  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{NAcGlc}_2$ . En el lumen del RE, la oligosacaryltransferasa (OST) transfiere el N-oligosacárido conservado a la proteína recién sintetizada en un residuo de Asn, dentro de la secuencia Asn-Xaa-Ser/Thr, donde Xaa puede ser cualquier aminoácido excepto prolina [19,55,100,126]. Dicho proceso ocurre mientras el péptido está siendo sintetizado y translocado a través de la membrana del RE por el canal Sec61 y es recibido por proteína regulada por glucosa de 78 kDa (GRP78)—las proteínas están en proximidad [118]; inmediatamente después de la transferencia el precursor es procesado secuencialmente por glucosidasas y manosidasas (así se evita que sea reconocida nuevamente por la OST), hasta sintetizar un glicano con estructura  $\text{Man}_8\text{NAcGlc}_2$  que será exportado al aparato de Golgi, donde ocurre su ramificación mediante la adición de diversos monosacáridos (N-acetilglucosamina, galactosa, fucosa, ácido siálico). De aquí en adelante la vía se puede diversificar de acuerdo al organismo (Figura 3) [19].

Un amplio espectro de estructuras es posible, pero siempre van a compartir el núcleo  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ; dichas estructuras se clasifican en:

- a) **Alta manosa.** Estructuras que contienen entre 5 y 9 unidades de manosa unidas al núcleo principal.
- b) **Complejos.** En los cuales, residuos de manosa unidos con enlaces  $\alpha 1,3$  y  $\alpha 1,6$  en el núcleo son sustituidos por GlcNAc
- c) **Híbridos.** En los cuales, sólo las manosas unidas al núcleo por enlaces  $\alpha 1,3$  son sustituidos por GlcNAc.

Los N-glicanos híbridos y complejos son sintetizados únicamente por animales con sistema circulatorio, pues los eucariotes inferiores carecen de las enzimas ramificantes específicas. Las glicoproteínas humanas además presentan fucosa o ácido siálico en los --



---

extremos terminales de algunos N-oligosacáridos, siendo los procesos de fucosilación y sialilación los que indican el término de la extensión de la cadena [18].

Considerando tal diversidad y que una misma proteína puede tener más de un sitio de N-glicosilación, se definen dos parámetros primordiales: la macroheterogeneidad, o sitios potenciales de N-glicosilación ocupados, y la microheterogeneidad, referida a los motivos estructurales y composición de monosacáridos que conforman la propia glicosilación. Aunque en general, las glicoproteínas se producen como una población heterogénea de glicofomas (oligosacáridos diferentes unidos a la misma secuencia peptídica), una desviación considerable en dichos parámetros puede tener efectos contraproducentes en su actividad biológica [53,64].

En general, la modificación de proteínas a través de la glicosilación es un evento que va más allá del genoma; en el que la síntesis de oligosacáridos y los sitios potenciales de N-glicosilación dependen de la interacción de diversos factores, incluyendo [1,19,25, 53,55,126,136]:

- i) La localización de las glicosiltransferasas a lo largo de la vía secretoria [18,19].
- ii) La disponibilidad de donadores y aceptores de azúcares [71,85], las glicosiltransferasas pueden competir por el sustrato y la acción de una depende de la antecesora [19,76,128]
- iii) El pH, ya que a lo largo de la vía se acidifica influenciando la actividad relativa de las diferentes enzimas (pH óptimo) [51].
- iv) El nivel de expresión de las diferentes enzimas; algunas son expresadas constitutivamente y otras son tejido específicas [19,126].
- v) Tiempo de tránsito de una glicoproteína a través de los diferentes compartimentos. Aquellos glicoconjugados que transitan rápidamente por la vía secretoria limitan el tiempo disponible para que algunas reacciones ocurran [19,32,55].
- vi) La presencia y actividad de diversas glicosidasas [56].
- vii) El funcionamiento del sistema de control de calidad en el RE [55].

---

A su vez, la regulación de la expresión y actividad de las enzimas involucradas se logra a través de varios mecanismos [19,18,76,126,128]:

- Los genes de las glicosiltransferasas poseen múltiples promotores y sitios de inicio de la transcripción. Múltiples copias del mismo gen unidas a diferentes regiones reguladoras [19].
- El splicing alternativo del ARNm resulta en isoformas de una enzima con diferentes actividades [18].
- El recambio y localización de las enzimas en las membranas está controlado, su actividad se regula por inhibición por producto y/o competencia por sustrato [18,62].
- Organización de secuencias en familias de enzimas estrechamente relacionadas por formar el mismo enlace glicosídico, pero presentando especificidad de afinidad por distintas proteínas, por regiones del péptido, por el azúcar que le antecede o el anómero del mismo [126]
- En el caso concreto de glicoproteínas recombinantes el proceso de purificación también puede determinar y seleccionar un subconjunto de glicoformas particulares [57,62,63,100,136].

Por otro lado, en el lumen del RE residen una enorme variedad de chaperonas y enzimas que asisten la maduración conformacional de las proteínas antes de ser transportadas al aparato de Golgi [1,55,94,122], conociéndose al menos dos sistemas que verifican el plegamiento de casi todas las proteínas: el sistema GRP78/GRP94 que recibe al péptido naciente y el sistema calnexina/calreticulina [CNX/CRT] que monitorea los glicanos unidos a él [94].

La calnexina es una proteína de membrana (90 kDa) y la calreticulina su paróloga soluble (60 kDa) [94,55], ambas son lectinas dependientes de calcio que se unen a oligosacáridos monoglucosilados [GlcMan<sub>9</sub>NAcGlc<sub>2</sub>] presentes en proteínas mal plegadas. Su función consiste en evitar la agregación de proteínas mal plegadas e incrementar la eficiencia de plegamiento, al retenerlas en el RE (disminuye la velocidad del proceso) y reclutar otras chaperonas que ayuden a plegarla antes de ser exportada al aparato de Golgi [1,94,55].

---

La proteína regulada por glucosa de 78 kDa (GRP78 o BiP) y la proteína disulfuro isomerasa (PDI), forman parte de un complejo multiprotéico que procesa y verifica el plegamiento de proteínas de forma más eficiente [94]. PDI es la encargada de formar los puentes disulfuro (oxidación de cisteínas), mientras que GRP78 reconoce y se une a secuencias hidrofóbicas de 7 residuos de aminoácidos evitando interacciones inespecíficas y por lo tanto su agregación. Se ha reportado que GRP78 constituye el 5% del total de chaperonas presentes en el RE [55,94], por lo que prácticamente todas las proteínas sintetizadas en el RE se unen a ella, además sirve como respaldo del sistema CNX/CRT para retener péptidos mal plegados y es el regulador de la **respuesta a proteínas mal plegadas (UPR** del inglés: unfolded protein response) [1,25,47,83,118,122], ejerciendo propiedades de protección celular ante la presencia de estrés en RE [55].

Desde el punto de vista biotecnológico, los sistemas de control de plegamiento en el RE son importantes, pues se ha reportado que la sobre-expresión de proteínas recombinantes puede congestionar el RE con proteínas mal plegadas o sin plegar, provocando estrés celular [32,35,122]. De tal forma que la glicosilación global exhibida por una proteína recombinante a la salida del aparato de Golgi, refleja un delicado equilibrio en la interacción de varias vías biosintéticas (glicanos, nucleótidos, lípidos, péptidos, etc.) y de control de calidad en el plegamiento, aumentando la complejidad del proceso [32,33].

### 2.3.2. Efecto de la hipotermia moderada sobre la glicosilación de proteínas recombinantes

En el contexto de glicoproteínas recombinantes, el repertorio de glicosilación es multifactorial y difícil de manipular, pues no sólo se verá afectado por los mecanismos genéticos y moleculares intrínsecos de la célula huésped (los cuales son complejos y poco entendidos), sino también por las condiciones de cultivo y el estado metabólico celular [8,17,45,100,113,120,121]. Además, se sabe que la actividad de varias enzimas celulares es extremadamente dependiente de las condiciones ambientales [19,53,126].

La mayoría de los reportes realizados hasta el momento, se han enfocado en el efecto benéfico de la disminución de la temperatura sobre la viabilidad y productividad de proteínas recombinantes. Sin embargo, al comparar la cantidad total de reportes realizados en cultivos de células CHO, contra aquéllos que han analizado el efecto sobre la

---

glicosilación, el porcentaje es significativamente bajo. Esto toma particular importancia al considerar que autoridades reguladoras internacionales (como la FDA), están demandando análisis de carbohidratos exhaustivos como parte de los procesos de validación de productos [63,57,136].

Como se puede observar en la Tabla 4 el cambio más relevante al disminuir la temperatura de cultivo, ocurre en los procesos de sialilación, pero también se han observado cambios sutiles en la proporción de glicofomas y en los procesos de galactosilación y fucosilación. Aún así, 2 de los 9 reportes concluyen que el patrón de N-glicosilación no es afectado significativamente por la temperatura [17,147-148].

La disminución en la sialilación provocada por la disminución de la temperatura, es equiparable a la observada como resultado de la acumulación de amonio [20,28,54,73,75,92], la cual inicialmente se atribuía a que el amonio alteraba la actividad de diversas glicosiltransferasas, ya sea modificando el pH de la vía endocítica o los reservorios de azúcares activados [28]. No obstante, Chen y Harcum [2006] al evaluar el efecto de una alta concentración de amonio sobre los niveles de expresión de diversas enzimas de la vía de N-glicosilación, encontraron que las etapas tempranas de la vía son insensibles a este tipo de estrés celular, y las enzimas principalmente afectadas son las que se localizan en el aparato de Golgi [28]. Por lo que la inhibición de la galactosilación y sialilación, como resultado del estrés por amonio, se atribuye a la baja expresión de la galactosiltransferasa, la sialiltransferasa y el transportador de CMP-ácido siálico, y no a un incremento en la expresión y/o actividad de la sialidasa [28]. La importancia de este trabajo radica en el hecho de ser el único estudio transcripcional específico sobre las vías de N-glicosilación, hasta el momento.

La variedad de condiciones probadas en cada estudio como son: la proteína recombinante modelo, línea celular, temperaturas empleadas, condiciones de cultivo, el método de purificación y de análisis de glicanos (tablas 2 y 4), dificulta la interpretación de los resultados para proponer una explicación general. Además, los estudios se han enfocado a un conjunto reducido de proteínas modelo y la pregunta sólo se ha abordado valuando el patrón de N-glicosilación final, olvidando por completo que los eventos moleculares implicados podrían explicar estos cambios por sutiles que sean.

**Tabla 4.** Estudios que evalúan el efecto de la disminución de la temperatura sobre el patrón de glicosilación de glicoproteínas producidas en cultivos de células CHO

Proteína	Cultivo †	Análisis	Efecto sobre el patrón de glicosilación	Referencia
EPO	37→25,28, 30, 32°C (P,Br,SF)	IEF, HPLC, MALDI-TOF	Mismas isoformas en diferente proporción de acuerdo a la temperatura. Aumentan las formas básicas a 25°C. Debajo de 32°C hay una reducción de sialilación y de estructuras tetra-antenarias, incrementan estructuras Man6P.	[8]
SEAP	37°→33° (FB,M,Br,SF)	MALDI-TOF HPLC	Disminución de la fucosilación en glicanos neutros e incremento en sialilación, predominan estructuras biantenarias completamente galactosiladas (51%) sin fucosa	[92]
EPO-Fc	30,33 y 37°C	Método enzimático	Determinación sólo de estructuras sialiladas Sialilación reducida en un 40% a 30°C y en un 20% a 33°C respecto a 37°C	[132, 133]
IgG4	32°C (P,Sp, SF)	MALDI-MS	Cambios sutiles en la proporción de las estructuras principales	[45]
hGM-CSF	37°→33° (B,Sp,SB)	HPAEC MALDI/ TOF-MS	Analizan por separado fracciones sialiladas, registran cambios ligeros en el contenido de la fracción biantenaria a 33°C, diferencias sutiles en ácidos siálicos y predomina O-glicosilación; pero no los consideran significativos, en cuanto actividad y concluyen que no hay efecto.	[17]
IFN-γ	30°, 37°→30° (B,Sp/Br,SF)	HPLC	Perfil similar pero varía la proporción de las estructuras, reducción en sialilación	[113]
EPO	30,33 y 37°C (B,FT,SB)	IEF	Reducción de estructuras ácidas a 30°C, posible selección de glicofomas en el análisis; sin embargo concluye que no hay un efecto negativo.	[147,148]
tPA	37→32, 29°C (B,Sp,SF)	Lectinas digoxigenina	Disminución de la manosa terminal en tPA de cadena sencilla a 32°C, cambios en la cantidad de ác. Siálico α(2,3)	[54]

† Se indican las temperaturas empleadas y entre paréntesis la modalidad, el recipiente y el tipo de medio de cultivo empleado (en ese orden). IEF: isoelectroenfoque, MALDI: espectrometría de masas, HPLC: cromatografía líquida de alta precisión de fase normal o reversa, HPAEC: cromatografía de intercambio aniónico de pH alto, P: perfusión, B: batch, FB: fed-batch, Br: biorreactor, Sp: spinner, SF: medio libre de suero, SB: suero bovino fetal, FT: frasco-T, M: microacarreadores.

---

Con todo lo anterior hoy en día, la discusión gira en torno a si la disminución de la temperatura modifica o mantiene el patrón de glicosilación de biofármacos recombinantes producidos en tales condiciones [8,17,30,45,54,92,113,132,133,147,148]. Nuestra propuesta es que, dada la complejidad de la N-glicosilación, de sus mecanismos de regulación y a que es un proceso enzimático, la disminución de la temperatura de cultivo afecta la calidad de la glicoproteína recombinante; probablemente induciendo un cambio en la expresión y actividad de las enzimas clave de la vía, en la disponibilidad de precursores energéticos e incluso en el correcto plegamiento de la proteína recombinante, reflejándose en el aumento en la heterogeneidad de glicoformas presentes [57,100,136].

#### **2.4. Modelo de estudio: anticuerpo monoclonal contra la interleucina 8 (AcMo-IL8)**

Los anticuerpos monoclonales (**AcMo**) son inmunoglobulinas homogéneas secretadas por un solo tipo de célula del sistema inmune, que tienen la misma afinidad y especificidad contra un antígeno [1,7,63,78]. Los AcMo tienen aplicaciones diversas en campos como la investigación biomédica, diagnóstico, catálisis y producción de biosensores; sin embargo, su principal aplicación está en el tratamiento de cáncer, artritis, trastornos inflamatorios e inmunológicos (tabla 5) [82,110,116]. Actualmente, mediante la tecnología recombinante se ha logrado manipular la producción y estructura de las inmunoglobulinas casi de manera infinita, dotándolas de propiedades efectoras y de reconocimiento diferentes a las originales, aumentando su eficiencia y minimizando su inmunogenicidad [33,63,110,116]; de esta forma se han creado **anticuerpos humanizados** los cuales sólo contienen parte de la región variable murina encargada de unir al antígeno (10%), mientras que el resto de la secuencia es de origen humano (90%) [7,63,116].

El mercado de AcMo terapéuticos ha crecido de manera exponencial debido al creciente número de pacientes, los tratamientos prolongados y la aplicación de dosis en el orden de gramos; por ello para la industria farmacéutica, los anticuerpos monoclonales representan el área de crecimiento más grande y vertiginoso del mercado [82,116,121]. Simplemente en el 2008 generaron ventas globales de \$33 mil-

millones de USD, cuando se estimaba que estas ventas se alcanzarían hasta el 2010 [82,110] y en el mismo año ocho productos generaron ventas de \$1000 millones de USD o más, siendo Remicade el líder del mercado con ventas de \$6500 millones de USD, seguido de Rituxan, Herceptin, Avastin y Humira [Tabla 5] [82,116].

**Tabla 5.** Anticuerpos monoclonales aprobados para uso terapéutico

Marca (Nombre genérico)	Blanco	FDA‡	Tratamiento	Tipo de Ac, Sist. producción	Ventas Miles de millones USD		
					2006	2007	2008
<b>Remicade</b> ( <i>Infliximab</i> )	TNF $\alpha$	1998	Enfermedad de Conh, colitis ulcerante artritis reumatoide, psoriasis	IgG <sub>1</sub> quimérico, cultivo en perfusión	4.2	5.04	6.5
<b>Rituxan</b> ( <i>Rituximab</i> )	CD10	1997	Leucemia, linfoma, artritis reumatoide	IgG <sub>1</sub> quimérico, CHO suspensión	4.7	5.01	5.6
<b>Herceptin</b> ( <i>Trastuzumab</i> )	HER2H	1998	Cáncer mama	IgG <sub>1</sub> quimérico, CHO perfusión	3.14	4.4	4.8
<b>Avastin</b> ( <i>Bevacizumab</i> )	VEGF	2004	Cáncer colón, pulmón y mama	IgG <sub>1</sub> humanizado, CHO	2.5	3.93	4.7
<b>Humira</b> ( <i>Bevacizumab</i> )	TNF $\alpha$	2002	Artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Conh	IgG <sub>1</sub> humano, CHO	2.04	3.06	4.4
<b>Erbix</b> ( <i>Bevacizumab</i> )	EGFR	2004	Cáncer de colón cuello y cabeza	IgG <sub>1</sub> quimérico, SP2/O	1.1	0.62	1.2
<b>Xolair</b> ( <i>Omalizumab</i> )	IgE	2003	Asma alérgico	IgG <sub>1</sub> humanizado, CHO	0.52	0.64	0.85
<b>Cimzia</b> ( <i>Certolizumab</i> )	TNF $\alpha$	2008	Enfermedad de Conh	Fab de IgG humanizado, <i>E. coli</i>	---	---	0.1
<b>Stelara</b> ( <i>Usteninumab</i> )	IL12, IL13	2009	Psoriasis	IgG <sub>1</sub> humanizado, NSO	---	---	---

‡: año de aprobación por la FDA, IL: interleucina, HER2: factor de crecimiento epidérmico humano 2, VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular humano, TNF: factor de necrosis tumoral, EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico, USD: dólares americanos. Adaptada de Maggon K. [2008]

---

La gran mayoría de los AcMo terapéuticos aprobados actualmente por la FDA son producidos en células de mamífero y consisten predominantemente en inmunoglobulinas tipo G<sub>1</sub> humanizadas [Tabla 5] [57,116]. Nuestro modelo de estudio, el anticuerpo monoclonal contra la interleucina 8 (IL-8) es producido por células CHO deficientes en la enzima dihidrofolato reductasa [*dhfr*-] y también es un anticuerpo humanizado tipo IgG<sub>1</sub> de aproximadamente 150 kDa. Su función es neutralizar la actividad de la IL-8 humana; uniéndose a ella y evitando que se una a su receptor, inhibiendo la respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y la quimiotaxis de los mismos hacia el tejido afectado. Su aplicación terapéutica está enfocada al tratamiento de artritis reumatoide, psoriasis, fibrosis quística, mieloma múltiple, bronquitis crónica, asma enfermedad inflamatoria de Bowel y en terapia contra el cáncer, por mencionar algunas [13].

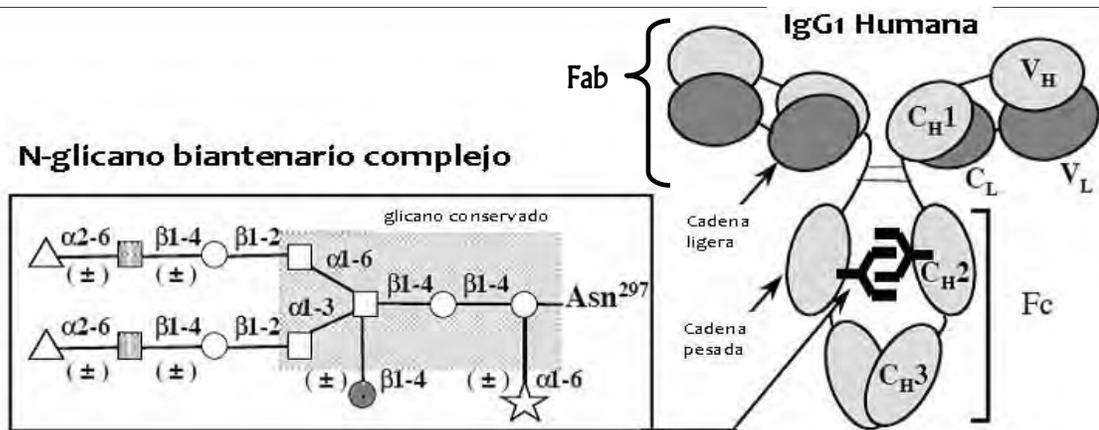
#### 2.4.1. Estructura y glicosilación de inmunoglobulinas humanas

Una inmunoglobulina tipo G (Figura 4) está formada por dos cadenas ligeras (LC) y dos cadenas pesadas (HC) compuestas de motivos estructurales repetitivos de aproximadamente 110 residuos de aminoácidos, cuya estructura terciaria define el dominio inmunoglobulina [60,62,110,116]. La cadena ligera y pesada se unen en asociaciones covalentes y no covalentes para formar 3 regiones independientes conectadas mediante una región denominada “bisagra”; dos de estas regiones, conocidas como regiones Fab, tienen una estructura idéntica entre sí y cada una contiene sitios de unión a antígenos específicos. La tercera región o fracción cristalizante (Fc) es la que establece las interacciones con los receptores que activarán diversos mecanismos celulares, como la citotoxicidad celular anticuerpo dependiente (ADCC) y de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) [60,62,63,116].

La región Fc es un homodímero formado por enlaces disulfuro entre 2 cadenas pesadas, cuyos dominios CH<sub>2</sub> contienen dos N-oligosacáridos biantenarios complejos unidos a la asparagina 297 y se ha determinado que tanto la proteína como los glicanos, ejercen una influencia recíproca en la conformación molecular, asimismo la ADCC y la CDC son extremadamente dependientes de la N-glicosilación [60,62]. Al analizar los oligosacáridos liberados de IgG policlonales humanas, se observaron al menos 12 estructuras neutras de glicanos unidas a la molécula y una carencia de estructuras sialiladas (<10%), -

entre las que predominan las estructuras sin galactosa [G0], con una galactosa [doblete GI] y totalmente galactosiladas [G2] [Figura 4] [45,60,62,63,110]. Por otra parte, se ha establecido que entre el 20 y 30% de las IgG además del sitio de N-glicosilación conservado en la Asn<sup>297</sup>, contienen un sitio de glicosilación en las regiones Fab, como resultado de alguna mutación somática durante la selección positiva de unión a antígeno [60-63].

La influencia de la glicosilación sobre la actividad del anticuerpo ha sido evidenciada al observar que aquellas IgG no galactosiladas son más sensibles a degradación proteolítica y son incapaces de activar la vía del complemento; mientras que las estructuras sialiladas son más resistentes a proteólisis pero reducen su afinidad por el receptor FcγR y por tanto su citotoxicidad [63]. También se ha demostrado que la ausencia de fucosa incrementa significativamente su unión al receptor de las células NK [natural killer] incrementando la ADCC [60]. Concretamente, en enfermedades como artritis reumatoide, la ausencia de galactosas terminales favorece la formación de agregados insolubles que provocan inflamación crónica [62].



**Figura 4. Estructura general de una IgG<sub>1</sub> humana y los N-glicanos asociados.** A la izquierda se muestra la estructura general de un anticuerpo y las regiones en que se divide, específicamente una IgG, del lado izquierdo se muestra la estructura de los glicanos unidos a cada dominio C<sub>H</sub>2 de la región Fc del anticuerpo, se puede observar que son N-glicanos de tipo complejo biantenararios. GlcNAc (○), Man (□), GlcNAc en bisección (●), Fuc (☆), Gal (■), ácido siálico (△). Adaptado de Satoh, et al. [2006] [116].

---

Como se mencionó anteriormente, estudios previos han demostrado un incremento en la productividad de proteínas recombinantes producidas en células CHO cultivadas en condiciones de hipotermia moderada (Tabla 2). Sin embargo, la fabricación de proteínas terapéuticas con un perfil de glicosilación reproducible y consistente sigue siendo un desafío considerable para la industria biofarmacéutica [136]. Por lo tanto, en este proyecto se estudió mediante PCR en tiempo real, el efecto de la hipotermia moderada (30 y 32°C) sobre la expresión de 14 genes codificantes para enzimas de las vías de N-glicosilación, empleando como proteína modelo un anticuerpo monoclonal contra la interleucina 8 producido en células CHO. Alternativamente, los cambios en el patrón de glicosilación podían atribuirse a la acción de exoglicosidasas extracelulares, por lo cual la actividad de éstas también fue determinada. Dichas aproximaciones brindaron un mejor entendimiento de la relación que existe entre el incremento de la productividad, los eventos moleculares que se desatan como consecuencia de la respuesta celular al estrés por frío y la calidad de la proteína recombinante; lo cual en conjunto proporciona información útil para un control racional del cultivo a favor de una mayor producción de la proteína de interés con calidad consistente, que a la larga podría ser implementada en la optimización de procesos industriales.

---

## 3. HIPÓTESIS

El incremento en la productividad de células CHO cultivadas en condiciones de hipotermia moderada es consecuencia de una mejora en la eficiencia metabólica y un aumento en la expresión del gen recombinante. Asimismo la hipotermia moderada provoca alteraciones en la expresión de los genes codificantes para enzimas de las vías de N-glicosilación y en la actividad de exoglicosidasas que podrían afectar el patrón de glicosilación de la proteína recombinante.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GENERAL

■ Estudiar el efecto de la hipotermia moderada sobre el metabolismo de células CHO, la producción de AcMo-IL8 recombinante como glicoproteína modelo, y sobre los niveles de transcripción de genes codificantes para enzimas que participan en las vías de N-glicosilación.

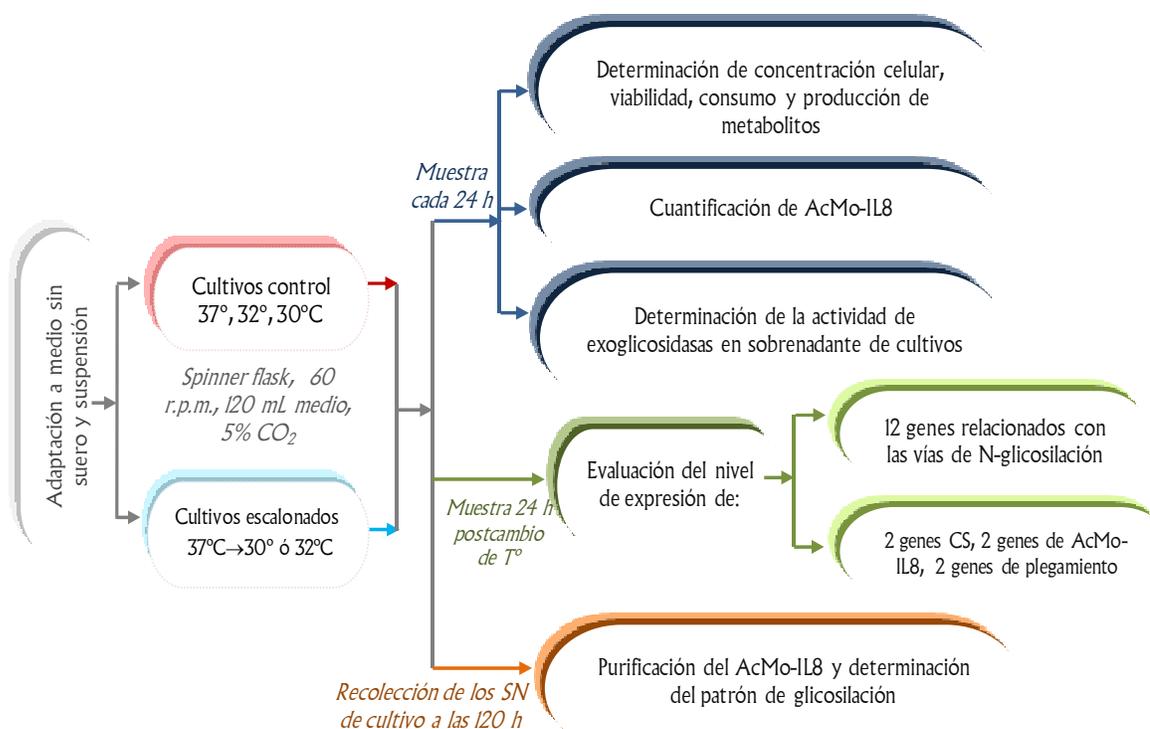
### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar la línea celular CHO-CRL12444 a crecer en suspensión y medio libre de suero.
- Determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos de los principales nutrientes y desechos metabólicos de células CHO cultivadas a 37°C [control] y en cultivos escalonados a 30° y 32°C.
- Determinar la productividad específica y volumétrica de AcMo-IL8 en dichos cultivos.
- Medir los niveles de transcripción de genes codificantes para diversas enzimas de las vías de N-glicosilación en los cultivos escalonados [30 y 32°C] y controles, así como el nivel de expresión de los genes codificantes para el AcMo-IL8, por qPCR.
- Medir la actividad de exoglicosidasas en el sobrenadante de los cultivos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El siguiente diagrama expone de manera breve y general el procedimiento experimental desarrollado:



**Figura 5. Esquema de la estrategia experimental.** Una vez que la línea celular CRL-12444 fue adaptada a crecer en medio sin suero y suspensión, se realizaron cultivos escalonados y controles a 37, 32 y 30°C en spinner flasks (120 mL de cultivo, 5% de CO<sub>2</sub>, 60r.p.m.). Cada 24 h se tomó muestra para caracterizar las cinéticas de crecimiento, determinar parámetros cinéticos y productividades específicas, así como medir la actividad de exoglicosidasas en el sobrenadante. Para el estudio transcripcional, se tomó muestra 24 h después del cambio de temperatura y a las 120 h se cosecharon 100 mL de sobrenadante de cada cultivo para realizar el análisis de glicosilación, sin embargo como se discute más adelante esta parte quedó inconclusa dada la baja productividad de la línea celular. El esquema señala los análisis realizados, los tiempos de muestreo para cada caso y las condiciones de cultivo. CS=choque frío (cold shock), T°=temperatura, SN=sobrenadante.

## 5.2. CULTIVO CELULAR

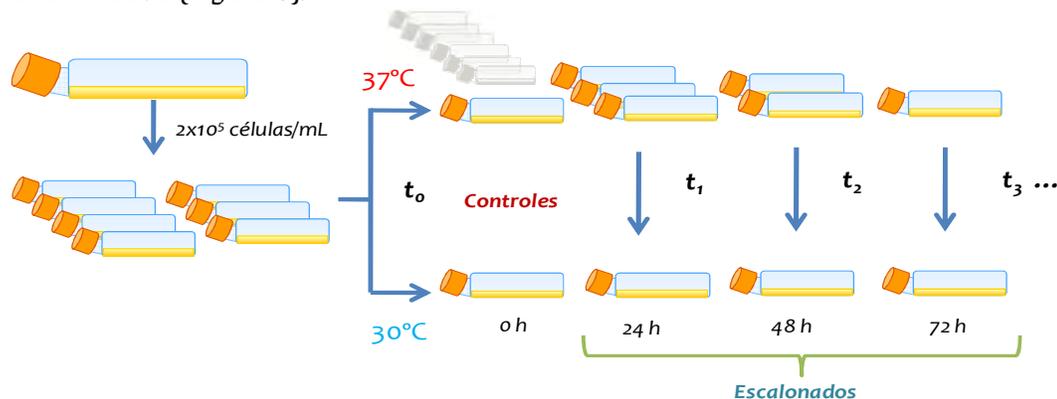
### 5.2.1. Cultivos adherentes y adaptación a medio sin suero

La línea celular recombinante CHO-CRL-12444, productora de un anticuerpo monoclonal humanizado contra la interleucina 8 (AcMo-IL8) fue obtenida de la American Type Cell Culture (ATCC) y cultivada en adherencia en frascos T-175, a 37°C y una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>, utilizando medio DMEM (ATCC No. 30-2002) suplementado con 10% suero bovino fetal (SFB), 200 nM de MTX (Sigma, St. Louis, MO, USA No. M8407), 2 µg/mL de insulina (Elli Lilly) y una solución de estreptomicina (0.1 mg/mL), y penicilina (100 U/mL) (Sigma, St. Louis, MO, USA No. A5955) a una concentración 1x. Las cinéticas de cultivos adherentes se realizaron en multicámaras de 6 pozos, inoculando con 1.2x10<sup>5</sup> células/mL y una viabilidad mínima del 90%.

La adaptación de la línea celular a crecer en medio libre de suero consistió en cosechar un cultivo adherente en fase exponencial y resembrarlo a 37°C y una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>, en medio CDM4-CHO (Hyclone) suplementado con 2.1 g/L de bicarbonato de sodio, 0.1 g/L de Pluronic F-68, 2 µg/mL de insulina, 200 nM de MTX, 6 mM de L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO, USA No. G1517), estreptomicina (0.1 mg/mL), y penicilina (100 U/mL), a una concentración de 4x10<sup>5</sup> células/mL (frascos T-25). Cada tercer día se registró la viabilidad y concentración celular, manteniendo esta última entre 2.5x10<sup>5</sup> y 4x10<sup>5</sup> células/mL. La adaptación se consideró exitosa si el cultivo presentaba una viabilidad mínima del 90% sostenida a lo largo de 3 semanas y ningún signo de contaminación. Los cultivos que cumplieron dichos parámetros fueron adaptados a crecer en suspensión sembrándolos en spinner flask a 60 r.p.m., bajo las mismas condiciones y criterios de selección. De este cultivo se generó un banco celular de 38 viales a una concentración de 7x10<sup>6</sup> células/mL y una viabilidad promedio de 93% por vial, utilizando como medio de congelación medio gastado y medio fresco en una relación 1:1 con 10% de DMSO (Sigma, St. Louis, MO, USA No. D2650).

## 5.2.2. Cultivos escalonados a temperaturas subfisiológicas

Para estandarizar los cultivos escalonados de 37° a 32° y 30°C, así como para determinar el tiempo óptimo de cambio de temperatura se realizó un barrido de tiempos de cambio del primero al quinto día de cultivo. A partir de un cultivo único en suspensión y fase exponencial, se sembraron 7 frascos T-75 (por cada temperatura subfisiológica) con  $2 \times 10^5$  células/mL en medio CDM4-CHO suplementado, al inocular (tiempo cero) uno de ellos se incubó a 30 ó 32°C y los otros 6 a 37°C, de tal forma que cada 24 horas se cambió un solo frasco de 37°C a 30 (ó 32°C), desde el primero hasta el quinto día. Por ejemplo, el cultivo con cambio a las 48 h corresponde a un frasco que pasó 48 h a 37°C, después de lo cual la temperatura se disminuyó a 30°C y se mantuvo así hasta el final del cultivo (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema del experimento para la determinación del tiempo óptimo de cambio de temperatura. Los cultivos fueron realizados, por duplicado en frascos T-25, a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en medio CDM4CHO suplementado.

A partir del experimento anterior y con base en la eficiencia del metabolismo ( $Y_{lac/glc}$ , sección 6.2.1) se determinó que el tiempo óptimo de cambio estaba entre las 48 y 72 h de cultivo. Por lo que se realizaron cultivos control (monotérmicos) a 37°, 32° y 30°C, y cultivos escalonados de 37°C a 32° y/o 30°C con cambio a las 48 y 72 h, en spinner flasks inoculados con  $2 \times 10^5$  células/mL, una viabilidad promedio  $\geq 90\%$ , 60 r.p.m., una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, y 120 mL de medio CDM4-CHO suplementado como se expuso en la sección anterior. Cada 24 h a partir de la inoculación (Figura 5) y hasta el final de los cultivos [se decidió parar los cultivos al alcanzar una viabilidad  $\geq 40\%$ ] se tomaron 2 muestras de sobrenadante: 600  $\mu$ L para determinar viabilidad y concentración celular, y 1mL

---

para determinación de metabolitos y cuantificación de producto. Ésta última muestra fue centrifugada a 600 r.p.m. por 10 min a 4°C y el sobrenadante recuperado se filtró por 0.22 µm, se adicionó inhibidor de proteasas, se realizaron alícuotas de 200 µL y se almacenaron a -70°C, para su análisis posterior. Todos los datos representan el promedio y la desviación estándar al menos de triplicados.

### **5.3. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS, CONCENTRACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR**

La concentración celular se determinó utilizando un Coulter Counter Multisizer II (Coulter Electronics, Hialeah, FL), la viabilidad celular se midió en un hematocitómetro mediante el método de exclusión con azul de tripano [115]. Glucosa, lactato, glutamina y glutamato, se determinaron empleando un analizador bioquímico YSI 2700 SELECT™ Biochemistry Analyzer (YSI Instruments, Yellow Springs, OH). La velocidad específica de crecimiento y de las velocidades de consumo y producción de metabolitos fueron determinadas con las ecuaciones descritas en el Apéndice A.

#### **5.3.1. Cuantificación de la proteína recombinante**

La concentración del AcMo-IL8 en los sobrenadantes de cultivo se determinó mediante ensayos de ELISA sandwich en placas de 96 pozos. Como anticuerpo de captura se utilizó un anticuerpo fosfatasa alcalina-anti FcIgG humana hecho en cabra (Sigma, St. Louis, MO, USA No. A9544) a una concentración de 15 µg/mL, se bloqueó con 10 mg/mL de BSA y para la detección se utilizó un conjugado peroxidasa-anti IgG humano hecho en cabra, que reconoce a la molécula completa (Sigma, St. Louis, MO, USA No. A8667) a una dilución de 1:2500. Se reveló con 0.4 mg/mL de o-fenilendiamina (OPD) (Sigma, St. Louis, MO, USA No. P9029) en buffer 0.1 M de fosfato dibásico de sodio pH 5 con 10 µL de peróxido de hidrógeno; la reacción se detuvo después de 10 min con 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. La curva de calibración se realizó con una IgG humana estándar (Sigma, St. Louis, MO, USA No. I4506) en un intervalo lineal entre los 5 y 800 ng/mL. Los sobrenadantes se incubaron directos para los primeros puntos de las cinéticas y diluidos 1:10 y 1:50 para los tiempos finales. Entre cada paso se realizaron 3 lavados con PBS-tween al 0.05% (0.14 mol/L NaCl, 0.003 mol/L KCl, 0.0015 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0.008 mol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en agua pura + 0.05% (v/v) Tween-20), la incubación con el anticuerpo de captura se realizó a 4°C por 16 a 18 h, el –

---

resto de las incubaciones se realizaron por 2 horas a temperatura ambiente. La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 490 nm, en un lector de placas ELx800 marca Bio Teck (BIO TECK INSTRUMENTS INC. World Headquarters, Winooski, USA).

La productividad específica de anticuerpo ( $q_p$ ) se determinó a partir de la pendiente de la curva de la concentración de AcMo (mg/L) en función de la integral de células viables en función del tiempo (células\*día/mL) [112], y la productividad volumétrica (PV) se calculó con el cociente de la concentración acumulada de producto entre el tiempo de cultivo correspondiente, tal como se detalla en el apéndice A.

## 5.4. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL

### 5.4.1. Selección de los genes de interés, diseño de oligonucleótidos

Mediante la técnica de q-PCR se evaluó el efecto de la disminución de la temperatura sobre la expresión de 14 genes relacionados con las vías de N-glicosilación, genes codificantes para la cadena ligera y pesada del AcMo-IL8, dos genes que codifican chaperonas del retículo endoplásmico, dos genes codificantes para proteínas de choque frío y 3 posibles genes de referencia [Tabla 6].

Los oligonucleótidos correspondientes fueron diseñados sobre las secuencias de ARNm de *Cricetulus griseus* (CHO), obtenidas del GeneBank [National Center for Biotechnology Information-NCBI] en una intersección de splicing exon-exon hipotética propuesta a partir del alineamiento contra las secuencias de rata y ratón [Clustal IW2© European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK]. La longitud de los oligonucleótidos fue entre 18 y 23 p.b. y generaron amplicones de entre 88 y 110 p.b. El diseño se realizó con el programa Primer Express® [Applied Biosystems, Foster City, CA] y sus propiedades ( $T_m$ , %GC, longitud, formación de horquillas, homo- y heterodímeros, compatibilidad) fueron comprobadas con los programas en línea OligoAnalyzer 3.1 [Integrated DNA Technologies, Inc., U.S.A.] y Oligo Explorer 1.2 [GeneLink Software Hawthorne, NY]. Todos los oligonucleótidos diseñados y empleados en el presente trabajo fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Una reacción de PCR convencional y geles de agarosa al 2% fueron utilizados para comprobar el diseño de los oligonucleótidos.

**Tabla 6.** Oligonucleótidos diseñados para realizar el análisis transcripcional

Función	Proteína	Acceso a Genebank		Secuencias oligonucleótidos (5'-3')	%Ef
Síntesis de precursores lipídicos	UGPase	AF004368.1	F: R:	ATTGACATCCCCCTGGAG GTATCCGGCAGCGCTTATCT	99.5
	DPM1	AFI21895.1	F: R:	GGGACAAGAGAAGTTGCCGA TTCCAAGGCCGAGCTTTTT	104
	DPM2	Q9Z1PI	F: R:	AAGTGGTGGGATTTGGCCTC TGGCTGTCAATGAAGGGCA	103
	UDP-NAGT	U09453.1	F: R:	TCTGCTTCATCCCTTTCCCC GCACCTATCAGGGCCACAAA	96.3
Glicosil-transferasas	GlcNAc-T I	U65791	F: R:	GCATTTCCCCATCATTGTCAG CCGGATGTGTGTGACTGCAC	99.7
	GlcNAc-T II V1 ‡	NM_008105	F: R:	CACCAAACGCATCCTGGAC TGGACGTAGTGACCATGGCA	NA
	GlcNAc-T II V2 ‡	NM_023887	F: R:	CGATGAGCATTCTGGGTGAC AGCTCTGAGGTTACCCGTCCA	NA
	GlcNAc-T III ‡	NM_028087	F: R:	CGAGGAATTGCACCGTATGG TGGTTTGAAGCAAACACCACC	NA
	β1,4-Gal transferasa I	AF318896.1	F: R:	TGCGCTTTGATGGTTTGAAC GTCCCGATGTCCACTGTGATT	100.5
	Fuc-6B transferasa	AF090449	F: R:	TGTGGTTCAGCCTGGAGTCA GAGTCGCTGCGATAGGACATG	NA
	α2,3 Sial transferasa	AY266675.1	F: R:	GAACAGCCCATCTTCCTCCA CTTCACTCCCTTTGGTCCA	94.9
Transportadores	GDP-FucT	AB222037	F: R:	CTGCTGCTCAAACAGACCACTT GCTCCCTCTGGTCTATACCCAG	95.3
	UDP-GalT	AF299335.1	F: R:	CACCGCAGCTGTCTTCTCG AATTCCAGCAGCTACGAACCC	100.4
	CMP-SialT	Y12074.1	F: R:	TCTGGTTTGTGATCTTCTTGCT GCTGAGAAGCCTTTCATGATGTT	100
Glicosidasas	Sialidasa	U06143.1	F: R:	CAAGACGGATGAGCATGCAG CACCTCCTCAGTTGCCACT	104
	Galactosidasa*	m:NM009752 r:NM001108192	F: Rm: Rr:	CACCTTTTACGTGGGCAACTTC CCTTGGACCACCCAGGAAA CCTTGGCCCATCCGGGAAA	95.5
	Manosidasa	DQ825405	F: R:	TCTTTCAACGAGTGGCATGAAG ATGAGGCCGTAATCCAGATATAC	100
	α-glucosidasa I	ABI15503	F: R:	TTGCTACCCTACTTAATCCAAA CCAGGTGCCGCTCTGATG	98.1
AcMo-IL8	Cadena ligera (LC)	N/A	F: R:	TGCTTCTGTTGTGTGCCTGC GGAGTTACCCGATTGGAGGG	102
	Cadena pesada (HC)	N/A	F: R:	CTACTCCCTCAGCAGCGTGG GGTGTGCTGGGCTTGTGAT	100

N/A= No aplica, m: ratón, r: rata, ‡ diseño sobre secuencia de ratón por no estar disponibles las de CHO, \*diseño sobre secuencias de rata y ratón, mezcla de oligos antisentido; %Ef= eficiencia de amplificación en la qPCR. Los genes sombreados en la tabla corresponden a los genes que no se pudieron amplificar (ver texto).

**Tabla 6.** Oligonucleótidos diseñados para realizar el análisis transcripcional (Continuación)

Función	Proteína	Acceso a Genbank	Secuencias oligonucleótidos (5'-3')	%Ef
Retículo Endoplásmico	GRP78	M17169	F: CGCGTGGAGATCATAGCCA R: CATCGCCAATCAGACGCTC	96.3
	PDI	AF364317	F: GAGGCTTGCCCCTGAGTATG R: GGTGTTTGTGTTGGCAGTGC	100
Choque frío	CIRP	AY359860	F: AGTGAGCACCTTGTCACCA R: AAAGTCTGGTCACGAGGCCA	95.3
	RBM3 ‡	AY052560	F: ATGARCAGGCCACTTGAAGACC R: CCCCAGGATCTTTGAGTCTC	99.1
Genes de referencia	β-actina	U20114.1	F: AGCTGAGAGGGAAATTGTGCG R: AGGAAGAGGATGCAGCAGTG	99.7
	GADPH	X52123.1	F: AGAAGGTGGTGAAGCAGGCAT R: AGGTCCACCACTCTGTTGCTGT	NA
	β-tubulina	U08342	F: CCTCCCCCGTCTCCACTTC R: AGCTCGGGCACGGTGAGGGC	88
	Ubiquitina	X08013.1	F: GGAGCTCCTTGCCTTAGGTG R: GATTTGCATTTTGACCTGTTAACG	92.8

N/A= No aplica, ‡ diseño sobre secuencia de ratón por no estar disponibles las de CHO, %Ef= eficiencia de amplificación en la qPCR. Los genes sombreados en la tabla corresponden a los genes que no se pudieron amplificar (ver texto), incluso modificando las condiciones de reacción.

#### 5.4.2. Extracción, limpieza, cuantificación e integridad de ARN total, síntesis de ADNc

A las 72 y 96 h de cultivo,  $2 \times 10^6$  células totales fueron colectadas tanto de los cultivos escalonados como de los controles; a partir de estas muestras se extrajo el ARN total utilizando el kit RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo al protocolo del fabricante. La elución del ARN de la columna se realizó en dos etapas (primero con 20  $\mu$ L de agua libre de RNAsas y después con 30  $\mu$ L de agua + 10  $\mu$ L del primer eluido) y a cada muestra se le adicionó 0.1  $\mu$ L de inhibidor de RNAsas. Posteriormente las muestras fueron sometidas al tratamiento con DNasa-I usando el kit Turbo-DNase™ free (DNase Treatment & Removal Reagents, Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX) en reacciones de 57  $\mu$ L con una concentración promedio de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L de ARN total, ajustando el volumen de los reactivos de la siguiente forma:

Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Reactivo
0.2	Inhibidor de RNasas (RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor)
5.7	Buffer de la enzima 10x
50	ARN total
1.14	Turbo-DNasa I™ (2 U/ $\mu\text{L}$ )
<b>57.04</b>	<b>Total</b>

Las reacciones fueron incubadas a 37°C por 30 min, se adicionaron 0.2 volúmenes del reactivo DNase Inactivation Reagent (11.4  $\mu\text{L}$ ), se resuspendió 3 veces con vórtex y se incubó 2 min a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó a 12000 r.p.m. por 1.5 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante (mínimo 55  $\mu\text{L}$ ). Una vez “limpio” el ARN, se separó una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  que sirvió para comprobar la integridad del ARN y cuantificarlo, el resto se guardó a -70°C para sintetizar el ADNc a más tardar 36 h después de la extracción para evitar su degradación.

La concentración del ARN total se determinó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA) y confirmada usando el kit Quant-it RiboGreen® RNA reagent and assay kit (Molecular Probes, Eugene, OR), siguiendo el protocolo para el ensayo de amplio rango (reacciones de 2 mL). En la curva estándar se incluyeron 2 concentraciones intermedias (300 y 750 ng/mL) conservando el intervalo lineal de 20 a 1000 ng/mL, las muestras de ARN se diluyeron 1:4000. La fluorescencia se registró usando un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (Perkin Elmer Instruments, Fremont, CA) a una longitud de excitación de 480 nm y una de emisión de 525 nm. La integridad y pureza del ARN se determinó con la relación 260/280 y corriendo 5  $\mu\text{g}$  de ARN en geles de agarosa al 1.5% (preparado con agua libre de RNasas, buffer TBE 1x y 1 mg/mL de bromuro de etidio) a 100 V por 25 min.

El ADN complementario (ADNc) fue sintetizado a partir de 5  $\mu\text{g}$  de ARN total, utilizando el Oligo (dT)<sub>18</sub> del kit RevertAid™ Minus H First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas Life Science, Maryland, US) de acuerdo al protocolo del fabricante. Dicho kit emplea una transcriptasa reversa modificada genéticamente de *Moloney Murine Leukemia Virus* (RevertAid™ M-MuLV RT 200 U/ $\mu\text{L}$ , Fermentas) con baja actividad de RNasa H. Se obtuvieron al menos 3 reacciones de 20  $\mu\text{L}$  por cada ARN total procesado, cada –

alícuota fue cuantificada midiendo la absorbancia a 260-280 nm usando el NanoDropND-1000 (Thermo Scientific, Whaltam, MA).

### 5.4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo Real (qPCR)

#### 5.4.3.1. Estandarización de las condiciones de reacción

La concentración de ADNc en la mezcla maestra se definió realizando un ensayo de qPCR a diferentes concentraciones: 10, 25, 50, 75, 100 ng/ $\mu$ L para cada temperatura control (37, 32 y 30°C) y probando 3 de los genes de referencia propuestos. A partir de este experimento cada muestra de ADNc fue diluida hasta 50 ng/ $\mu$ L y la concentración comprobada midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en NanoDrop ND-1000. La temperatura de alineamiento (Ta) se estableció en 64°C, pues se observó que las temperaturas de fusión (Tm) de todos los oligos oscilaban entre los 64 y 70°C. Las condiciones de reacción anteriormente establecidas fueron comprobadas por PCR convencional y geles de agarosa al 2% (presencia de amplicón).

Las concentraciones de oligonucleótidos fueron optimizadas mediante un ensayo de qPCR denominado *matriz de primers* que consistió en combinar 3 concentraciones distintas de oligonucleótido sentido y antisentido (Tabla 7) hasta encontrar una combinación que permitiera disminuir o incluso eliminar, la amplificación de productos no específicos durante la reacción. Lo anterior se evaluó analizando de la curva de disociación para cada caso y del control correspondiente sin templado de ADNc (NTC). La mayoría de las mezclas de oligonucleótidos (200  $\mu$ L) se prepararon en una proporción equimolar de 420 nM (F/R), únicamente los genes codificantes para las siguientes proteínas, se utilizaron en una proporción 300/600 nM (F/R):  $\beta$ -actina,  $\beta$ -tubulina, ubiquitina, DPM2, CMPSAT y GDPFucT.

**Tabla 7.** Matriz de primers empleada para optimizar la concentración de oligonucleótidos

<i>nM</i>	Sentido [F]		
Antisentido [R]	900/900	600/900	300/900
	900/600	600/600	300/600
	900/300	600/300	300/300

---

Para determinar cuál o cuáles serían los genes de referencia a utilizar se realizaron *ensayos de estabilidad* para cada gen; estos ensayos consistieron en observar como variaba el valor del ciclo de cuantificación ( $C_q$ ) a través de los diferentes tiempos de toma de muestra y condiciones de cultivo. El valor de  $C_q$  fue graficado en función de los tratamientos, aquellos que tuvieron la menor variación fueron elegidos como genes potenciales de referencia. La variabilidad en la expresión de 3 genes propuestos fue evaluada mediante los programas informáticos geNorm [135], NormFinder [6] y Bestkeeper [105], utilizando los valores de  $C_q$  obtenidos en el ensayo de estabilidad antes descrito. Con base en los resultados obtenidos se estableció que el mejor gen de referencia era el gen codificante para  $\beta$ -actina (*Actb*).

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en multicámaras de 96 pozos (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Foster City, CA), en un termociclador ABI PRISM 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Cada reacción utilizó 50 ng de ADNc como templado, 420 nM de oligonucleótido sentido y antisentido (salvo los genes antes indicados) y 1x de la mezcla de reacción y del fluoróforo no específico SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) en un volumen total de reacción de 12  $\mu$ L. Por cada gen analizado se incluyó un control sin templado de ADNc (NTC). Las condiciones de amplificación consistieron en un paso inicial de 2 min a 50°C, el paso de desnaturalización de 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 s y 64°C por 1 min, y como paso de disociación al final de la qPCR, 15 s a 95°C, 1 min a 64°C, 15 s a 99°C y 15 s a 60°C. La especificidad de las reacciones de amplificación fue confirmada en línea, analizando la curva de disociación.

La adquisición y el análisis de datos se realizaron mediante el programa SDS software (Applied Biosystems, Foster City, CA). La línea base y el umbral ( $T_h$ ) se ajustaron individualmente para cada gen dentro de una región donde la amplificación fue exponencial; el ciclo de cuantificación ( $C_q$ ) fue determinado por el método del punto de ajuste [104]. Todos los ensayos de qPCR fueron realizados al menos por triplicado (en replicas idénticas y en replicas experimentales), salvo aquellos casos en que se indique lo contrario.

#### 5.4.3.2. Eficiencia de amplificación, intervalo dinámico y validación del método de cuantificación relativa

La eficiencia de amplificación para cada gen fue determinada construyendo una curva estándar a partir de diluciones seriales de una mezcla de ADNc (1:2 y 1:4), que comprendió un intervalo de 0.09 a 100 ng; cada dilución fue analizada por triplicado y se emplearon las condiciones experimentales antes descritas. El pool de ADNc se obtuvo mezclando muestras provenientes de los diferentes cultivos, tiempos de colecta de muestra y experimentos individuales, su concentración fue determinada por espectrometría a 260 y 280 nm. Con los datos obtenidos se graficó el ciclo de cuantificación ( $C_q$ ) en función del logaritmo de la concentración de ADNc (ng) y la eficiencia de amplificación (E) se calculó realizando un ajuste de mínimos cuadrados y usando la ecuación descrita por Schwarz, et al. (2004) (Apéndice A). Esta curva también permitió definir el intervalo dinámico de concentraciones para cada gen, definido como la fase cuantitativa y detectable de la curva en la que se conserva la linealidad. La concentración intermedia para el intervalo dinámico de todos los genes correspondió a 50 ng/ $\mu$ L y confirmó que los genes de referencia seleccionados con anterioridad tuvieran una eficiencia de amplificación cercana a la de los genes de estudio.

Para validar el método de cuantificación relativa de doble delta  $C_q$  se determinó la variación de  $\Delta C_q$  respecto a la dilución del templado. Con los datos de la curva estándar se calculó  $\Delta C_q$  para cada gen problema y cada gen de referencia (Apéndice A) y se graficó en función del logaritmo base diez de la cantidad de ADNc. Sólo si la pendiente de la curva era menor a 0.1, se consideraba que la eficiencia del ambos amplicones era aproximadamente igual, de lo contrario el método no podía ser aplicado para el par de genes en cuestión.

#### 5.4.3.3. Cuantificación relativa: método del doble delta $C_q$

Los cambios en los niveles de expresión se evaluaron usando el método del doble delta  $C_q$  descrito por Livak y Schmittgen (2001), con el cual se realizó una cuantificación relativa al gen codificante para  $\beta$ -actina, utilizando las fórmulas descritas en el Apéndice A. Los niveles normalizados de transcripción se expresaron como la relación del aumento o disminución de los cultivos a baja temperatura (control y escalonados) respecto al control

---

a 37°C (nivel de expresión asignado de 1). Una prueba-t de dos colas fue realizada para determinar si los cambios en la expresión normalizada de los genes eran significativos, estableciendo un valor mínimo de cambio de 1.35 veces con un valor de significancia  $p \leq 0.05$ .

### 5.5. ACTIVIDAD DE EXOGLICOSIDASAS EXTRACELULARES

Los siguientes sustratos (todos de Sigma, St. Louis, MO) fueron empleados para medir la actividad de: sialidasa, 2'(4-metilumbiliferril)- $\alpha$ -D-ácido N-acetilneuramínico (M8639);  $\beta$ -galactosidasa, 4-metilumbiliferril- $\beta$ -D-galactósido (M1633);  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa, 4-metilumbiliferril- $\beta$ -D-N-acetilglucosamínido (M2133) y para la  $\alpha$ -manosidasa, 4-metilumbiliferril- $\alpha$ -D-manopiranosido (M3657). Todos los sustratos fueron resuspendidos en dimetilformamida (Sigma, 270547) y diluidos en buffer de acetato de sodio/HCl 100 mM (pH 6.0).

La actividad extracelular de cuatro exoglicosidasas fue determinada cada 24 h incubando por 1 h a la temperatura y forma en la que se realizó cada cultivo (37°, 32° ó 30°C), 10  $\mu$ L de sobrenadante clarificado (diluido 10x) en 90  $\mu$ L del sustrato artificial correspondiente (1.1 mM); la reacción se detuvo adicionando 900  $\mu$ L de buffer 0.2 M de glicina/NaOH (pH 10.5, filtrado por 0.22  $\mu$ m). Los controles consistieron en sobrenadante sin sustrato, sustratos sin sobrenadante y blancos de cada uno de los buffers. La fluorescencia fue registrada usando un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (Perkin Elmer Instruments, Fremont, CA) a una longitud de excitación de 362 nm y una de emisión de 450 nm, con la apertura de slít de 5 nm para ambos casos. La actividad enzimática fue calculada por interpolación de la fluorescencia de las muestras en una curva estándar de 4-metilumbiliferrona (4-MU) en un intervalo de 10 a 100 nM, y se reportó en Unidades/mL, donde 1 Unidad se definió como la cantidad de enzima requerida para catalizar la liberación de 1  $\mu$ mol de 4-MU del respectivo sustrato por minuto a pH 6.0.

Para comparar la cantidad de exoglicosidasas producidas en los cultivos a baja temperatura (controles y escalonados), las reacciones fueron incubadas a 37°C y la actividad se expresó como el cociente de la actividad registrada en cada cultivo, respecto a la actividad registrada en el cultivo a 37°C [actividad normalizada]. Todos los datos representan el promedio y la desviación estándar de triplicados experimentales.

## 5.6. PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL ACMo-IL8

La identidad del anticuerpo en las muestras del cultivo y fracciones de purificación fue confirmada por SDS-PAGE en geles al 12% de acrilamida (duplicados), cargados con 10-12  $\mu\text{L}$  de cada muestra y corridos a 20 mA constantes por 1.5 h. Uno de los geles fue transferido a una membrana de nitrocelulosa [250 mA por 1.5 h] para detectar por Western Blot la presencia del AcMo-IL8 producido; utilizando ya sea un conjugado fosfatasa alcalina-anti FcIgG humana [Sigma, St. Louis, MO, USA No. A9544] diluido 1:20 000 y el kit de revelado BCIP/NBT de Zymed Laboratories; o un conjugado peroxidasa-anti IgG humana diluido 1:8000 y revelado con 1 mL de TMB [3,3',5,5'-tetrametilbenzidina] Single Solution for Immunoblotting [Zymed, Invitrogen, Carlsbad, USA]. A manera de prueba rápida, la identidad del AcMo en las fracciones de purificación fue verificada mediante dot blot, utilizando los mismos conjugados diluidos 1:10 000 y 1:8000, respectivamente. El otro gel fue teñido con Azul de Coomassie o con sales de plata como lo describen Winkler et al., [2007] [139].

El tiempo de cosecha se estableció con base en la viabilidad (>80%), la concentración celular ( $1 \times 10^6$  células/mL), la producción de AcMo (>4mg/L) y la actividad de exoglicosidasas extracelulares. A las 168 h, 100 mL de cultivo se centrifugaron a 4000 r.p.m por 15 min y 4°C [sacrificando cultivos gemelos de las cinéticas realizadas para cada temperatura]; el sobrenadante fue recuperado, filtrado por 0.22  $\mu\text{m}$  y guardado a -70°C. Las muestras fueron concentradas por ultrafiltración en centricones de 100 kDa de 20 mL [Centricon Plus-20, Amicon Bioseparations] hasta 1 mL y se estabilizaron adicionando 4 mL de buffer de unión [20 mM fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, 0.05% azida de sodio pH 7.5].

La purificación del AcMo-IL8, se realizó mediante cromatografía de afinidad cargando 5 mL de muestra en una columna de sefarosa-proteína A: HiTrap Protein A HP de 1 mL [Amersham Pharmacia Biotech]. La elusión se realizó en un solo paso a 0.5 mL/min bajo condiciones ácidas [Buffer de elusión: 0.1 M glicina-HCl pH 2.7], utilizando un Äktaprime plus [GE Healthcare Life Sciences]. Las fracciones recuperadas fueron desaladas por filtración en centricones de 30 o 10 kDa [Centricon Plus-2, Amicon Bioseparations] y resuspendidas en agua MilliQ estéril hasta 400  $\mu\text{L}$ . La identidad y pureza del AcMo purificado se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot, la concentración fue determinada midiendo la absorbancia a 280 nm utilizando el NanoDrop ND-1000, usando un coeficiente de extinción molar de 14, y confirmada por ELISA sandwich. Las muestras se guardaron a -70°C para realizar

---

posteriormente el análisis de glicosilación.

### 5.7. ANÁLISIS DE GLICOSILACIÓN

Cien microgramos del AcMo-IL8 purificado se secaron en un evaporador centrífugo SpeedVac Plus SC110 A SAVANT (Thermo Scientific, Waltham, MA) y resuspendidos en 32  $\mu$ L de agua MilliQ. La muestra fue desnaturalizada en condiciones reductoras con 2% SDS y 1 M de  $\beta$ -mercaptoetanol y los N-glicanos fueron liberados por la hidrólisis enzimática con 1 U de PNGasa F de *Chryseobacterium meningosepticum* (Calbiochem, San Diego, CA), incubando a 37°C por 18 h. Posteriormente las muestras se centrifugaron 2 min a 1000 rpm para precipitar la proteína, se recuperó el sobrenadante donde quedan los glicanos y se agregaron 5 nmoles de maltosa a cada muestra como control interno.

Los oligosacáridos obtenidos se marcaron con 2-aminobenzamida [2AB] (Glyko, San Leandro, CA) siguiendo el protocolo del fabricante y se separaron por HPLC con una columna TSk-GEL Amido 80 (Tosoh Bioscience), utilizando un gradiente de acetonitrilo y 250 mM de formato de amonio pH 4.4 como se describe en Guile, et al. (1996). La detección de los glicanos se llevó a cabo en un detector de fluorescencia Waters 2475 (Waters Corporation, Milford, MA) con longitudes de onda de excitación y emisión de 330 y 420nm, respectivamente. Las unidades de glucosa se asignaron a los tiempos de elusión, utilizando un homopolímero estándar de glucosa (Glyko, San Leandro, CA), ajustando los datos del cromatograma estándar a una ecuación polinomial (Guile, et al., 1996). El cromatograma se integró usando el programa Millennium 32 (Waters corporation). La cantidad de glicanos se reporta como el porcentaje de la cantidad total detectada, excluyendo el área del pico de la maltosa (estándar interno). Los glicanos obtenidos de 5  $\mu$ g de anticuerpo purificado fueron digeridos con diferentes exoglicosidasas por 18 h a 37°C. Las exoglicosidasas usadas fueron: la  $\alpha$ -manosidasa (1.2U),  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa (50 mU),  $\beta$ -galactosidasa (1.2 mU), fucosidasa (20 mU) y sialidasa (12 mU) todas ellas de Prozyme (San Leandro, C.A.).

Las estructuras de glicanos fueron propuestas para cada pico con base en su tiempo de migración (convertido a unidades de glucosa) y a la susceptibilidad de digestión individual con las diferentes exoglicosidasas, como describe Guille et al., (1996) Las unidades de glucosa y estructuras propuestas fueron comparadas en diferentes bases de datos para glicanos disponibles en línea [Apéndice D].

---

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente sección está organizada en dos partes, la primera resume el comportamiento cinético y metabólico de células CHO cultivadas a 2 temperaturas subfisiológicas (30 y 32°C). La segunda, muestra la cuantificación de los niveles de expresión de genes relacionados con la vía de N-glicosilación y la actividad de exoglicosidasas extracelulares; en esta parte se incluye también la cuantificación de los niveles de expresión de genes codificantes para el AcMo-IL8, chaperonas del retículo endoplásmico y proteínas de choque frío. Cada sección es discutida en detalle y al final integrando los resultados obtenidos, se propuso una explicación al incremento de la productividad y se trató de entender como los cambios observados a nivel transcripcional en la vía de N-glicosilación, podrían reflejarse en el patrón de glicosilación del AcMo.

### 6.1. ADAPTACIÓN DE LOS CULTIVOS A CRECER EN SUSPENSIÓN Y MEDIO SIN SUERO

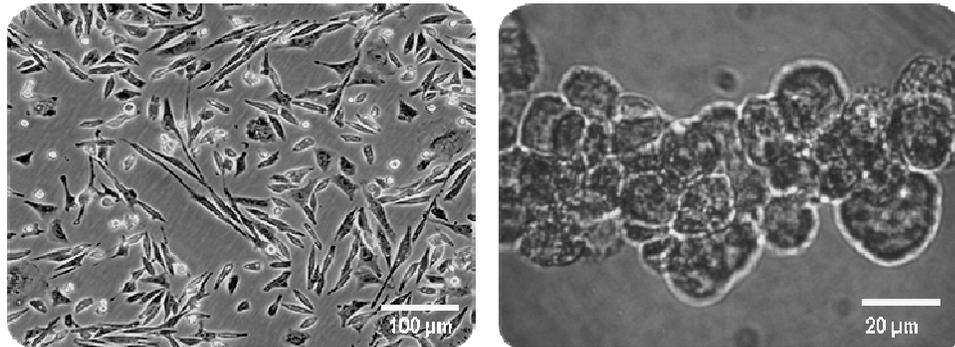
Como se mencionó anteriormente, por razones de seguridad biológica, en los últimos 20 años ha surgido un gran interés por desarrollar procesos libres de suero para células de mamífero [88]. Sin embargo, otra de las ventajas de este tipo de procesos consiste en la disminución en las etapas de purificación del producto, lo cual impacta directamente en los costos de producción. Así, con la finalidad de acercar (en lo posible) nuestro modelo experimental a las condiciones de un proceso productivo a gran escala<sup>1</sup>, la línea celular se adaptó a crecer en suspensión en medio libre de suero (sección 5.2.1). En la Figura 7 se muestra la morfología celular para cada tipo de cultivo.

Como se puede observar, la morfología de la línea celular cambió de fibroblastos adherentes (medio con suero DMEM/SBF) a células linfoblastoides en --

---

<sup>1</sup> Cabe aclarar que a pesar del creciente interés por cultivos en suspensión, en la industria farmacéutica existen procesos altamente productivos que utilizan cultivos adherentes de células de mamífero y/o emplean medios con suero.

suspensión [medio sin suero CDM4]. Para este último caso se observaron grandes agregados celulares y sólo cuando el cultivo alcanzó una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL, alrededor del 10% de la población se adhirió a la superficie del frasco formando pequeñas colonias de fibroblastos que fueron disgregadas sin la necesidad de tripsina. Se sabe que el suero provee una gran cantidad de cofactores que ayudan a las células a formar una matriz extracelular rica a la cual adherirse [98,124] por lo que en su ausencia la pérdida de la capacidad de adherencia ha sido documentada para diversas líneas celulares [29,124].

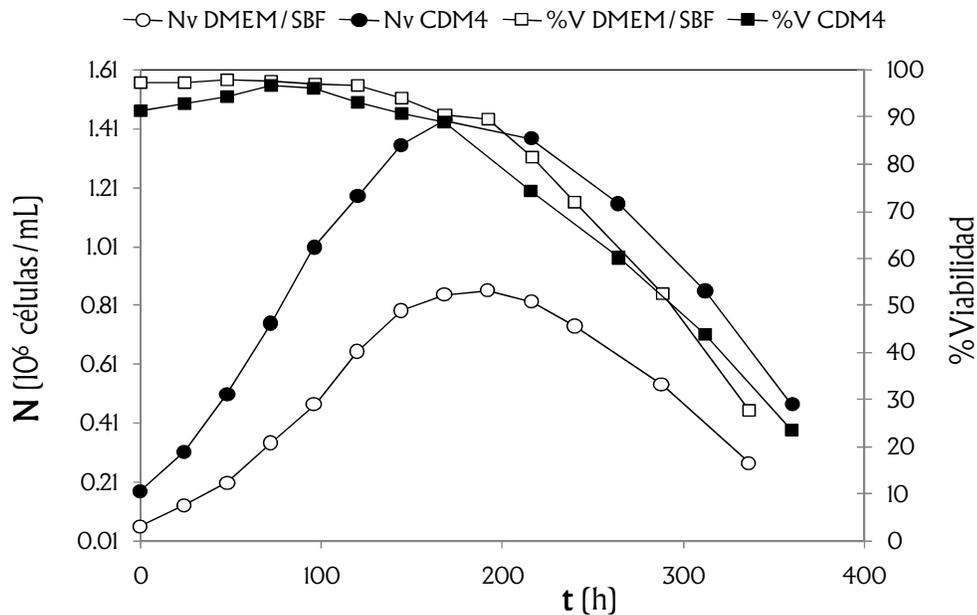


**Figura 7. Morfología de los cultivos de células CHO productoras de un AcMo-IL8.** Las células cultivadas en adherencia y medio DMEM suplementado con 10% suero bovino fetal (SFB) [200 nM MTX y 2 µg/mL de insulina] muestran una morfología fibroblastoide [izq]; sin embargo, las mismas células al ser cultivadas en medio CDM4-CHO libre de suero, [200 nM MTX y 2 µg/insulina] cambian su morfología a linfoblastoide y crecen en suspensión [derecha]. Imágenes tomadas con un microscopio de contraste de fases.

Con la finalidad de observar si el metabolismo había sido alterado después de completar el proceso de adaptación (retirar el suero y someter el cultivo a agitación), el comportamiento cinético de ambos cultivos fue evaluado a 37°C en medio con y sin suero. Los perfiles de crecimiento y viabilidad de ambos cultivos se muestran en la Figura 8. Como podemos observar, ambos cultivos tuvieron un comportamiento similar en el que la fase de crecimiento exponencial duró aproximadamente 168 h, después de la cual la viabilidad cayó drásticamente.

En la Tabla 8 se observa que los parámetros cinéticos y estequiométricos no fueron afectados significativamente durante el proceso de adaptación y las diferencias más relevantes correspondieron a una mayor acumulación de lactato (hasta 48 mM) y un aumento de 1.5 veces en la velocidad de producción de lactato en el cultivo con suero. Esto a su vez, pudo contribuir a la reducción en la viabilidad y la menor concentración celular en dicho cultivo, pues se ha reportado que aún en condiciones controladas –

de pH, las concentraciones entre 40 y 60 mM de lactato son tóxicas e inhiben el crecimiento de células CHO cultivadas a 37°C [4,5].



**Figura 8. Cinéticas de crecimiento de células CHO-AcMolL8 en medio con suero y sin suero.** Células CHO-AcMolL8 fueron cultivadas en adherencia en DMEM suplementado con suero bovino fetal, en multicámaras de 6 pozos (blanco) y en suspensión en medio CDM4 en frascos T-25 (negro). %V=Viabilidad (■), Nv= Concentración celular viable (●), DMEM/SBF: medio suplementado con suero, CDM4: medio libre de suero, SBF: suero bovino fetal.

A pesar de que la concentración inicial de glutamina en ambos medios de cultivo era la misma (4mM), la concentración inicial glucosa fue 40% menor y la de lactato 53% mayor en el cultivo en DMEM/SBF respecto al cultivo en CDM4; sugiriendo que la composición del medio fue modificada (p. ej. presencia de lactato y sustratos alternativos). Por lo tanto, en el cultivo en DMEM/SBF la disminución de la viabilidad celular después de las 200 h, la acumulación de lactato hasta niveles tóxicos (48 mM) y el cambio de pH (hasta 6.4) se atribuyen posiblemente a un efecto combinado de limitación de oxígeno y modificaciones en la composición del medio por la adición de suero. Mientras que en el cultivo en CDM4, la disminución de la viabilidad estuvo estrechamente relacionada con el agotamiento de la glutamina (Apéndice B), además de que la  $q_{\text{gln}}$  para este cultivo fue ligeramente superior respecto al medio con suero.

**Tabla 8.** Parámetros cinéticos y estequiométricos de la línea celular CHO-AcMoIL8 cultivada en adherencia y en suspensión

Cultivo	Con suero	Sin suero
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.021	0.022
$t_{dup}$ (h)	33	32
$X_{m\acute{a}x}$ (células/mL)	$8.3 \times 10^5$	$1.5 \times 10^6$
$Viab_{m\acute{a}x}$ (%)	97.8	96.6
$Y_{cell/glc}$ (célula/nmol)	63.3	63.4
$q_{glc}$ (nmol/10 <sup>6</sup> células*h)	335	359
$Y_{lac/cell}$ (nmol/célula)	0.055	0.035
$q_{lac}$ (nmol/10 <sup>6</sup> células*h)	1155	794
$Y_{lac/glc}$ (nmol <sub>lac</sub> /nmol <sub>glc</sub> )	3.5	2.2
$Y_{cell/gln}$ (célula/nmol)	459.8	477.2
$q_{gln}$ (nmol/10 <sup>6</sup> células*h)	42.6	47.9
$Y_{glu/cell}$ (pmol/célula)	0.87	0.8
$q_{glu}$ (pmol/10 <sup>6</sup> células*h)	19.2	18.4
$Y_{glu/gln}$ (nmo <sub>glu</sub> /nmo <sub>gln</sub> )	0.39	0.38

Estos resultados coinciden con lo observado por Serrato, et al. [2007] para hibridomas cultivados en medio DMEM/SBF y en medio CDM, dónde a pesar de que la velocidad específica de crecimiento es igual para ambos cultivos, la concentración celular viable es menor y la producción de lactato mayor para el cultivo suplementado con suero. Aunque los autores manejan que “las diferencias en los parámetros cinéticos y estequiométricos entre los tres medios de cultivo pueden no estar relacionados...con las diferencias en la concentración inicial de dichos nutrimentos” [120], nuestros resultados sugieren que si existe una correlación importante, particularmente en la producción de lactato.

## 6.2. EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE LA TEMPERATURA SOBRE EL METABOLISMO Y PRODUCTIVIDAD DE CULTIVOS ESCALONADOS

Dentro del intervalo de temperaturas estudiadas para células CHO (26 a 36°C), la menor temperatura a la que se ha reportado un incremento consistente en la productividad (específica, volumétrica o en ambas) es a 30°C, pues entre los 22 y 27°C el efecto es más variable, produciendo una disminución de hasta el 90% en el rendimiento de producto (Tabla 2) [84]. Por otra parte, Furukawa, et al. [1998] y Anh, et al. [2008] reportaron que células CHO cultivadas a 32°C presentan las mayores productividades respecto a otras temperaturas subfisiológicas [8,43]. Por lo tanto para determinar sí el

---

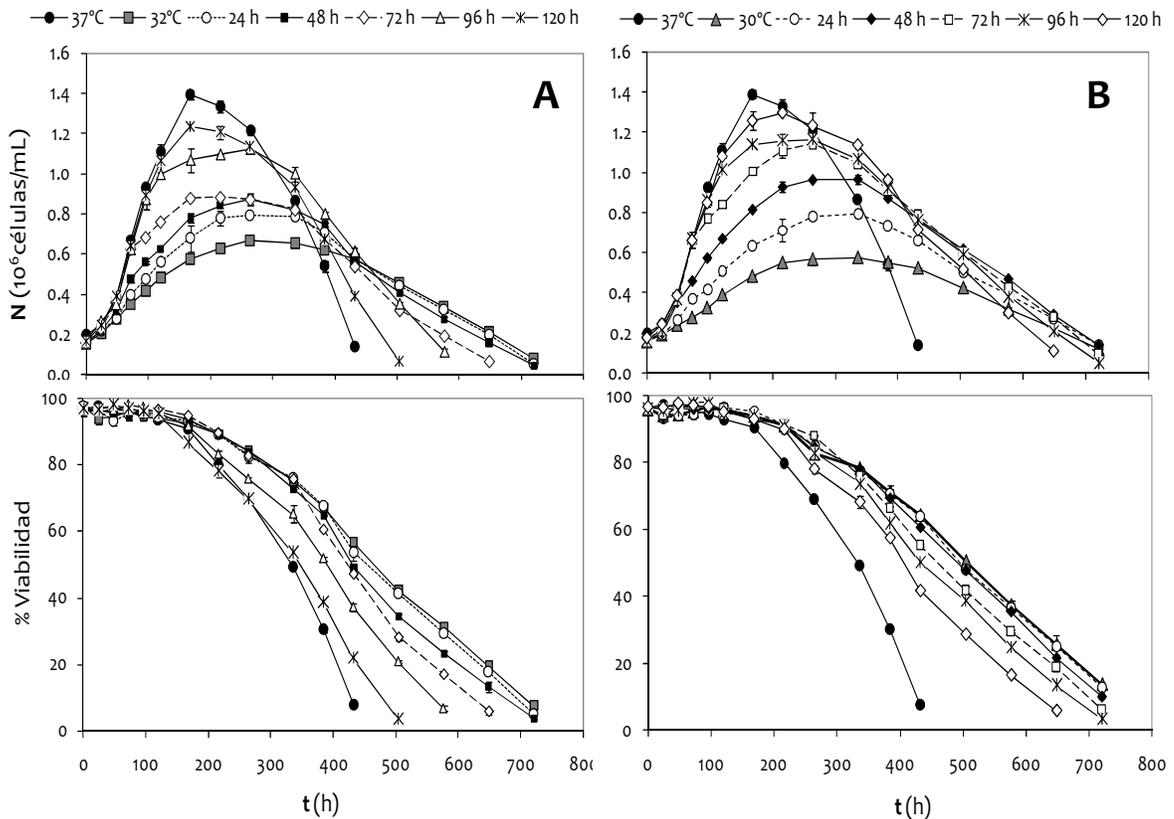
comportamiento cinético en una misma línea celular y proteína recombinante variaba a diferentes temperaturas subfisiológicas, se decidió trabajar con dos temperaturas 30 y 32°C.

### 6.2.1. Tiempo óptimo de cambio de temperatura

Más de la mitad de los estudios que evalúan el efecto de la temperatura sobre la productividad (Tabla 2) emplea una modalidad de cultivo monotérmico, mientras los estudios más recientes manejan una modalidad de cultivo escalonado, asumiendo la fase exponencial (entre las 48 y las 120 h) como la etapa más adecuada para realizar el cambio de temperatura [17,84,132,133]. Esta suposición se basa en el hecho de que la mayoría de los promotores empleados están asociados al crecimiento (CMV y SV40) y que en esta etapa del cultivo la viabilidad se mantiene arriba del 80%. No obstante, hasta el momento ningún reporte lo ha demostrado experimentalmente ni lo ha relacionado con la reducción del metabolismo. Por lo tanto, para determinar el tiempo óptimo de cambio de temperatura en los cultivos escalonados, se evaluaron diferentes cultivos con cambio desde el primero hasta el quinto día en frascos T-75, tal como se detalló en la sección 5.2.2 (Figura 6).

Los perfiles de crecimiento y viabilidad obtenidos se muestran en la Figura 9, donde podemos observar que los cultivos a 37°C alcanzaron la mitad de la fase de crecimiento exponencial a las 72 h y la máxima concentración viable a las 168 h, después de lo cual la viabilidad cayó drásticamente. El comportamiento de los cultivos a 30°C fue distinto respecto a los de 32°C; sin embargo para ambas temperaturas la caída de la viabilidad (<30%) se retrasó hasta por 1 semana y las densidades celulares máximas alcanzadas fueron menores que en el control a 37°C (2.4 y 2.1 veces). Por su parte, los cultivos con cambio a las 24 h se comportaron casi igual que los cultivos control a baja temperatura, mientras que el resto de los cultivos escalonados exhibieron dos etapas (Figura 9 y Figura 10), la primera antes del cambio de temperatura donde presentaron un comportamiento similar al control a 37°C, y la posterior al cambio, en la cual los perfiles de concentración celular, viabilidad, consumo y producción de metabolitos disminuyeron y se distribuyen entre el control a 37°C y el control a baja temperatura correspondiente (30° ó 32°C).

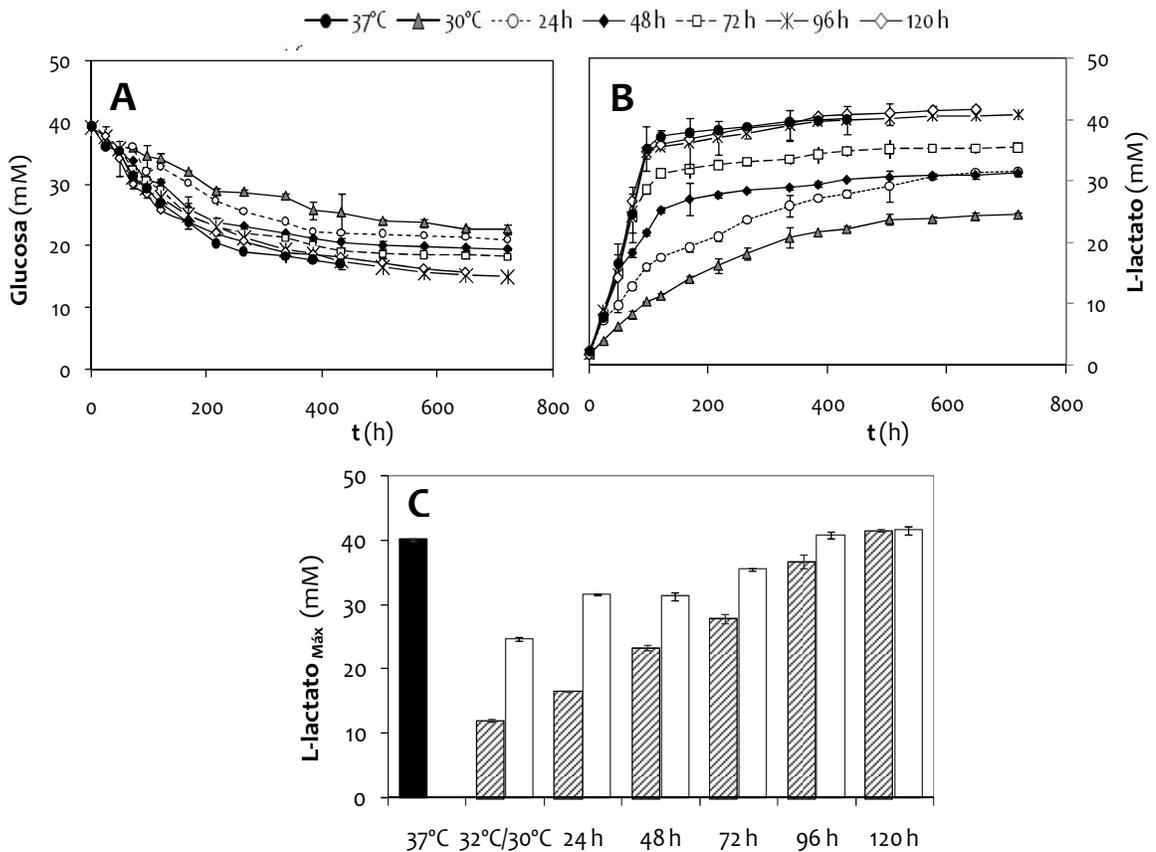
Dentro de las particularidades de cada temperatura se observó que la caída de la viabilidad se retrasó por casi dos semanas en los cultivos a 30°C, y de 3 días a 1 semana en los cultivos a 32°C. Por ejemplo a las 432 h, el cultivo a 37°C presentó una viabilidad -



**Figura 9. Cultivos escalonados de 37° a 32°C [A] y de 37° a 30°C [B].** En la parte superior se muestran los perfiles de crecimiento para los cultivos escalonados con cambio de temperatura del primer al quinto día y los respectivos controles a 37°, 32 y 30°C; en la parte inferior se muestran los perfiles de viabilidad con respecto al tiempo. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes y las barras representan el error estándar.

del 8%, mientras que los cultivos a 30°C y 32°C las viabilidades fueron de 64% y 57%, respectivamente. Para los cultivos escalonados, la caída de la viabilidad se retrasa en función de la temperatura y de manera inversamente proporcional al tiempo de cambio; así, el cultivo a 37°C alcanzó una viabilidad menor al 30% a las 384 h de cultivo, mientras que los cultivos escalonados con cambio a las 120 h a 30°C y 32°C alcanzaron dicha viabilidad después de 3 y 5 días, respectivamente. Entre las 168 y las 300 h de cultivo la viabilidad cayó por debajo del 80% para todos los casos y corresponde al momento en que cada cultivo había consumido más del 80% de la glutamina, menos del 50% de la glucosa disponible y se había producido alrededor del 85% del lactato final, sugiriendo que el inicio de los eventos de muerte celular, tanto a baja temperatura como a 37°C, están estrechamente relacionados con el agotamiento de glutamina.

En la Figura 10 [A y B] se muestran los perfiles de consumo de glucosa y producción de lactato para los cultivos a 30°C, como podemos observar hubo una disminución en la producción y el consumo de metabolitos, siendo más evidente en los cultivos escalonados con cambio entre las cero y las 72 h, mientras que los cultivos con cambio a las 96 y 120 h tuvieron un perfil de consumo/producción muy similar al de 37°C. Este comportamiento fue igual para glutamina y glutamato y consistente con lo observado para los cultivos a 32°C [datos no mostrados].



**Figura 10. Efecto de la disminución de la temperatura sobre el metabolismo.** En [A] se muestra el perfil de consumo de glucosa y en [B] el perfil de producción de lactato de los cultivos a 37°C y 30°C (escalonados y controles). En [C] se comparan las máximas concentraciones de lactato obtenidas en los cultivos escalonados y controles a 32°C (columnas rayadas) y 30°C (columnas blancas), respecto al cultivo a 37°C (negro). Las barras de error representan el error estándar de dos experimentos independientes.

Las concentraciones máximas de lactato fueron 39% y 70% menores para los controles a baja temperatura [a 30°C y 32°C respectivamente] e incrementaron proporcionalmente al tiempo de cambio; por ejemplo, el cultivo a 30°C terminó con 24.7 mM de lactato, el cultivo escalonado a 30°C con cambio a las 72 h con 35.5 mM y el de

---

las 120 h con 41.6 mM (Figura 10C). Aunque la tendencia fue similar para ambas temperaturas, los cultivos a 30°C acumularon más lactato (51%) respecto a los de 32°C, excepto para los cultivos escalonados a las 96 y 120 h, donde la concentración máxima de lactato fue similar e incluso mayor que el control a 37°C para ambas temperaturas. Cabe resaltar que ningún cultivo presentó concentraciones mayores a 42mM que pudieran resultar tóxicas para las células [4,5].

En la Tabla 9 se resumen los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos tanto para los cultivos control como para los cultivos escalonados. En ella se puede observar que los cultivos control a 32°C y 30°C presentaron una disminución de: 1.7 y 2.4 veces en la velocidad específica, 1.4 y 1.5 veces en la velocidad de consumo de glucosa, 3.2 y 4 veces en la velocidad de producción de lactato, de 1.7 en la velocidad de consumo de glutamina para ambas temperaturas y de 3.4 y 1.6 veces en la velocidad de producción de glutamato, respecto al cultivo a 37°C. Por otra parte, en los cultivos escalonados a ambas temperaturas la  $q_{glc}$  y la  $\mu$  disminuyeron de manera inversamente proporcional al tiempo de cambio, alcanzando el menor valor en los cultivos con cambio a las 96 y 120h debido principalmente a la senescencia y muerte del cultivo. También la  $q_{lac}$  y  $q_{gln}$  disminuyeron en general, en función del tiempo de cambio de temperatura pero sin una tendencia clara.

Una clara excepción fueron los cultivos con cambio a las 24 h, en los que la velocidad específica de crecimiento y las velocidades de consumo y producción de metabolitos son ligeramente mayores a la de los controles a baja temperatura, pero siempre menores respecto a 37°C (Tabla 9). Por el contrario, la velocidad de producción de glutamato presentó ligeras variaciones entre los cultivos control y escalonados, en consecuencia el rendimiento  $Y_{glu/gln}$  se incrementó para todos los cultivos escalonados y permaneció constante en los cultivos control.

Teóricamente un rendimiento de mol de lactato por mol de glucosa igual a 2 ( $Y_{lac/glc}$ ) implica que más del 90% de la glucosa consumida se desperdicia como lactato, mientras que una pequeña proporción entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) [93]. Por lo cual, dicho parámetro estequiométrico se consideró un indicador de la eficiencia del metabolismo. En general, los cultivos a 32°C presentaron un rendimiento  $Y_{lac/glc}$  entre 35 y 82% menor respecto al cultivo a 37°C, y los cultivos a 30°C entre 44 y 75% menor. Únicamente los cultivos escalonados a 32°C con cambio a partir de las 48 h, y los cultivos

**Tabla 9.** Parámetros cinéticos y estequiométricos determinados para los cultivos escalonados y control a 37°, 32° y 30°C en frascos T-75

Cultivo	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Glucosa		L-Lactato		$Y_{lac/glc}$	Glutamina		Glutamato		$Y_{glu/gln}$
		$Y_{xs}$ (células/nmol)	- $q_s$ (nmol/10 <sup>6</sup> ·cél·h)	$Y_{sx}$ (nmol/células)	$q_s$ (nmol/10 <sup>6</sup> ·cél·h)		$Y_{xs}$ (células/nmol)	- $q_s$ (nmol/10 <sup>6</sup> ·cél·h)	$Y_{sx}$ (pmol/células)	$q_s$ (nmol/10 <sup>6</sup> ·cél·h)	
37°C	0.017 ± 5.5E-05	72.94 ± 1.91	233.33 ± 687	0.038 ± 1.3E-04	649.99 ± 0.13	2.79	350.02 ± 6.01	48.61 ± 0.99	1.06 ± 0.01	17.98 ± 0.15	0.37
32°C	0.010 ± 3.5E-04	63.70 ± 4.86	164.27 ± 7.10	0.019 ± 7.5E-04	201.40 ± 4.09	1.23	350.92 ± 7.68	29.08 ± 0.64	1.04 ± 0.00	5.29 ± 7.48	0.36
24 h	0.011 ± 2.7E-04	62.00 ± 6.22	182.15 ± 13.9	0.029 ± 1.4E-03	329.29 ± 7.91	1.81	488.62 ± 5.57	22.64 ± 0.26	1.16 ± 0.06	11.84 ± 0.59	0.57
48 h	0.005 ± 3.5E-05	56.52 ± 0.10	88.61 ± 0.78	0.011 ± 6.9E-04	53.29 ± 3.82	0.61	482.56 ± 4.47	10.33 ± 0.10	1.47 ± 0.10	7.15 ± 0.98	0.71
72 h	0.004 ± 2.3E-04	49.01 ± 0.41	72.33 ± 4.09	0.018 ± 1.6E-03	63.54 ± 1.52	0.88	346.91 ± 21.5	14.39 ± 0.89	1.52 ± 0.36	15.53 ± 3.70	0.53
96 h	0.003 ± 8.9E-04	55.04 ± 1.31	59.09 ± 17.0	0.019 ± 5.1E-04	74.75 ± 3.39	1.02	277.0 ± 8.71	11.74 ± 0.33	1.28 ± 0.01	4.16 ± 0.07	0.47
120 h	0.003 ± 8.8E-04	54.35 ± 9.18	57.23 ± 6.49	0.009 ± 2.6E-04	27.47 ± 8.47	0.50	398.87 ± 6.49	11.83 ± 0.94	1.54 ± 0.37	15.74 ± 3.78	0.62
30°C	0.007 ± 7.4E-04	45.14 ± 1.05	158.96 ± 12.6	0.023 ± 1.5E-03	161.31 ± 5.87	1.02	229.29 ± 2.30	29.05 ± 0.29	1.60 ± 0.17	11.48 ± 1.12	0.37
24 h	0.007 ± 3.1E-04	33.18 ± 0.39	207.34 ± 6.94	0.046 ± 2.5E-03	313.74 ± 2.95	1.51	217.01 ± 2.28	50.97 ± 0.54	1.68 ± 0.20	17.10 ± 2.09	0.36
48 h	0.007 ± 3.5E-04	49.98 ± 0.85	138.06 ± 3.71	0.032 ± 1.1E-03	217.25 ± 3.37	1.57	426.34 ± 16.7	11.70 ± 0.46	1.62 ± 0.69	16.55 ± 7.07	0.69
72 h	0.004 ± 2.1E-04	38.57 ± 0.16	103.7 ± 3.33	0.027 ± 1.8E-05	109.39 ± 17.28	1.04	518.49 ± 16.9	9.62 ± 0.31	1.74 ± 0.27	17.75 ± 2.80	0.90
96 h	0.004 ± 7.1E-06	41.63 ± 2.48	96.08 ± 7.84	0.023 ± 1.0E-04	85.25 ± 0.21	0.95	414.51 ± 3.40	12.02 ± 0.10	1.31 ± 0.17	13.32 ± 1.73	0.54
120 h	0.002 ± 1.6E-05	40.53 ± 0.49	47.06 ± 0.18	0.017 ± 9.5E-04	32.58 ± 2.09	0.69	555.66 ± 62.8	9.03 ± 1.02	1.61 ± 0.39	9.63 ± 4.02	0.89

Se muestra el error estándar de dos experimentos independientes,  $cél$ = células, el signo negativo indica el consumo de un metabolito, los rendimientos de  $Y_{lac/glc}$  y  $Y_{glu/gln}$  tienen unidades de mol/mol, las filas sombreadas corresponden a los cultivos control.

---

a 30°C con cambio después de las 72 h, presentaron un rendimiento menor o igual a la unidad (Tabla 9).

En conjunto nuestros resultados evidencian que tanto en la fase exponencial temprana (0-24h) como en la tardía (96-168 h), el efecto de la temperatura sobre el metabolismo fue más bien adverso respecto al cultivo a 37°C. Probablemente debido a que durante las primeras 24 h, cuando las concentraciones celulares son bajas, los factores de crecimiento secretados por la población celular no son suficientes para inducir o sostener el crecimiento posterior al cambio, que podría resultar en un mal manejo de los recursos metabólicos (mayores  $Y_{lac/glc}$  y concentraciones de lactato respecto a los controles a baja temperatura). Dicha suposición se sustenta en el trabajo de Fox, et al. (2005), quienes al estudiar el efecto de la adición de diferentes mitógenos (bFGF, insulina y SBF) a células CHO-IFN $\gamma$ , observaron que los cultivos “fueron capaces de mantener un crecimiento activo a baja temperatura (32°C), resultando en una mayor concentración celular, sin sacrificar la productividad específica” [39].

Por otra parte, entre las 96 y 120 h cuando las células dejan de crecer, los eventos de muerte celular jugaron un papel más importante en la disminución del metabolismo respecto a la temperatura; probablemente provocando un aumento en la liberación de compuestos tóxicos al sobrenadante (proteasas, glicosidasas, lactato, restos celulares, etc. Shi, et al. (2005) evaluaron el retraso de la apoptosis a 37 y 30°C en cultivos de células CHO que producen una proteína de fusión Ac+IL2, y encontraron que a 37°C el inicio de la apoptosis comienza al segundo día de cultivo, mientras que “las células cultivadas a 30°C no mostraron un incremento significativo en la muerte celular por apoptosis” hasta después del sexto día [123]. Por otra parte, Moore et al. (1997) determinaron que en cultivos bifásicos a 30°C con cambio a las 48 h, el inicio de la apoptosis se retrasaba aproximadamente 4 días respecto a 37°C [90]. Es decir, entre más tiempo pasen las células a 37°C antes del cambio, el efecto positivo de la hipotermia será enmascarado por los procesos de senescencia y muerte celular [39].

Tomando como referencia los datos anteriores propusimos que el tiempo óptimo de cambio de temperatura tanto a 30° como a 32°C, estaba entre las 48 y 72 h, debido a que la caída de la viabilidad por debajo del 30% se retrasó entre 5 y 11 días respecto al cultivo a 37°C, las concentraciones celulares viables alcanzadas fueron superiores-

---

a las alcanzadas en los cultivos control a baja temperatura (cerca de  $1 \times 10^6$  células/mL) y el metabolismo celular en estos cultivos fue más eficiente puesto que se desperdició menos fuente de carbono en forma de lactato ( $Y_{lac/glc} \leq 1.5$ ) (Tabla 9); además de que las velocidades de consumo/producción de metabolitos se redujeron más de la mitad respecto al cultivo a  $37^\circ\text{C}$  (excepto la  $q_{glu}$ ).

En conjunto, estos resultados confirmaron que la mitad de la fase exponencial es el momento más adecuado para disminuir la temperatura en los cultivos escalonados, pues al parecer *el desempeño del cultivo al reducir la temperatura, depende de las condiciones en las que se encontraba la población celular en la etapa previa* [5]. Sin embargo, el parámetro más importante para optimizar un proceso es la productividad, por lo cual el siguiente paso fue evaluar el efecto de ambas temperaturas sobre la productividad específica y volumétrica, realizando únicamente cambios a las 48 y 72 h.

### 6.2.2. Cultivos escalonados en suspensión a $30$ y $32^\circ\text{C}$ : reducción del metabolismo

En la Figura 11 se muestran los perfiles de concentración y viabilidad respecto al tiempo para los cultivos realizados en spinner flask a  $30$  y  $32^\circ\text{C}$ . En general, el comportamiento fue similar al observado en los frascos T: el cultivo a  $37^\circ\text{C}$  alcanzó la máxima concentración viable a las 168 h, los cultivos escalonados presentaron dos etapas, se retrasó la caída de la viabilidad, hubo una disminución en los parámetros cinéticos en función del tiempo de cambio y temperatura empleada, y se confirmó que la caída de viabilidad ( $\%V < 35\%$ ) corresponde con el momento en el que se agota la glutamina. No obstante, las concentraciones celulares alcanzadas en los spinners fueron mayores respecto a las alcanzadas en los cultivos en frascos-T; este cambio fue más evidente para los cultivos a  $32^\circ\text{C}$  en spinners, donde la concentración celular máxima fue 20 a 37% mayor. Además, el cultivo a  $37^\circ\text{C}$  presentó una fase estacionaria de crecimiento de aproximadamente 3 días, que no se presentó en los cultivos en frasco.

Lo anterior se atribuyó a problemas de transferencia de masa, pues la agitación en el spinner probablemente mejoró la transferencia de oxígeno y de nutrientes. Aunque esto no fue estudiado metodológicamente, dicha mejora se reflejó en la concentración máxima viable de los cultivos a baja temperatura, en la que no hubo una --

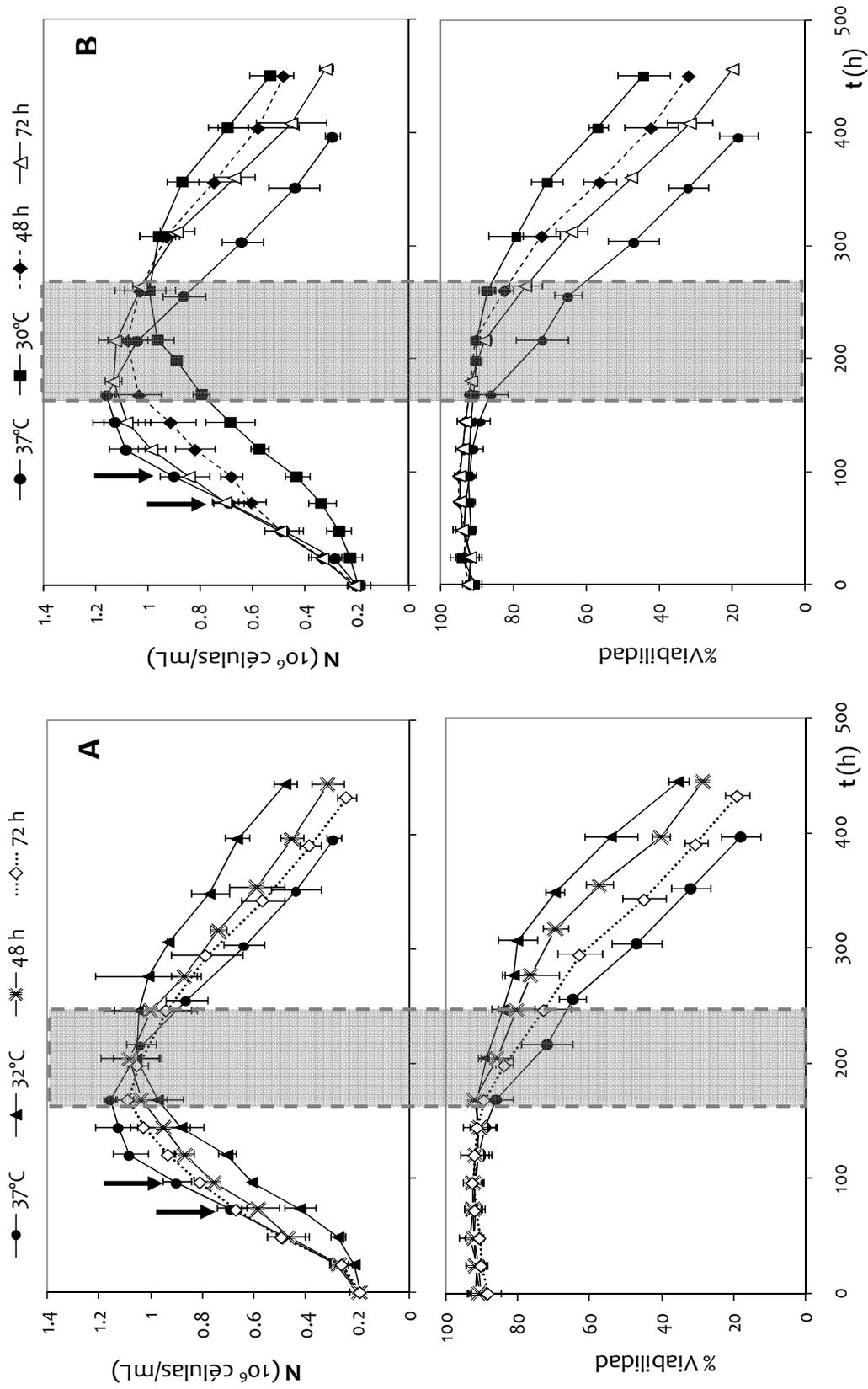
---

diferencia significativa respecto a 37°C, excepto para el control a 30°C donde la concentración fue 14% menor. Por otra parte, la mejoría en la transferencia de nutrimentos sólo se reflejó en los cultivos a 32°C, pues a 30°C (168 h) el consumo de glucosa y glutamina sólo aumentan un 10% y la concentración de lactato producido fue 35% mayor en los spinners respecto al cultivo en frasco-T.

Enfocándonos en los cultivos en spinner observamos que la caída de la viabilidad a 32°C y 30°C se retrasa por 1.5 y 4 días, siendo al final del cultivo 2 veces menor respecto a 37°C. En general la mayor actividad metabólica [mayores velocidades de consumo/producción] para todos los cultivos se registró durante la etapa de crecimiento exponencial, después de la cual el metabolismo se vuelve más lento; por ejemplo, a 37°C después de las 120 h, la disminución en los perfiles de consumo/producción coincide con el inicio de la fase estacionaria [Figura 12, zona sombreada].

Observando la Figura 12 (B y F), resulta evidente que durante las primeras 168 h hubo una caída vertiginosa en el perfil de concentración de glutamina; mientras que la caída de la concentración de glucosa fue mucho más lenta y al final sólo se consumió entre el 40 y el 50% de la glucosa disponible (Figura 12A y E). Además, el momento en el que comienzan a morir los cultivos coincide exactamente con el tiempo en el que prácticamente toda la glutamina fue consumida ( $\leq 0.5$  mM); por ejemplo, a 37°C la viabilidad cae a las 168 h cuando se ha consumido el 50% de la glucosa y el 88% de glutamina, mientras que para 30°C la viabilidad cae a las 300 h cuando se ha consumido el 85% de la glutamina y sólo el 38% de la glucosa. En términos de velocidades específicas de consumo, las  $q_{\text{glc}}$  fueron 7 veces menores a 37°C, 6 a 7 veces menores en los cultivos a 32°C y 5 a 6 veces menores en los cultivos a 30°C respecto a las velocidades de consumo de glutamina. Lo anterior re-afirma que la glutamina es el sustrato limitante.

Respecto a los metabolitos de desecho, las concentraciones máximas de lactato fueron 23% y 15% menores a 30°C y 32°C comparados con el control a 37°C; mientras que para los cultivos escalonados permanecieron alrededor de 35 mM (12% menor), excepto el cultivo a 32°C con cambio a las 72h que alcanzó una concentración similar al control a 37°C (Figura 12C y G). No obstante, ningún cultivo alcanzó concentraciones tóxicas de lactato [mayores a 42 mM]. Por otra parte, todos los cultivos acumularon glutamato hasta una concentración máxima de 1.2 mM, después de lo cual fue re-asimilado



**Figura 11. Cultivos escalonados de 37° a 32°C (A) y de 37° a 30°C (B).** En la parte superior se muestran los perfiles de crecimiento para los cultivos escalonados con cambio de temperatura a las 48 y 72 h y los respectivos controles a 37°, 32 y 30°C, en la parte inferior se muestra el perfil de la viabilidad con respecto al tiempo. Los resultados mostrados son el promedio de tres experimentos independientes y las barras de error representan su desviación estándar. Las flechas en negro indican el tiempo en el que se tomó la muestra para el análisis transcripcional y la zona sombreada corresponde al intervalo de tiempo durante la cual se consumió más del 80% de la glutamina.

---

(justo cuando se ha consumido alrededor del 70% de la glutamina) hasta alcanzar la concentración inicial del medio de cultivo (0.74 mM), permaneciendo alrededor de dicho valor hasta el final (Figura 12 D y H).

Las células CHO son capaces de consumir glutamato del medio de cultivo, debido a la actividad del gen de la glutamino sintetasa<sup>2</sup>, enzima encargada de sintetizar glutamina a partir de glutamato [Apéndice C, Figura 36], lo cual favorece la eficiencia del metabolismo y reduce la producción de amonio<sup>3</sup> [4,5]. Tal es el caso de nuestra línea celular y por ello el glutamato fue re- asimilado, hecho que coincidió con un ligero incremento en la concentración de glutamina en el sobrenadante de los cultivos a 30°C después de las 200 h (no apreciable en la figura).

Analizando detalladamente la Figura 12, se observa que para todos los cultivos el consumo de glucosa no se detuvo por completo al terminarse la glutamina, sino que la pendiente de las curvas cambió poco antes de que el glutamato empezara a ser consumido; esta caída en la concentración de glucosa fue más sutil que durante la fase exponencial pero se mantuvo hasta que la viabilidad fue menor al 40%. Lo anterior nos permite proponer que la reasimilación de glutamato al término de la fase exponencial (por acción de la glutamino sintetasa), juega un papel importante en la generación de energía (posiblemente a través de su oxidación completa en TCA, Apéndice C) y en el mantenimiento de la viabilidad después de las 200 h, al menos en los cultivos a 30°C, pues se ha reportado que:

A) La ganancia neta de energía de glucosa hasta lactato es de 2 ATP, mientras que de glutamina hasta aspartato se producen 12 ATP.

B) Al limitar la concentración de una o ambas fuentes de carbono (glucosa y/o glutamina) el flujo metabólico es dirigido de forma más eficiente hacia el TCA [4,5,89,93].

C) Hibridomas transfectados con el gen de glutamino sintetasa al ser cultivados en medio suplementado con glutamato en lugar de glutamina, consumen glucosa 50% más lento [4,5].

---

<sup>2</sup> Con la finalidad de tener un marcador de selección-amplificación alternativo a la DHFR, a algunas clonas de células CHO se les ha deletado el gen de la glutamino sintetasa [87] y estas también son empleadas a nivel industrial.

<sup>3</sup> La producción de amonio a lo largo del cultivo no fue determinada y no se sabe si la acumulación de dicho metabolito haya tenido repercusiones importantes en el comportamiento cinético; por ello sería importante determinar este parámetro y sus implicaciones en el metabolismo a baja temperatura.

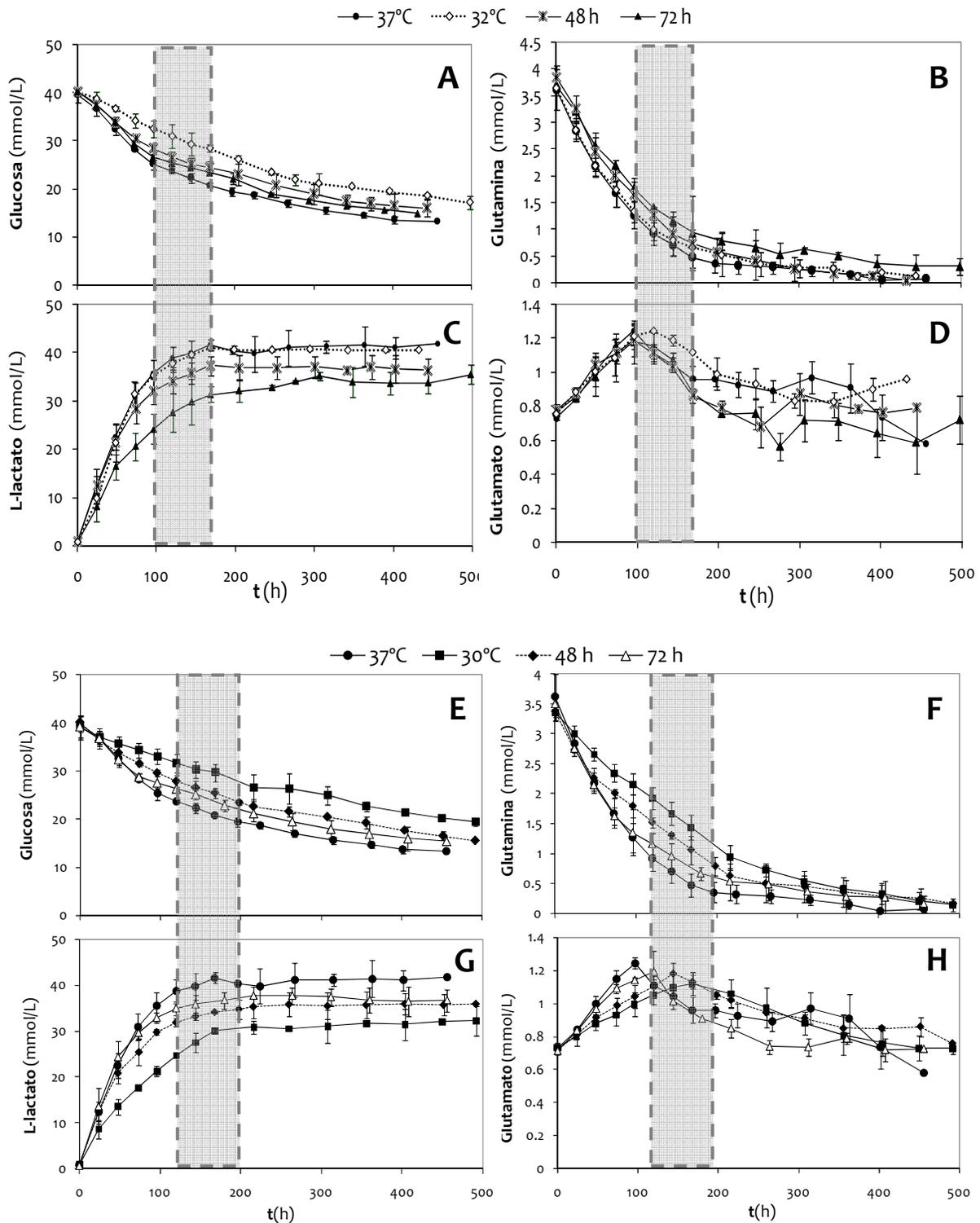


Figura 12. Efecto de la temperatura sobre el metabolismo de cultivos a 32 (A-D) y 30°C (E-H) en spinner flask. Se muestran los perfiles de consumo de glucosa (A,E) y de glutamina (B,F), así como los de producción de lactato (C,G) y de glutamato (D,H) para los cultivos escalonados y controles a 32° y 30°C. Las barras de error representan desviación estándar de al menos tres experimentos independientes y la zona sombreada indica el intervalo de tiempo en el que comienza a caer la viabilidad de los cultivos.

---

Un fenómeno similar pudo haberse suscitado de manera indirecta en los cultivos a baja temperatura, ya que a partir de las 144 h cuando se alcanzaron concentraciones limitantes de glutamina ( $\leq 1$  mM), las únicas fuentes de carbono que quedaron disponibles en el medio fueron la glucosa (más del 50% de la concentración inicial) y el glutamato que produjeron las mismas células. Desafortunadamente la eficiencia del metabolismo en esta etapa del cultivo no pudo ser registrada, debido a que ya se habían alcanzado las máximas concentraciones de lactato, enmascarando el efecto en caso de haberse producido.

En la Tabla 10 se resumen los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos, los cuales disminuyeron en función del tiempo de cambio y temperatura de cultivo; por ejemplo, en los cultivos control a 32 y 30°C los parámetros cinéticos fueron entre 30 y 60% menores respecto al cultivo control a 37°C, mientras que para los cultivos escalonados a ambas temperaturas la  $q_{glc}$ , la  $\mu$  y la  $q_{lac}$  fueron 60, 50 y hasta 80% menores respecto a 37°C.

La eficiencia del metabolismo se determinó con base en los rendimientos  $Y_{lac/glc}$  y  $Y_{glu/gln}$ , bajo la consideración de que la producción de lactato y glutamato reflejan de manera indirecta la cantidad de glucosa y glutamina que no fueron oxidadas hasta  $CO_2$  [Apéndice C] [5]. Así, el rendimiento  $Y_{glu/gln}$  en los cultivos control a baja temperatura y en los cultivos con cambio a las 72 h fue entre 15 y 23% menor respecto a 37°C, mientras en los cultivos escalonados con cambio a las 48 h éste parámetro fue hasta 53% menor. Por otra parte, el rendimiento  $Y_{lac/glc}$  fue entre 31 y 49% menor en los cultivos a baja temperatura respecto a 37°C, pero siempre mayor a la unidad (Tabla 10).

En particular los cultivos control a 37°C tuvieron un rendimiento  $Y_{lac/glc}$  15% mayor a 2  $mol_{lac}/mol_{glc}$ ; este exceso de lactato ya había sido observado en las primeras cinéticas con suero (43% mayor) y había sido atribuido al aprovechamiento de fuentes de energía alternas. Sin embargo, se ha reportado que en cultivos sin suero las tasas a las que se realizan la glicólisis y la glutaminólisis son excesivamente superiores a lo requerido por los procesos biosintéticos, provocando su uso ineficiente y la acumulación de piruvato, el cual es rápidamente metabolizado a lactato con la finalidad de regenerar  $NAD^+$  [Apéndice C], pues se ha propuesto que en el citoplasma de células animales cultivadas *in vitro* prevalece una relación alta de  $NADH/NAD^+$  [16,93]. También se ha especulado -

**Tabla 10.** Parámetros cinéticos y estequiométricos para los cultivos escalonados y control a 37°, 32° y 30°C en spinner flasks

Cultivo	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Glucosa		L-Lactato		Glutamina		Glutamato		$Y_{glugh}$
		$Y_{xs}$ (célula/nmol)	-qs (nmol/10 <sup>6</sup> cél*h)	$Y_{sx}$ (nmol/célula)	qs (nmol/10 <sup>6</sup> cél*h)	$Y_{xs}$ (célula/nmol)	-qs (nmol/10 <sup>6</sup> cél*h)	$Y_{sx}$ (pmol/célula)	qs (nmol/10 <sup>6</sup> cél*h)	
37°C	0.018 ± 0.001	53.00 ± 2.29	333.55 ± 7.711	0.04 ± 0.002	767.04 ± 33.13	2.30 ± 0.08	50.03 ± 4.37	0.73 ± 0.10	12.93 ± 0.43	0.26 ± 0.010
32°C	0.011 ± 0.001	46.92 ± 4.09	230.57 ± 4.871	0.03 ± 0.001	280.02 ± 19.02	1.21 ± 0.17	33.79 ± 1.60	0.86 ± 0.08	9.31 ± 0.08	0.21 ± 0.014
48 h	0.009 ± 0.002	62.03 ± 4.69	144.19 ± 20.38	0.02 ± 0.005	174.55 ± 3.901	1.21 ± 0.14	24.78 ± 3.98	0.33 ± 0.08	2.93 ± 0.19	0.12 ± 0.008
72 h	0.009 ± 0.002	64.03 ± 2.70	140.35 ± 27.15	0.02 ± 0.007	164.59 ± 21.59	1.17 ± 0.18	24.59 ± 3.35	0.56 ± 0.02	5.01 ± 1.04	0.20 ± 0.002
30°C	0.007 ± 0.0002	56.31 ± 3.16	131.41 ± 5.792	0.03 ± 0.001	206.29 ± 0.914	1.57 ± 0.09	28.78 ± 2.42	0.84 ± 0.02	6.19 ± 0.27	0.22 ± 0.002
48 h	0.007 ± 0.0007	54.84 ± 3.78	121.67 ± 20.40	0.03 ± 0.003	170.13 ± 7.157	1.40 ± 0.16	18.90 ± 1.42	0.48 ± 0.04	3.21 ± 0.40	0.17 ± 0.004
72 h	0.008 ± 0.0003	66.81 ± 2.78	118.00 ± 9.085	0.02 ± 0.002	150.63 ± 12.24	1.28 ± 0.10	20.14 ± 1.33	0.51 ± 0.10	4.00 ± 0.95	0.20 ± 0.010

---

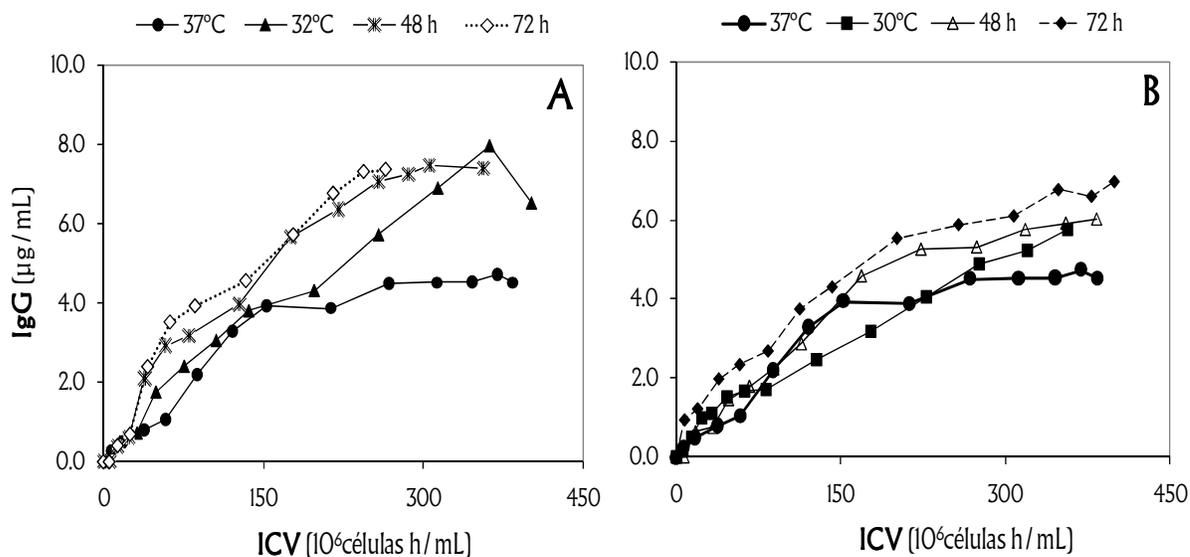
que la presencia de insulina y/o transferrina en los medios sin suero (como en nuestro caso) pueden ser responsables de una mayor actividad de las enzimas implicadas en la glicólisis (principalmente de la fructocinasa) y en la producción de lactato [89,91].

Por consiguiente, tanto la glicólisis como la glutaminólisis contribuyen a la sobreproducción de lactato y al incremento en el rendimiento  $Y_{lac/glc}$  en el cultivo a 37°C donde el metabolismo no ha sido sometido a estrés, y en el cultivo control a 30°C donde el rendimiento fue 20% mayor respecto a 32°C. Si consideramos que la producción de lactato es resultado de ambas vías metabólicas, entonces el rendimiento  $Y_{lac/glc}$  refleja mejor la eficiencia de oxidación de las 2 fuentes de carbono y podemos concluir que los cultivos escalonados con cambio a las 72 h, presentaron el metabolismo más eficiente respecto al resto de los cultivos.

#### 6.2.2.1. Incremento de la productividad específica y volumétrica al disminuir la temperatura

La cuantificación del AcMo-IL8 se realizó mediante ELISA sandwich tal como se describe en la sección 5.3.1. Como se puede observar en la Tabla II en general, la reducción de la temperatura provocó un incremento en la producción de AcMo, de tal forma que la  $IgG_{máx}$  en los cultivos a 32°C fue entre 56 y 69% mayor respecto al cultivo a 37°C, y en los cultivos a 30°C entre 22 y 47% mayor. No obstante, la evolución de la concentración del AcMo-IL8 a lo largo del tiempo fue distinta para cada cultivo. Por ejemplo, la producción de proteína recombinante a 37°C y en los cultivos escalonados a 30°C, está asociada al crecimiento (Figura 13B), mientras que en los cultivos a 32°C (control y escalonados) y en el control a 30°C, la producción se vuelve independiente pues las células continuaron produciendo anticuerpo incluso después de las 250 h, cuando los cultivos ya habían dejaron de crecer (Figura 11 y Figura 13).

Dado que la productividad específica ( $q_p$ ) está determinada por la concentración celular, el incremento observado en la  $q_p$  estuvo en función del tiempo de cambio y la temperatura; de tal forma que los cultivos escalonados con cambio a las 72 h presentaron la mayor  $q_p$  respecto al resto de los cultivos (19-21 % mayor respecto a 37°C), mientras los controles a 32 y 30°C presentaron una  $q_p$  11% y 32% menor (Tabla II), debido a que la máxima concentración celular viable alcanzada fue 9 y 14% menor respecto a 37°C.



**Figura 13.** Efecto de la disminución de la temperatura de cultivo en la concentración de AcMo-IL8. La concentración de anticuerpo en el sobrenadante de las cinéticas control y escalonados a 32° (A) y 30°C (B) fue determinada por ELISA sándwich y la productividad específica se obtuvo a partir de la pendiente de las gráficas de la concentración de AcMo en función de la integral de células viables [ICV]. Los datos fueron obtenidos de 2 determinaciones independientes de muestras provenientes de una misma cinética, por ello no se presentan barras de error.

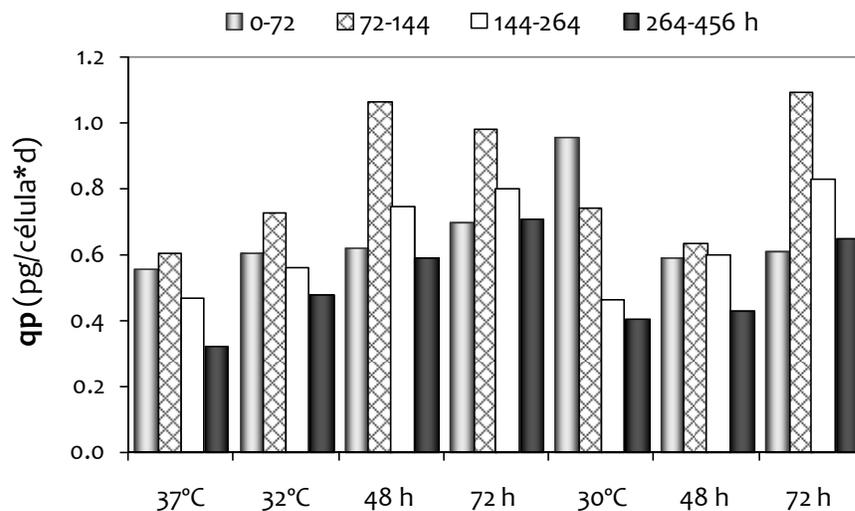
**Tabla II.** Concentración máxima, productividad específica (qp) y volumétrica (Pv) de AcMo-IL8 de los cultivos a baja temperatura

Cultivo	qp (pg/célula•d)	IgG <sub>máx</sub> (mg/L)	Pv (µg/L•h)
37°C	0.613	4.72	11.58
32°C	0.547	7.97	12.55
48 h	0.662	7.47	18.31
72 h	<b>0.744</b>	<b>7.36</b>	<b>20.44</b>
30°C	0.414	5.74	12.76
48 h	0.637	6.03	14.53
72 h	<b>0.731</b>	<b>6.95</b>	<b>16.13</b>

El incremento en la productividad volumétrica (Pv) fue similar al observado para la productividad específica siendo proporcional al tiempo de cambio (Tabla II). Así los cultivos escalonados con cambio a las 72 h (ambas temperaturas) presentaron las mayores productividades volumétricas respecto al resto de los cultivos, mientras que los cultivos escalonados a 32°C presentan mayor productividad volumétrica respecto a sus contrapartes a 30°C. Cabe resaltar que el incremento en la Pv de los cultivos control a baja temperatura fue sólo del 8 al 10% respecto a 37°C. Un caso particular lo representa -

el control a 32°C, que aún teniendo una  $q_p$  11% y una  $P_v$  8% menores respecto al cultivo a 37°C, fue el cultivo que exhibió la mayor concentración de IgG (7.97 mg/L), incluso en comparación con los cultivos escalonados.

Analizando la  $q_p$  de cada cultivo en función del tiempo (Figura 14), observamos que durante la fase exponencial temprana (0-72 h) casi todos los cultivos presentan productividades similares o ligeramente superiores al control a 37°C excepto el cultivo control a 30°C, que presentó una  $q_{p\text{máx}}$  en esta etapa para después disminuir drásticamente hasta niveles similares a los alcanzados a 37°C. El resto de los cultivos exhibieron una  $q_{p\text{máx}}$  a la mitad de la fase exponencial (72-144 h), siendo los cultivos escalonados a 32°C con cambio a las 48 h y el escalonado a 30°C con cambio a las 72 h, los que presentaron la mayor  $q_p$  ( $\approx$  1 pg/célula·d). En la fase exponencial tardía (144-264 h) y en la fase de muerte (264-456 h) la productividad de todos los cultivos disminuyó; sin embargo, para los cultivos escalonados a 32°C con cambio a las 72 h, la caída de la  $q_p$  es menor indicando que las células producen AcMo por más tiempo y esto se reflejó en un aumento en la  $q_p$ .



**Figura 14. Efecto de la disminución de la temperatura de cultivo sobre la productividad específica del AcMo-IL8.** Se muestra la evolución de la productividad específica respecto al tiempo de cultivo para los cultivos a baja temperatura y control a 37°C. Los datos provienen de muestras de una misma cinética, por ello no se presentan barras de error.

---

Al analizar esta última gráfica resaltan dos cuestiones importantes, la primera es que en todas las etapas analizadas, los cultivos a baja temperatura siempre presentaron una  $q_p$  igual o mayor a la del cultivo  $37^\circ\text{C}$ . La segunda es que la caída de la  $q_p$  a partir de las 144 h corresponde con el agotamiento de glutamina, la reasimilación de glutamato y las máximas concentraciones de lactato, sugiriendo que a baja temperatura los recursos energéticos se distribuyen a favor de una mayor producción de proteína recombinante, tal como ha sido reportado previamente [17,40,84,113,147].

En general una línea de células CHO medianamente productora genera entre 10 y 30  $\text{pg}_{\text{proteína-rec}}/\text{célula}\cdot\text{d}$ , rindiendo títulos de 1 g/L [73]. Como se puede observar, nuestra línea celular presentó productividades y títulos de AcMo menores y por lo tanto es mala productora. Sin embargo, sí podemos afirmar que como modelo de estudio nuestros resultados corresponden con lo reportado para diversas proteínas recombinantes producidas en células CHO [Tabla 2], en el sentido de que la modalidad de cultivo escalonado permitió extender la fase productiva y alcanzar mayores productividades volumétricas respecto a  $37^\circ\text{C}$  [17,40,113,125,147]. Por el contrario, el efecto de la temperatura sobre en la productividad de los cultivos monotérmicos fue más bien adverso.

Con todo lo anterior, se puede afirmar que los cultivos con cambio a las 72 h a ambas temperaturas subfisiológicas, tuvieron el metabolismo más eficiente al alcanzar concentraciones celulares muy similares a las del cultivo a  $37^\circ\text{C}$ , desperdiciar menos fuente de carbono en forma de lactato y además incrementaron su productividad específica y volumétrica hasta un 21 y 77% respecto a  $37^\circ\text{C}$ . Por lo tanto, se concluyó que el tiempo óptimo de cambio, en esta línea celular, para ambas temperaturas era al tercer día.

#### 6.2.2.2. El diámetro celular incrementa únicamente a $30^\circ\text{C}$

La evolución del diámetro y volumen celular respecto al tiempo, fueron determinados para los cultivos control y escalonados a  $30$  y  $32^\circ\text{C}$ , debido a que algunos autores han reportado un incremento en el tamaño celular en cultivos monotérmicos a baja temperatura, como consecuencia del arresto del ciclo celular en fase  $G_0/G_1$  y como indicativo de un cultivo celular más productivo [40,90,140]. Como se observa en la Figura 15

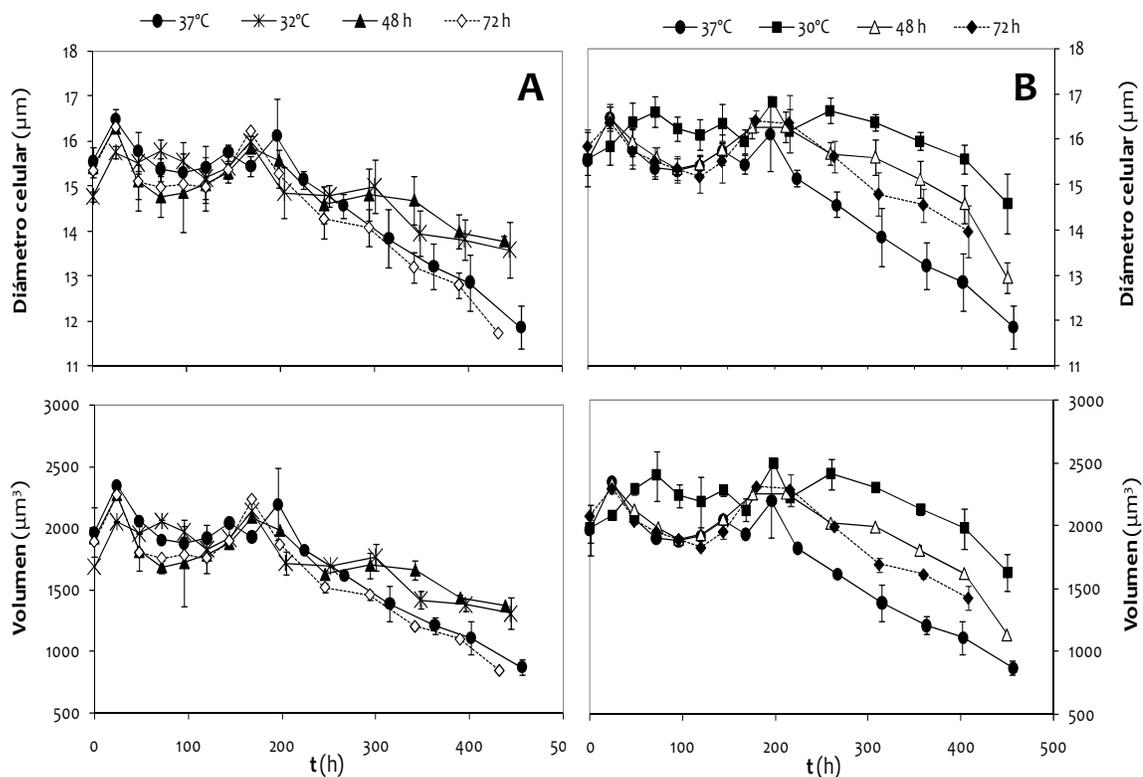
---

tanto el diámetro como el volumen celular, presentaron una tendencia similar para todos los cultivos: permanecieron relativamente constantes durante las primeras 200 h para después disminuir drásticamente en correlación perfecta con la caída de la viabilidad y el agotamiento de glutamina [Figuras 11 y 12].

En los cultivos a 32°C [control y escalonados] el diámetro celular promedio durante las primeras 200 h fue de  $15.5 \pm 0.8 \mu\text{m}$  y el volumen celular de  $2000 \pm 310 \mu\text{m}^3$ , permaneciendo relativamente constante hasta después de las 300 h, cuando el diámetro fue 10-14% y el volumen 18-30% mayor en el cultivo control a 32°C y escalonado con cambio a las 48 h, respecto a 37°C; mientras que el cultivo escalonado con cambio a las 72 h se comportó casi igual que a 37°C [Figura 15A]. Por su parte, los cultivos escalonados a 30°C hasta las 144 h tuvieron un diámetro y volumen muy similares a los de 37°C ( $15.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$  y  $2000 \pm 300 \mu\text{m}^3$ ), después de lo cual dichos parámetros se incrementaron de manera inversa al tiempo de cambio; por ejemplo, el cultivo con cambio a las 48 h al final, presentó un diámetro 12% mayor y el de las 72 h 8% mayor respecto a 37°C. Como caso particular, el cultivo control a 30°C presentó un incremento en el diámetro y volumen celular desde las 48 h [Figura 15B] que se mantuvo y se agudizó al final del cultivo, donde el diámetro fue 17% mayor y el volumen 46% mayor respecto a 37°C.

Analizando los histogramas de la distribución de diámetros [datos no mostrados], se observó que al final del cultivo (400 h) a 37°C y en los escalonados con cambio a las 72 h, la población fue más heterogénea [diámetro promedio de  $12.8 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ] y se observó la aparición de una población con diámetro menor a  $8 \mu\text{m}$ , atribuida a la acumulación de restos celulares. Mientras tanto en los cultivos control y escalonado con cambio a las 48 h, la población permaneció homogénea [alrededor de  $15 \mu\text{m}$  a 30°C y de  $13.5 \mu\text{m}$  a 32°C] aún cuando la viabilidad cayó por debajo del 40% y no se observaron poblaciones con diámetros menores.

Pese a la relación establecida entre el tamaño celular, el arresto del ciclo celular y la productividad en cultivos a baja temperatura establecida por algunos autores [40,90,140], Lloyd, et al. [2000] demostraron que es el tamaño celular y no la fase del ciclo el principal determinante de la productividad específica [80]; estableciendo la posibilidad de que “el ambiente particular a la mitad de la fase exponencial de los cultivos, favorece la aparición -



**Figura 15. Efecto de la disminución de la temperatura sobre el tamaño celular.** El diámetro [paneles superiores] y volumen celular [paneles inferiores] fueron registrados a lo largo del tiempo para los cultivos control y escalonados a 32°C [A] y 30°C [B]. Las barras de error representan la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

de células más grandes y más productivas simplemente debido a su tamaño e independientemente de la fase del ciclo celular” [80]. Por otra parte, Ramírez y Mutharasan [1990] demostraron que hibridomas en fase  $G_1$  secretaban AcMo a velocidades superiores respecto a otras fases del ciclo celular [109].

Considerando lo anterior, el hecho de que las células cultivadas a 30°C fueran más grandes explicaría por qué produjeron más AcMo respecto a aquellas cultivadas a 37°C. En el caso del control a 30°C, el hecho de que la  $qp_{m\acute{a}x}$  se alcanzara entre las 0 y 72 h tiene sentido, pues justamente en esta etapa es cuando la células son más grandes. No obstante, al parecer este efecto no es generalizado para todas las temperaturas subfisiológicas, pues a 32°C no se observó un incremento importante en el tamaño de las células y aún así presentaron productividades superiores incluso que los cultivos a 30°C. Estas observaciones corresponden con lo reportado por Swiderek y Al-Rubeai [2007] quienes verificaron un incremento de hasta 1.4 veces en el tamaño y granularidad

---

de células NSO cultivadas 22°C y un arresto del ciclo celular en fase G<sub>2</sub>/M. Sin embargo, las mismas células cultivadas a 34°C no presentaron un cambio significativo de tamaño y se arrestan en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> [130]. Esto parece indicar que ni el arresto del ciclo celular en una fase determinada, ni el incremento del tamaño celular son las causas directas del incremento de la productividad a baja temperatura, más bien parecen ser eventos que co-existen durante el choque frío.

### 6.2.2.3. Reducción del metabolismo e incremento de la productividad: ¿cómo se genera energía a baja temperatura?

Considerando que la glutamina fue la principal fuente de energía para esta línea celular y que a baja temperatura: los consumos de glutamina y glucosa se reducen entre 31 y 60%, y los de producción de lactato hasta 80% respecto a 37°C, la caída de la viabilidad se retrasa hasta por 4 días sin afectar significativamente la concentración celular y que hubo un incremento en la productividad específica hasta del 21% y del 77% en la productividad volumétrica de los cultivos escalonados con cambio a las 72 h; entonces las preguntas que surgen son: ¿de dónde obtiene energía la célula si casi no consume sustratos? y ¿porqué se vuelve más eficiente el metabolismo al disminuir la temperatura?

Se ha demostrado que la contribución energética de diversos sustratos al metabolismo de células animales no es equitativo [4,5,93,101,102,127,150]; por ejemplo Stanisz, et al. (1983) demostraron que en células HeLa el 50% de la energía proviene de la glutamina, 35-45% de glucosa y 5-10% de la oxidación de ácidos grasos [127]. En este sentido, Pecqueur, et al. (2008) plantean que dependiendo de los requisitos energéticos de la célula será la fuente de carbono utilizada, así células altamente proliferativas usan glucosa como sustrato principal para satisfacer su creciente demanda energética, mientras que células quiescentes catabolizan el piruvato derivado tanto de glicólisis, como de la oxidación de ácidos grasos [101]. Asimismo, resulta relevante que las enzimas del metabolismo central (Apéndice C) que presentan actividades óptimas entre los 25 y 30°C, son precisamente aquellas para las que se ha reportado una baja actividad a 37°C y corresponden a fugas energéticas

---

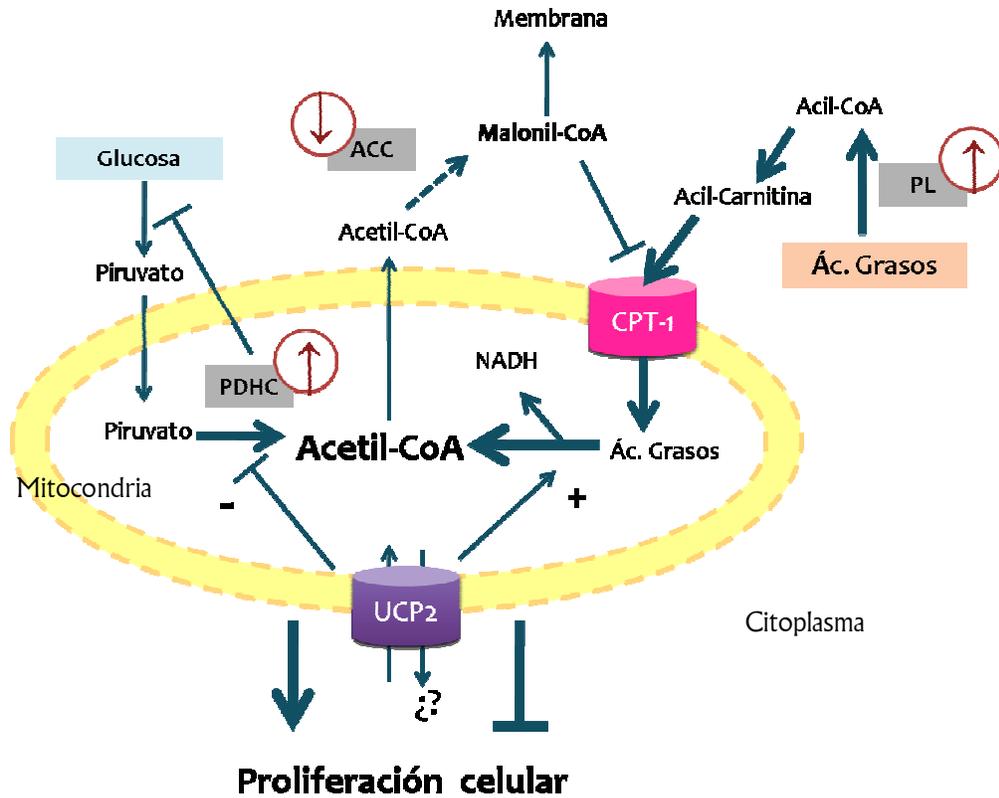
en el metabolismo [93]. Dentro de este grupo de “enzimas hipotérmicas” se encuentran casi todas las enzimas reguladoras del metabolismo de lípidos (síntesis y degradación), sugiriendo que estos están implicados en la generación de energía a baja temperatura.

Estudios hechos en mamíferos que hibernan (concretamente ardillas) han demostrado que cuando la temperatura corporal disminuye, ocurre un cambio de combustible metabólico, dando preferencia a la oxidación de ácidos grasos frente a la oxidación de carbohidratos [Figura 16] [101,134]. Suponiendo que este programa de adaptación permanece en células individuales, se plantea la posibilidad de que los cultivos escalonados metabolizaran ácidos grasos como fuentes de energía alterna para contender con el choque frío, proveyendo precursores al TCA, inhibiendo la glicólisis y favoreciendo el uso eficiente de la glutamina, ya sea a través de su oxidación y/o aprovechamiento en la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas (i.e. AcMo).

Aún así, en el cultivo control a 30°C la utilización de lípidos como fuente de energía pudo haber favorecido la sobreproducción de lactato; implicando que hay un “punto crítico” en el que la célula no puede revertir o contender con el estrés. Quedando abierta la posibilidad de estudiar de qué depende ese punto: ¿de la temperatura utilizada, del tiempo que pase en ella, de la línea celular o de las condiciones de cultivo?

Aunque los datos presentados no son suficientes para determinar el mecanismo exacto por el cual el metabolismo se torna más eficiente, proponemos que el ajuste metabólico en pro de la productividad al disminuir la temperatura, puede ser resultado del consumo limitado de las fuentes de carbono, en combinación con un probable incremento en la expresión y/o actividad de ciertas enzimas reguladoras del metabolismo (p.ej. piruvato deshidrogenasa, enzima málica, fosfoenolpiruvato carboxinasa) y el uso de lípidos como fuente de energía alterna. Además la energía generada en lugar de ser ocupada para el rápido crecimiento poblacional (disminución de la velocidad específica de crecimiento), sería empleada para aumentar el volumen celular individual y proveer más precursores para la síntesis de ácidos nucleicos, lípidos

y proteínas; lo cual en parte explicaría por qué se produce más AcMo respecto a 37°C. Por lo tanto con la finalidad de entender mejor como se está regulando el metabolismo en condiciones de hipotermia, se necesitaría determinar la producción de alanina, aspartato y amonio [para completar el balance de materia], así como estudiar la actividad y/o expresión de algunas de las enzimas antes mencionadas.



**Figura 16. Modelo del cambio de combustible metabólico durante la hibernación de roedores.** Los cambios en el metabolismo durante la hibernación están regulados en parte por una expresión génica diferencial y por modificaciones en la actividad de ciertas enzimas; de esta forma la expresión y actividad de la acetil-CoA carboxilasa [ACC] se reduce, mientras los de la piruvato deshidrogenasa cinasa [PDHC] y de lipasa pancreática [PL] se incrementan. El incremento en la actividad de la PDHC inhibe la glicólisis y reduce la acumulación de piruvato, mientras que la actividad empobrecida de la ACC resulta en una producción limitada a nula de malonil-CoA; en consecuencia la canitoil palmitoil transferasa I [CPT-I], entrega los ácidos grasos liberados por la PL a la mitocondria para su oxidación y provee Aceti -CoA al TCA [101,134]. Flechas punteadas indican una baja actividad, flechas gruesas indican actividad favorecida; la disminución o incremento en la expresión de un gen se indica con flechas dentro de círculos. Adaptado de Pequeur, et al. (2008)

---

### 6.3. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL: EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE LA TEMPERATURA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA VÍA DE N-GLICOSILACIÓN

#### 6.3.1. Selección de los genes de interés, diseño de oligonucléotidos

De las 476 secuencias de ARNm reportadas en el GeneBank (NCBI) para hámster sólo el 8% corresponde a genes involucrados con la glicosilación. De estas 40 secuencias únicamente 28 están directamente relacionadas con la síntesis de N-glicanos, una minoría pertenece a O-glicosilación y el resto son secuencias de los mismos genes para diferentes clonas. Estas 28 secuencias “únicas” están distribuidas heterogéneamente de acuerdo a la función de las enzimas para las que codifican en glicosidasas, glicosiltransferasas, enzimas que sintetizan precursores lipídicos y transportadores de azúcares activados, siendo este último grupo en el cual los 5 azúcares principales (fucosa, manosa, N-acetil glucosamina, galactosa y ácido siálico) están representados.

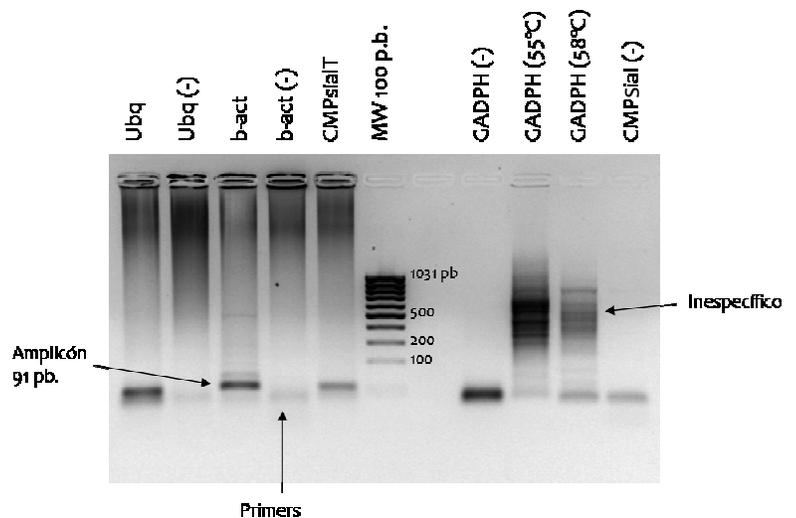
Así, la selección de los genes estudiados se basó en la disponibilidad de las secuencias nucleotídicas del ARNm para *C. griseus* en el GeneBank, la función de las proteínas que codifican y sus implicaciones sobre la vía de N-glicosilación. Además, para evitar que el ADN genómico fuera amplificado en la reacción de qPCR<sup>4</sup> el diseño de los oligonucléotidos debía realizarse sobre una intersección de splicing exón-exón. Dado que para CHO sólo una secuencia intrónica en el gen del transportador de ácido siálico ha sido reportada, el diseño de oligonucléotidos se realizó proponiendo intersecciones hipotéticas usando las secuencias intrónicas de rata y ratón que estuvieran dentro de las regiones codificantes. La alta homología entre especies [90-97%] también permitió diseñar oligonucléotidos para aquellos genes no reportados para CHO (Tabla 6). Una PCR convencional y el análisis de los productos por electroforesis fue empleada para determinar qué oligos no amplificaban y que aquellos que lo hacían generaran un único amplicón de 91 p.b. (Figura 17).

---

<sup>4</sup> Se ha reportado que aún los ARN comerciales o una muestra tratada con DNasa contienen residuos de ADN genómico y esto afecta la eficiencia de amplificación [104]

En total se seleccionaron 28 genes clasificados según su función celular (Tabla 6); sin embargo, no todos pudieron ser amplificados, por ejemplo, los oligonucleótidos diseñados para los genes codificantes de: N-Acetil glucosaminil transferasa [GlcNAc-T] II variante 1 y 2, fucosiltransferasa 6 [Fuc6B], N-Acetil glucosaminil transferasa III y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa [GADPH], no amplificaron aún probando diversas condiciones de reacción, probablemente debido a una baja expresión, a la presencia de isoformas con baja homología entre las distintas especies [GlcNAc T II] y/o la ausencia de dicha secuencia en las células CHO [GlcNAc-T III]. De esta forma, únicamente la expresión de 14 genes relacionados con la vía de N-glicosilación, genes codificantes para la cadena pesada y cadena ligera del AcMo-IL8 [2], para chaperonas del RE [2], para proteínas de choque frío [2] y 3 genes de referencia, fue evaluada por qPCR (Tabla 6) y los re.

**Figura 17. Prueba de amplificación de oligos.** Se muestra un gel de agarosa al 1.5% cargado con 20  $\mu$ L de reacción de qPCR, empleado para verificar que los oligos generaran un único amplicón de 91 p.b; varias temperaturas de alineamiento fueron probadas para amplificar el gen Gadph I (se muestran los productos para 55 y 58°C), sin embargo sólo se observaron productos inespecíficos de más de 300 p.b. La banda debajo del amplicón corresponde a los oligonucleótidos y se observa también en el control negativo (-).



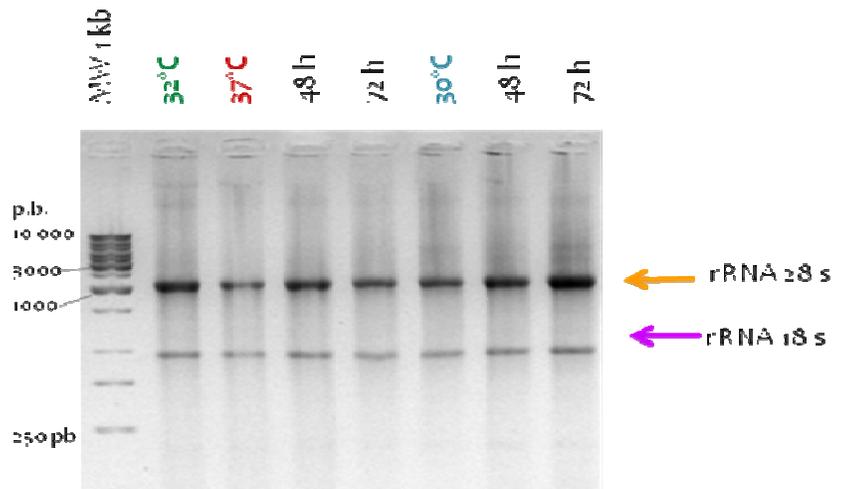
## 6.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

### 6.3.2.1. Cuantificación y calidad del ARN<sub>tot</sub>

Al determinar la concentración del ARN total extraído observamos que siempre el mayor rendimiento lo presentaron los cultivos a 30°C con alrededor de 54  $\mu$ g totales, y el menor rendimiento los cultivos a 37°C con  $\sim$ 36  $\mu$ g totales de ARN [33% menor]. Esto fue consistente para la variedad de muestras analizadas, sugiriendo que a 37°C hay menos ARN<sub>tot</sub>/célula respecto a 30°C.

La determinación de la integridad y pureza de la muestra de ARN es crítica para los análisis de expresión génica y un factor importante a considerar durante la estandarización, debido a que el poder de amplificación de la qPCR es tal, que la mínima cantidad de ADN puede ser amplificada afectando la eficiencia de reacción y generando cuantificaciones erróneas y poco confiables [9,10,104]. En este sentido, la calidad, integridad y pureza del ARN<sub>tot</sub> se confirmó mediante electroforesis en geles de agarosa. La presencia de dos bandas bien definidas correspondientes al ARNr de 28s y 18s, sin barrido entre ellas y en una proporción 2:1 (28s:18s), reveló la ausencia de degradación en todas las muestras de ARN (buena integridad y calidad) y la pureza se confirmó por la ausencia de ADN genómico sobre la banda correspondiente al ARNr 28s, en la mayoría de las muestras (Figura 18). Usualmente las bandas correspondientes al ARNr 28s y 18s son empleadas como referencia para determinar integridad, debido a que éste representa del 70 al 90% del ARN celular total [86,96].

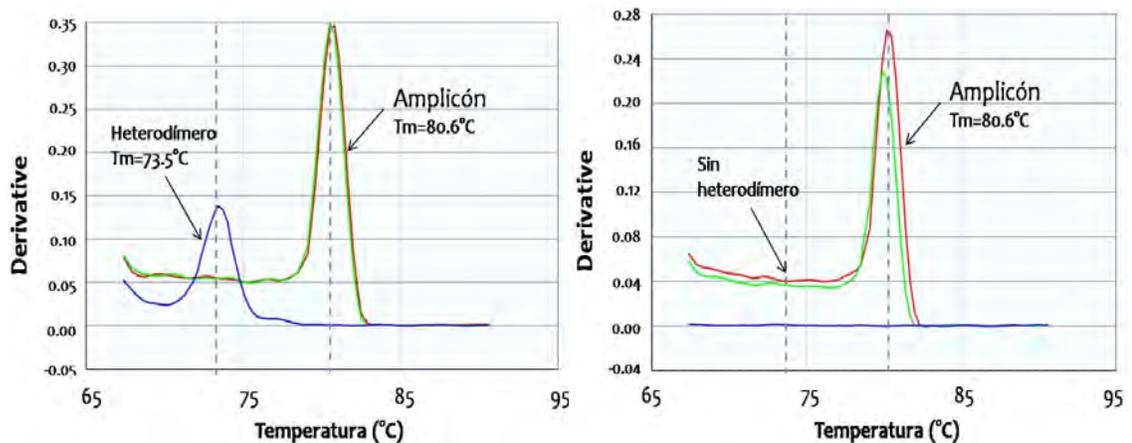
**Figura 18. Integridad y pureza del ARN<sub>tot</sub>.** Gel típico de agarosa al 1.5% cargado con 3 µL de ARN<sub>tot</sub> por pozo. La presencia de las bandas correspondientes al ARNr de 28 y 18s confirmó la integridad de la muestra. MW: marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas.



### 6.3.2.2. Estandarización de las condiciones de reacción

Los dímeros de primers son productos del alineamiento y amplificación no específicos entre los oligonucleótidos sentido y antisentido, que compiten con la formación del producto específico de PCR. Esto provoca bajas eficiencias de amplificación que resultan a su vez en una cuantificación errónea de los niveles de expresión [9,10,103,104]. Por ello parte importante de la estandarización de un ensayo de qPCR consiste en optimizar las concentraciones de oligonucleótidos empleados.

La concentración óptima para cada par de oligonucleótidos se definió analizando las curvas de disociación de la qPCR correspondiente a la matriz de primers (sección 5.4.3.1), escogiendo aquellas combinaciones de oligo sentido y antisentido en las que no se presentaba dímero de primer. Por ejemplo, al utilizar concentraciones equimolares de oligonucleótidos (420 nM) para el gen codificante de  $\beta$ -actina (*Actb*) se observaron 2 picos en la curva de disociación, el primero corresponde a la amplificación inespecífica de un dímero de oligonucleótidos ( $T_m=73.5^\circ\text{C}$ ), que se observa tanto en las muestras como en el control sin templado de ADNc (NTC), y el segundo corresponde al amplicón ( $T_m=80.6^\circ\text{C}$ ). Después de que las concentraciones fueran optimizadas, el dímero desaparece tanto en las muestras como en el NTC y se observa un pico único correspondiente al amplicón (Figura 19). Para los genes codificantes para tubulina y ubiquitina, los dímeros no pudieron ser eliminados mediante esta optimización y siguieron interfiriendo con la amplificación como se discute más adelante.



**Figura 19. Optimización de la concentración de oligonucleótidos.** Se muestran las curvas de disociación para el gen codificante de  $\beta$ -actina usando concentraciones equimolares de oligos (420 nM) [izq.] y usando la concentración optimizada de 300/600 nM (F/R) [derecha], en este último caso el dímero de primer desaparece incluso en el control sin templado (NTC). Derivative= primera derivada negativa de la fluorescencia,  $T_m$  dímero =  $73.5^\circ\text{C}$ ,  $T_m$  amplicón=  $80.6^\circ\text{C}$ .

Un gen de normalización adecuado, es aquel cuya expresión no varía o presenta una variación mínima a través del conjunto de muestras y condiciones investigadas; permitiendo compensar las variaciones intra- e inter-ensayo debidas a las diferencias en -

la cantidad y calidad de muestra, pues tanto el gen de referencia como el de estudio serán sometidos al mismo procesamiento [6,9,10, 105,135].

Los genes de referencia comunmente utilizados son aquellos presentes en todos los tipos celulares y necesarios para la supervivencia básica de la célula, como por ejemplo *Gadph*, albuminas, actinas, tubulinas ciclofilinas, ARNr 18s o 28s, microglobulinas [9,104]. Sin embargo, debido a la presencia de pseudogenes y a la compleja regulación a la que están sujetos, su variabilidad a lo largo de múltiples condiciones experimentales ha sido ampliamente documentada. A pesar de esto, innumerables trabajos publicados han usado un gen particular para la normalización sin haber validado su estabilidad, de tal suerte que la selección de los genes de referencia no es trivial, pues de ello depende la correcta cuantificación de los niveles de expresión [104].

Con la finalidad de seleccionar el o los genes de referencia más adecuados para la normalización y estandarización de la técnica de qPCR, la estabilidad de 3 genes (Tabla 12) fue evaluada bajo las diferentes condiciones experimentales de estudio, esto es: tiempo de toma de muestra (tercer y cuarto día), tipo (monotérmico o escalonado) y temperatura de cultivo (37, 32 ó 30°C).

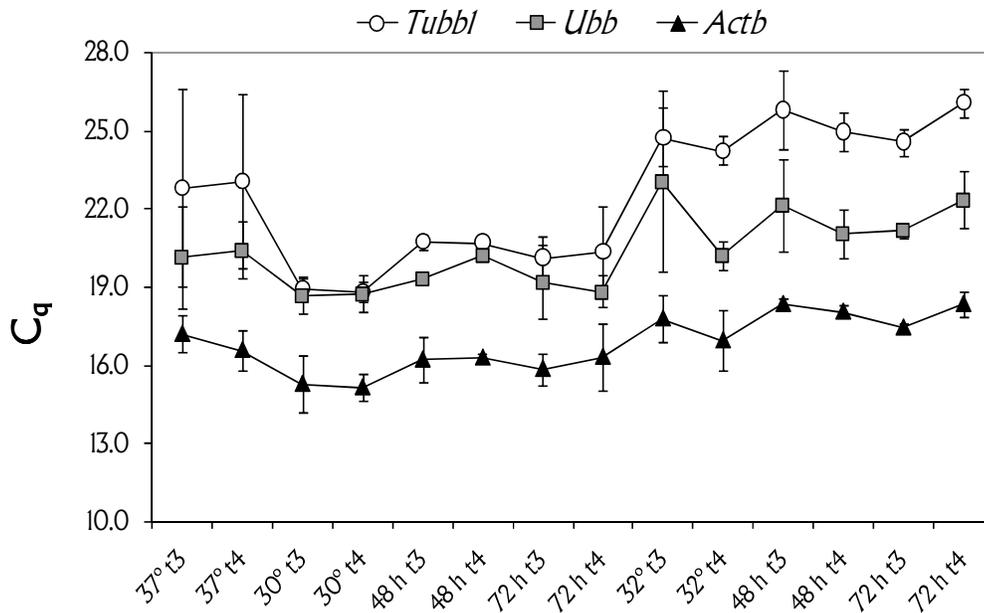
**Tabla 12.** Candidatos a genes de referencia evaluados y su estabilidad de expresión

Gen	Proteína	Función principal	Pseudo- genes	M	E
<i>Actb</i>	β-actina	Proteína estructural del citoesqueleto involucrada en varios tipos de movilidad	Sí	<b>1.098</b>	<b>0.224</b>
<i>Tubb1</i>	β-tubulina	Proteína estructural del citoesqueleto	Sí	<b>1.387</b>	<b>1.175</b>
<i>Ubb</i>	Ubiquitina	Degradación de proteínas	Sí	<b>1.173</b>	<b>0.224</b>

M= media geométrica de la estabilidad de expresión calculado mediante el programa geNorm, E= valor de estabilidad calculado con el programa NormFinder.

En la Figura 20 se muestran los perfiles de transcripción obtenidos. Se puede observar que el gen codificante para β-actina tuvo el nivel de expresión más alto ( $C_q=17$ ), mientras que el de ubiquitina y tubulina tienen un nivel de expresión similar ( $C_q=21$ ). Además, independientemente del tiempo y tipo de cultivo, la expresión aumentó en los cultivos a 30°C ( $C_q$  bajo) y disminuyó en la misma proporción a 32°C ( $C_q$  alto).

Aunque esta variación fue consistente para los 3 genes, el gen más estable fue *Actb* sugiriendo que éste podría ser el gen más adecuado para llevar a cabo la normalización.



**Figura 20. Estabilidad de los genes de referencia.** La expresión de 3 posibles genes de referencia (actina, tubulina y ubiquitina) se presentan como el valor promedio del ciclo de cuantificación ( $C_q$ ) en función de las diferentes condiciones de estudio: temperaturas (37,32 y 30°C), cultivos escalonados (48 y 72 h), así como tiempos de cosecha al tercer (t3) y cuarto día (t4). Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Utilizando los valores de  $C_q$  obtenidos en el ensayo de estabilidad, la variabilidad en la expresión de los 3 genes propuestos también fue evaluada mediante 3 programas informáticos [geNorm [135], NormFinder [6] y Bestkeeper [105].

**geNorm** es un programa desarrollado por Vandesompele, et al. (2002), quienes definieron dos parámetros para cuantificar la estabilidad de los genes de referencia: el parámetro **M** que representa la media geométrica de la estabilidad de expresión, y **V** que representa la variación entre pares de genes [135]. Este programa cataloga a los genes de acuerdo a la similitud de los patrones de expresión por lo que no puede discernir entre genes co-regulados. Para solucionar este problema Lindbjerg, et al. (2004) desarrollaron **NormFinder**, el cual calcula el valor de estabilidad (E) de cada gen y los cataloga con base en la variación intra e intergrupala de los perfiles de expresión, es decir, la medida en que es afectado por las condiciones experimentales [6].

---

Finalmente **BestKeeper**, desarrollado por Pfaffl, et al. (2004), calcula la media geométrica de la estabilidad de expresión considerando las eficiencias de amplificación de cada gen, tanto para los genes de referencia como para 10 genes de estudio. De esta forma, el programa determina que tan estable es su expresión y calcula los parámetros de un gen de referencia ideal para ese grupo (bestkeeper index o índice); posteriormente mediante un análisis de correlación de Pearson se estima la relación entre los posibles genes control y el índice para determinar cuál sería el gen de referencia más adecuado [105]. En la Tabla 12 se enlistan los valores de estabilidad (M y E) obtenidos mediante el análisis con geNorm y NormFinder, mientras los resultados de Bestkeeper se muestran en la Tabla 13 y Tabla 14.

Los análisis indicaron que el el gen más estable de los tres fue *Actb* y el menos estable fue *Tubbl*. La estabilidad media calculada por geNorm y Normfinder para los genes codificantes de actina y ubiquitina fueron similares (M=0.887, E=0.224), indicando que cualquiera de los dos o ambos podían ser utilizados como genes de referencia. Sin embargo, debido a que la variación intergrupala de la ubiquitina fue mayor, (Figura 20) Normfinder seleccionó al gen codificante para  $\beta$ -actina como el gen de referencia más apropiado. Esto concuerda con Nicot, et al. (2005) quienes demostraron que no existe una diferencia significativa al normalizar la expresión usando el gen más estable (detectado mediante geNorm) o una combinación de éste y algún(os) otro(s) de los genes calificados como estables [95].

El análisis con Bestkeeper mostró una fuerte correlación ( $0.882 < r < 0.919$ ) entre los 3 genes y el índice de referencia (Figura 20 y Tabla 14). A pesar de esto, el gen codificante para  $\beta$ -actina fue seleccionado como el más estable y el más adecuado para normalizar la gran mayoría de los genes problema evaluados (Tabla 13) al presentar un coeficiente de varianza (CV) similar y una variación (SD =0.76 ciclos) menor a la del índice de referencia (0.85 ciclos).

La consistencia del índice fue probada determinando la relación entre él y los 3 genes de referencia propuestos; en ambas pruebas (con y sin tubulina) se observó una buena correlación con un alto nivel de significancia ( $p < 0.001$ ). Sin embargo al eliminar a la tubulina del análisis, la relación entre actina/ubiquitina con el índice aumentó --

**Tabla 13.** Estadística descriptiva para los 3 candidatos a genes de referencia basados en el valor promedio de Cq. En las últimas dos columnas se muestran los parámetros para el índice de referencia calculado para 3 [act, tub, ubq] y 2 genes [act y ubq]

<i>Candidatos a genes de referencia (n=3)</i>					
Factor	Act	Ubq	Tub	Índice (n=3)	Índice (n=2)
N	14	14	14	14	14
MG	17.13	20.36	21.82	19.67	18.68
MA	17.15	20.41	21.92	19.71	18.70
Mín	16.28	18.69	18.82	17.54	16.93
Máx	18.36	23.05	26.08	22.04	20.26
SD ( $\pm C_T$ )	<b>0.76</b>	1.11	1.72	1.08	<b>0.85</b>
CV (%C <sub>T</sub> )	<b>4.41</b>	5.46	7.83	5.49	<b>4.55</b>
Mín [x-veces]	-3.61	-3.00	-6.66	4.09	3.25
Máx [x-veces]	2.34	5.86	14.60	4.78	2.91
SD ( $\pm x$ -veces)	<b>1.69</b>	2.16	3.29	2.05	<b>1.78</b>

*N: número de muestras; MG: media geométrica del C<sub>T</sub>; MA: media aritmética del C<sub>T</sub>; Mín y Máx: valores extremos del C<sub>T</sub>; SD [ $\pm C_T$ ]: desviación estándar del C<sub>T</sub>; CV [%C<sub>T</sub>]: coeficiente de varianza expresado como porcentaje del nivel de C<sub>T</sub>; Min [x-fold] and Max [x-veces]: valores extremos de expresión, proferido como el cambio absoluto en el coeficiente de sobreexpresión o subexpresión; SD [ $\pm x$ -veces]: desviación estándar de los coeficientes absolutos de regulación. Las 14 muestras usadas en el análisis corresponden a las mismas muestras analizadas en el ensayo de estabilidad, la tabla está ordenada de izq. a derecha en función de la variabilidad en la expresión, celdas sombreadas indican los datos más parecidos al índice de referencia calculado por el programa.*

aproximadamente 4% sin modificar el nivel de significancia [act r=0.953 y ubq r= 9.21].

Múltiples estudios realizados en células CHO en condiciones de hipotermia emplean el gen codificante para  $\beta$ -actina como gen de referencia en sus ensayos de qPCR aún cuando no se menciona si su estabilidad fue validada [39,148]. En contraste, Pfaffl, et al. [2004] afirman que tanto  $\beta$ -actina como GAPDH son genes de referencia inadecuados al no reflejar correctamente la cantidad de ARN<sub>tot</sub> adicionada en la reacción de transcripción reversa [104]. Por lo que hasta el momento, el único estudio exhaustivo que confirma la estabilidad del gen codificante para  $\beta$ -actina ante el estrés por frío fue realizado por Nicot, et al. [2005], quienes comparan la estabilidad de 7 genes de referencia comunes ante 3 tipos de estrés en plantas: osmolaridad, por frío y por ataque de plaga [95]. Considerando lo anterior y el hecho de que la ubiquitina participa en varias vías de señalización que culminan con la degradación de proteínas, se decidió utilizar el gen codificante para  $\beta$ -actina (*Actb*) para la normalización de la qPCR.

**Tabla 14.** Análisis de correlación de pares para los candidatos a genes de referencia. Los genes son correlacionados en pares uno con otro y posteriormente con el índice de referencia

<b>A) Correlación Pearson (n=3)</b>			
vs.	HKG 1 Act	HKG 2 Tub	HKG 3 Ubq
HKG 2	0.706	---	---
<i>p</i> -value	0.005	---	---
HKG 3	0.759	0.675	---
<i>p</i> -value	0.002	0.008	---
<b>BestKeeper vs.</b>	Act	Tub	Ubq
coeff. of corr. [r]	0.919	0.882	0.886
<i>p</i> -value	0.001	0.001	0.001
<b>Regresión lineal HKG vs Bestkeeper index</b>			
<b>BestKeeper vs.</b>	Act	Tub	Ubq
coeff. of corr. [r]	0.919	0.882	0.886
<i>coeff. of det. [r<sup>2</sup>]</i>	0.845	0.778	0.785
<i>p</i> -value	0.001	0.001	0.001

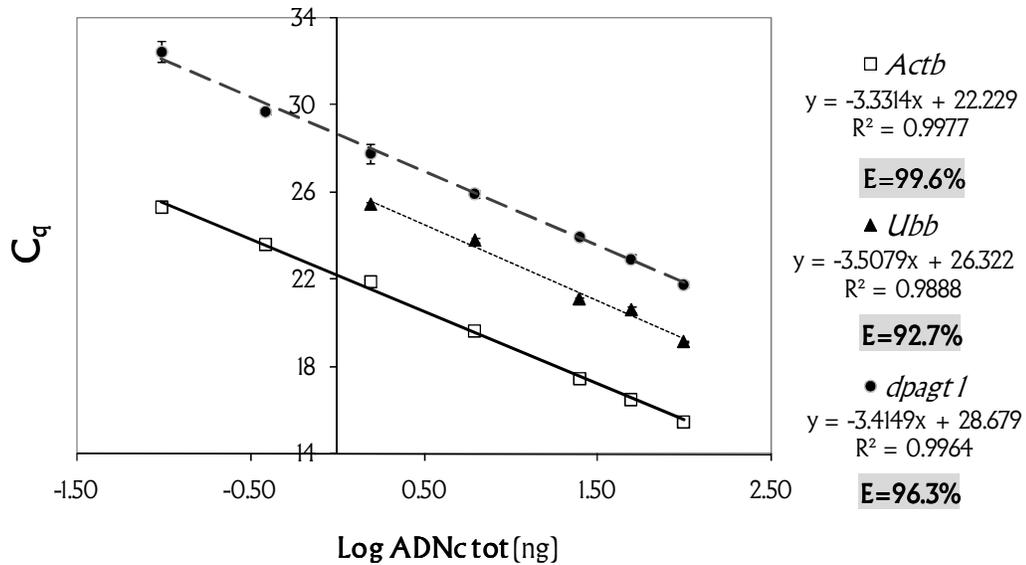
HKG: gen de referencia o housekeeping, los coeficientes de correlación se incrementan 3.5% para actina y 4% para ubiquitina al realizar la comparación sólo entre estos dos genes; siendo siempre actina el que correlaciona mejor con el índice bestkeeper. Celdas sombreadas corresponden a las mejores correlaciones

### 6.3.2.3. Eficiencia de amplificación, intervalo dinámico y validación del método de cuantificación relativa

Se ha reportado que la eficiencia de amplificación es afectada por factores como la preparación de la reacción, la calidad del templado, la presencia de inhibidores, el diseño de oligonucleótidos, las condiciones de reacción, la concentración de reactivos, el tamaño del amplicón y el contexto de la secuencia a amplificar. Por ello, la evaluación de la eficiencia de amplificación es un punto esencial en la optimización de la qPCR, pues de ella depende la precisión de la expresión calculada. [6,9,10,104,108].

Las eficiencias de amplificación para cada gen fueron determinadas a partir de la pendiente de la curva del ciclo de cuantificación [ $C_q$ ] en función del logaritmo de la concentración de ADNc [ng]. En la Figura 21 se muestran curvas típicas para algunos de los genes analizados. En general, una pendiente cercana a -3.32 implica una eficiencia del 100%, lo que significa que la cantidad de amplicón se duplica cada ciclo y se usa la ecuación característica de amplificación  $2^n$ . Por el contrario, si la eficiencia de amplificación

es del 80% la cantidad de amplicón se duplica aproximadamente cada 1.25 ciclos, implicando que el número de copias depende directamente de la eficiencia y la ecuación que describe la amplificación debe considerar este hecho. Se ha reportado que pendientes entre -3.1 y -3.7 son aceptables y una eficiencia de amplificación menor al 85% no es confiable para realizar una correcta cuantificación [103].



**Figura 21. Eficiencia de amplificación de los transcritos.** Se muestra el ajuste de mínimos cuadrados realizado para calcular la eficiencia de amplificación de tres genes diferentes, del lado derecho se muestran las ecuaciones obtenidas. La intercepción en el eje de las ordenadas corresponde al número de ciclos de PCR ( $C_q$ ) antes de que se detecte la señal de 1 ng del ADNc problema; *dpagt1* gen codificante para UDP N-acetil glucosamina-1-fosfato transferasa, *Actb*.  $\beta$ -actina, *Ubb*. ubiquitina. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados idénticos, pero quedan cubiertas por los datos, un coeficiente de correlación de hasta 0.97 se consideró aceptable [9]

En la Tabla 6 se muestran las eficiencias de amplificación para cada gen. Como se puede observar las eficiencias de amplificación oscilaron entre el 88 y el 105%, siendo los genes codificantes para tubulina y ubiquitina los que presentaron las eficiencias de amplificación más bajas (88 y 92.8% respectivamente), mientras los genes codificantes para DPM1, DPM2 y sialidasa presentaron una eficiencia de 105%. Por su parte, el gen codificante para  $\beta$ -actina tuvo una eficiencia cercana al 100% y similar a la mayoría de los genes de estudio. Esto toma particular importancia sí consideramos que “para realizar una estimación confiable de la expresión relativa de un gen, es imperativo que la eficiencia de amplificación del gen problema y del de referencia sean aproximadamente –

---

iguales”. Además el método de cuantificación relativa de doble delta  $C_q$ , sólo es válido cuando se cumple esta condición [9,105].

El intervalo dinámico de concentraciones o de amplificación exponencial debe ser determinado para cada transcrito, pues cada muestra genera un perfil de fluorescencia diferente e individual [103,104]. Así, definir el intervalo dinámico de cada gen garantiza que la cuantificación se realiza siempre en la región lineal de la curva y no en la fase de saturación donde existe una limitación de reactivos [103,104].

Los resultados del experimento anterior sugieren que la mínima cantidad de ADNc que puede ser amplificada está en el orden de 0.4 ng, por debajo de la cual la mayoría de los genes presenta amplificaciones inespecíficas después del ciclo 35 y una falta de reproducibilidad. Sólo el gen *Actb* fue amplificado con 0.1 ng de ADNc antes del ciclo 30. Algunos genes al ser de baja expresión (p.ej. aquellos codificantes para GlcNAcT I y sialidasa) presentaron un intervalo dinámico menor (de 1.5 a 100 ng), mientras que en el caso de la ubiquitina y tubulina, la pérdida de la linealidad de la curva por debajo de los 1.5 ng (Figura 21) se atribuye a que la cantidad de copias generadas por el dímero fue incluso mayor que la del amplicón, generando un error considerable al calcular la eficiencia que no pudo ser corregida.

Para determinar si dos reacciones de qPCR tenían la misma eficiencia de amplificación y para definir el intervalo de confianza dentro del cual el método de cuantificación relativa podía ser empleado, la variación del  $\Delta C_q$  en función del logaritmo de la concentración fue analizado mediante un ajuste de mínimos cuadrados (Figura 22) [10,104]. Idealmente el valor absoluto de la pendiente de esta curva debe ser menor a 0.1 (horizontal casi perfecta) implicando eficiencias de amplificación similares [103,104].

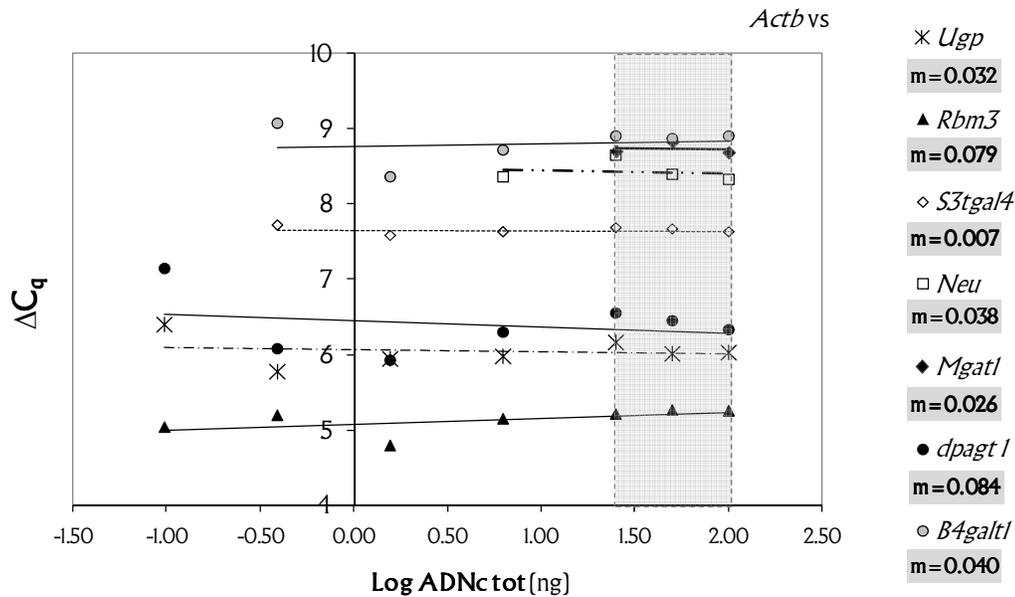
A partir de este experimento determinamos que el único gen que cumple la condición de validación para casi todos los genes es *Actb* ( $\beta$ -actina) y que usando entre 25 y 100 ng de ADNc la cuantificación mediante el método de  $C_q$  comparativo es válido y confiable, incluso para cuantificar genes con baja expresión como los genes codificantes para la sialidasa (*Neu*) y GlcNAcT I (*Mgat1*) (Figura 22, zona sombreada). Cabe resaltar que justo a la mitad del intervalo antes mencionado se encuentran la concentración que se había planteado con anterioridad como ideal para los ensayos (50 ng). Por su parte, los genes —

codificantes para tubulina y ubiquitina sólo cumplen con la condición de validación para una minoría de genes (Tabla 15) cuyo intervalo de confianza queda comprendido entre 1.5 y 100 ng.

**Tabla 15.** Resultados del experimento de validación del método del  $C_q$  comparativo, pendiente de algunas curvas de  $\Delta C_q$  en función del logaritmo de la concentración de ADNc

vs	Pendiente		
	<i>Actb</i>	<i>Ubb</i>	<i>Tubbl</i>
<i>St3gal4</i>	<b>0.007</b>	<b>0.007</b>	0.132
<i>Neu</i>	<b>0.038</b>	0.287	0.210
<i>dpagt1</i>	<b>0.084</b>	0.199	<b>0.099</b>
<i>Mgat1</i>	<b>0.026</b>	0.236	0.137
<i>B4galt1</i>	<b>0.040</b>	0.169	<b>0.069</b>
<i>UDPgalT</i>	0.129	0.360	0.499
<i>Rbm3</i>	<b>0.079</b>	0.197	<b>0.009</b>
<i>Ugp</i>	<b>0.032</b>	<b>0.058</b>	0.153

Las combinaciones gen problema-gen de referencia que cumplen la condición de  $m < 0.01$  se muestran en negritas



**Figura 22.** Curvas típicas para validar el método del  $C_q$  comparativo. El  $\Delta C_q$  para 63 combinaciones de gen de referencia-gen problema se graficó en función del logaritmo de la concentración de ADNc. Una pendiente menor a 0.1 fue el criterio para considerar válido el método de cuantificación. Se muestran las curvas y pendientes calculadas sólo para 7 genes distintos y la zona sombreada define el intervalo de confianza para la aplicación del método de cuantificación. Ugp: gen codificante para UDP-glucosa pirofosforilasa, *St3gal4*:  $\alpha(2,3)$  sialiltransferasa IV, *Neu*: sialidasa, *Mgat1*: GlcNAc-transferasa I, *B4galt1*:  $\beta(1,4)$  galactosiltransferasa.

#### 6.3.2.4. Efecto de la disminución de la temperatura sobre los niveles de expresión de genes relacionados con las vías de N-glicosilación

Actualmente los reportes que estudian el efecto de la temperatura sobre la calidad de glicoproteínas recombinantes producidas en células de mamífero, se enfocan principalmente en la consistencia del patrón de glicosilación de una variedad limitada de proteínas (Tabla 4). No obstante, hasta el momento en el que se escribe el presente trabajo, ningún otro reporte ha evaluado a nivel molecular, el efecto de la temperatura sobre las vías de N-glicosilación. Por ello, el impacto de la temperatura sobre la expresión de 14 enzimas representativas de las vías de N-glicosilación fue cuantificado mediante PCR en tiempo real.

En general, los cambios observados en la expresión de los genes estuvieron en función de la temperatura, del tiempo de cambio y del gen en particular; por lo que para facilitar su comprensión, los genes fueron clasificados según su función en 3 grupos: i) síntesis de oligosacáridos unidos a lípidos, ii) transportadores de azúcares activados, iii) glicosiltransferasas y glicosidasas. Los resultados se presentan y analizan agrupándolos de la misma forma.

##### *i) Síntesis de oligosacáridos unidos a lípidos*

Diversas enzimas están involucradas en la síntesis del N-oligosacárido conservado ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) que será transferido a los péptidos, entre ellas se encuentran la UDP-glucosa pirofosforilasa (UGPase) localizada en el citoplasma, la dolicol-fosfato manosiltransferasa (DPM) y la UDP N-acetil glucosamina-1-fosfato transferasa (DPAGTI), estas dos últimas localizadas en el retículo endoplásmico (RE) [19].

Específicamente, la UGPase cataliza la producción reversible de UDP-glucosa y pirofosfato (PPi), a partir de glucosa-1-fosfato y UTP [87]. La DPAGTI cataliza la formación de N-acetilglucosamina dolicolfosfato (NAcGlc-PP-Dol) a partir de NAcGlc-1-P y Dol-P, iniciando la síntesis del oligosacárido  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ , y por lo tanto la vía de N-glicosilación [46]. Por otro lado, DPM1 y DPM2, corresponden a la subunidad catalítica y reguladora (respectivamente) de la enzima trimérica DPM sintasa, encargada de sintetizar dolicolfosfo- $\beta$ -manosa (Dol-P-Man) a partir de dolicolfosfato (Dol-P) y GDP-manosa en el RE [81]. Se ha demostrado que en levaduras, Dpmlp interacciona directamente con la --

---

fosfatasa lipídica, regulando los depósitos de fosfatidilinositol-4- fosfato, así como el tráfico vesicular entre el RE y el aparato de Golgi [38].

La Figura 23A muestra el efecto de la temperatura sobre los genes codificantes para la UGPase (*Ugp*), DPM1 (*dpm1*), DPM2 (*dpm2*) y DPAGT1 (*dpgat1*). Como se puede observar, la expresión de *Ugp* fue altamente dependiente de la temperatura, permaneciendo relativamente constante en los cultivos a 30°C, mientras que en los cultivos a 32°C su expresión incrementó proporcionalmente al tiempo de cambio entre 1.5 y 2 veces respecto a 37°C. En concordancia, se ha reportado que condiciones de estrés tales como cultivar hibridomas a 33°C por 16 horas, la hiperacumulación de glicógeno en músculo esquelético o la exposición de plantas a 4°C, causan una sobreexpresión del gen *Ugp*, resultando en un incremento de la actividad enzimática [87,142]; mientras que el estrés por acumulación de amonio en cultivos de células CHO disminuye su expresión [5].

Se sabe que la localización subcelular de la UGPase está regulada por la proteína serin/treonin cinasa (PASK), que es un integrador sensorial que coordina el destino de la glucosa dependiendo de la demanda metabólica [50,87]. Por lo que la sobreexpresión del gen *Ugp* en los cultivos a 32°C, sugiere un incremento en la actividad enzimática, que puede estar relacionado con el aumento observado en la productividad y el supuesto cambio de combustible metabólico (Figura 16). En el caso de los cultivos a 30°C la expresión constante del gen podría indicar el mantenimiento de la homeostasis energética.

En la Figura 23A, se observa que al disminuir la temperatura (30 y 32°C) *dpm1* se sobreexpresa proporcionalmente al tiempo de cambio, mostrando el mayor incremento en el cultivo escalonado a 30°C con cambio a las 72 h (1.95 veces) y permaneciendo constante en el cultivo control a 32°C. Por otro lado, el gen *dpm2* solo se sobreexpresó en los cultivos escalonados a 30°C y en el cultivo a 32°C con cambio a las 72 h, incrementando 1.8 veces en el escalonado a 30°C con cambio a las 72 h.

Por su parte, la expresión de *dpgat1* fue 1.7 y 2 veces menor en los cultivos control a 30 y 32°C (respectivamente) y 1.5 veces menor en el escalonado a 30°C con cambio a las 48 h, respecto a 37°C. Mientras que en los escalonados a 32°C la expresión de *dpgat1* permaneció relativamente constante. Por el contrario en el escalonado a 30°C con cambio a las 72 h, se observó una sobreexpresión de 1.5 veces respecto a 37°C que –

---

podría estar favoreciendo la actividad enzimática, y por tanto la síntesis del N-glicano conservado; pues se ha demostrado que la actividad de DPAGT1 está regulada a nivel transcripcional. Por ejemplo, se sabe que el silenciamiento del gen *dpagt1* es letal en levaduras y células de ratón, mientras que su sobreexpresión impide la síntesis del N-glicano conservado e induce la acumulación de Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol, ya sea incrementando la actividad de la DPAGT1 (agotamiento de los depósitos de DPM) o inhibiendo proteínas involucradas en la manosilación [46].

Los datos obtenidos sugieren que el incremento en la expresión de *dpagt1*, *dpm1* y *dpm2* en los cultivos escalonados con cambio a las 72 h (particularmente a 30°C), pudo haber favorecido la síntesis oligosacáridos unidos a lípidos (p.ej.DPM) promoviendo el tráfico vesicular y la síntesis del N-glicano conservado. No obstante, en los controles a baja temperatura parece que esto no se cumple, pues la expresión de *dpagt1* disminuyó significativamente y la de *dpm1* incrementó, sugiriendo la existencia de un desbalance de oligosacáridos unidos a lípidos que podría afectar el ensamble del N-glicano conservado.

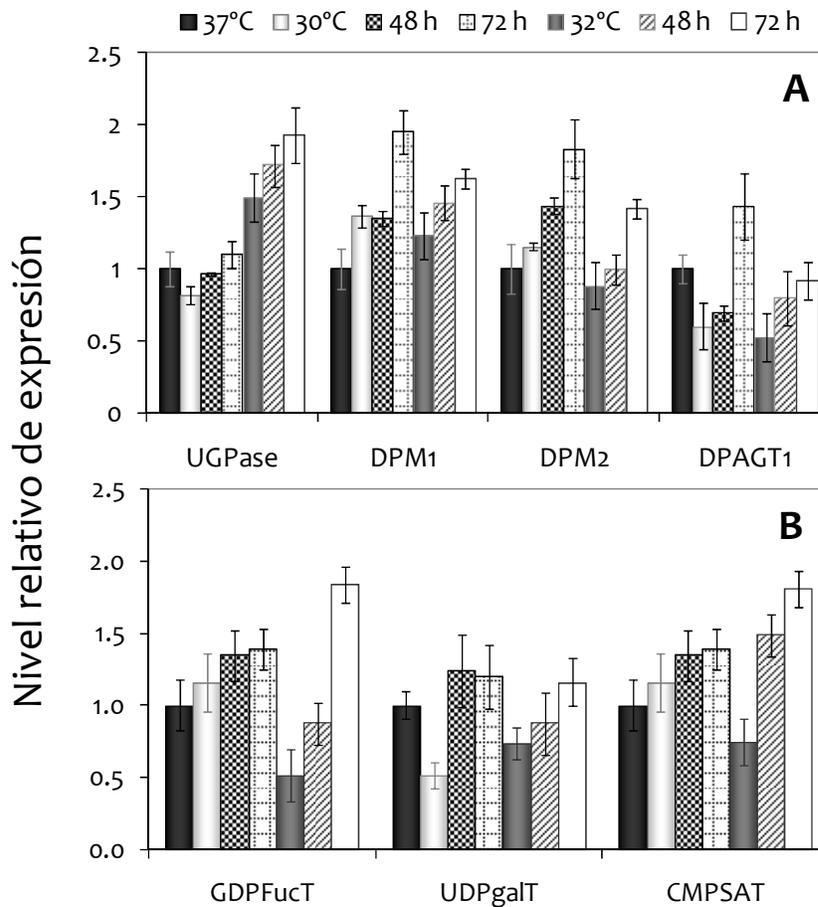
### *ii) Transportadores de azúcares activados*

Los transportadores de azúcares activados (NTS) están localizados principalmente en el aparato de Golgi y su función consiste en translocar azúcares-nucleótido (producidos en el citoplasma) al interior de este organelo, donde sirven como sustrato para la elongación de las cadenas de oligosacáridos; por lo que son indispensables para la síntesis de glicoconjugados y constituyen un punto de regulación importante en las vías de N-glicosilación [67]. En particular, se ha reportado que “el transporte de azúcares-nucleótido del citosol al RE y aparato de Golgi es altamente dependiente de la temperatura y la concentración de sustratos” [85].

En la Figura 23B se muestra el efecto de la temperatura sobre la expresión de los genes codificantes para los transportadores de GDP-fucosa (GDPFucT), UDP-galactosa (UDPgalt) y CMP-ácido siálico (CMPSAT). Como se puede observar el gen codificante para GDPFucT (*Slc35c1*) permaneció relativamente constante en los cultivos a 30°C independientemente del tiempo de cambio, mientras que a 32°C la expresión del gen fue variable, siendo hasta 2 veces menor en el cultivo control e incrementando 1.8 veces en el escalonado con cambio a las 72 h, respecto a 37°C. La expresión del gen codificante para -

UDPgalT (*Slc35a2*) permaneció relativamente constante en los cultivos escalonados pero fue 1.4 y 2 veces menor en los cultivos control a 32 y 30°C, respecto a 37°C.

Por su parte, la expresión del gen codificante para CMPSAT (*Slc35a1*) permaneció relativamente constante para los cultivos control y escalonado con cambio a las 48 h a 30°C [diferencia no significativa y menor a 1.35 veces], mientras que en el control a 32°C la expresión disminuyó ligeramente [33%] pero no se consideró significativo. En el resto de los cultivos [i.e. escalonados a 32°C y escalonado a 30°C con cambio a las 72 h] la expresión del gen aumentó entre 1.4 y 1.8 veces ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 23. Efecto de la disminución de la temperatura sobre la expresión de genes involucrados en la síntesis de oligosacáridos unidos a lípidos (A) y transportadores de azúcares activados (B).** La expresión de los genes codificantes para: la UDP-glucosa pirofosforilasa (UGPase), dolicol-fosfato manosiltransferasa subunidad 1 y 2 (DPM1 y DPM2), UDPN-acetil glucosamina-1-fosfato transferasa (DPAGT1), transportador de UDP-galactosa (UDPgalT), CMP-ácido siálico (CMPsial) y transportador de GDP-fucosa (GDPFuc), fue determinada a las 72 y 96 h de cultivo y se representa como el cociente normalizado respecto al gen *Actb* y al cultivo control a 37°C (nivel relativo de expresión). Los datos representan la media y le desviación estándar de triplicados [30°C] y duplicados [32°C] experimentales. Un nivel relativo de expresión de 0.5 implica una disminución de 2 veces en la expresión de un gen.

---

Usualmente se asume que el incremento en la expresión del transportador de azúcar activado implica por ende un incremento en la actividad de la glicosiltransferasa asociada [28]. Así, el incremento observado en la expresión del transportador de GDP-fucosa en los cultivos escalonados con cambio a las 72 h, sugiere un incremento en los procesos de fucosilación. Sin embargo, se requiere analizar la expresión del gen codificante para fucosiltransferasa y determinar el patrón de glicosilación para concluir al respecto. En particular, la expresión de los genes codificantes para UDPgalT y CMPSAT, no corresponde por completo con la expresión de las transferasas asociadas, tal como se discute más adelante.

A pesar de lo anterior, se puede observar que la expresión de los genes codificantes para GDPFucT y CMPSAT (en función de los diferentes tipos de cultivos) es relativamente similar, sugiriendo una regulación transcripcional coordinada comparable a la observada por Huopaniemi, et al. [2004] en casos de inflamación aguda provocada por aloinjertos de corazón y riñón [58].

En conjunto nuestros resultados sugieren que la elongación del N-glicano podría estar afectada a baja temperatura, probablemente debido a una limitación en el transporte de azúcares activados (UDPgal) y/o síntesis de oligosacáridos unidos a lípidos (GlcNAc-PP-Dol) específicamente en el caso de los cultivos control a 30°C, en los cuales la expresión de los genes codificantes para UDPgalT y DPAGTI disminuye significativamente.

### *iii) Glicosiltransferasas y glicosidasas*

La elongación y remodelación del N-glicano unido al péptido depende de la actividad de gran variedad de glicosiltransferasas y glicosidasas localizadas a lo largo de la vía secretoria [RE-Golgi] [19,56,126]. Estas enzimas están finamente reguladas, son expresadas diferencialmente y altamente dependientes de las condiciones de cultivo [8,31,63,128]

El efecto de la disminución de la temperatura sobre la expresión de los genes codificantes para la N-acetil glucosaminiltransferasa I (GlcNAc-TI),  $\beta(1,4)$ -galactosa transferasa (B4galT) y  $\alpha(2,3)$ -sialiltransferasa IV (SialT IV) se muestra en la Figura 24A. Concretamente la expresión del gen codificante para GlcNAc-TI (*Mgat1*) disminuyó entre-

---

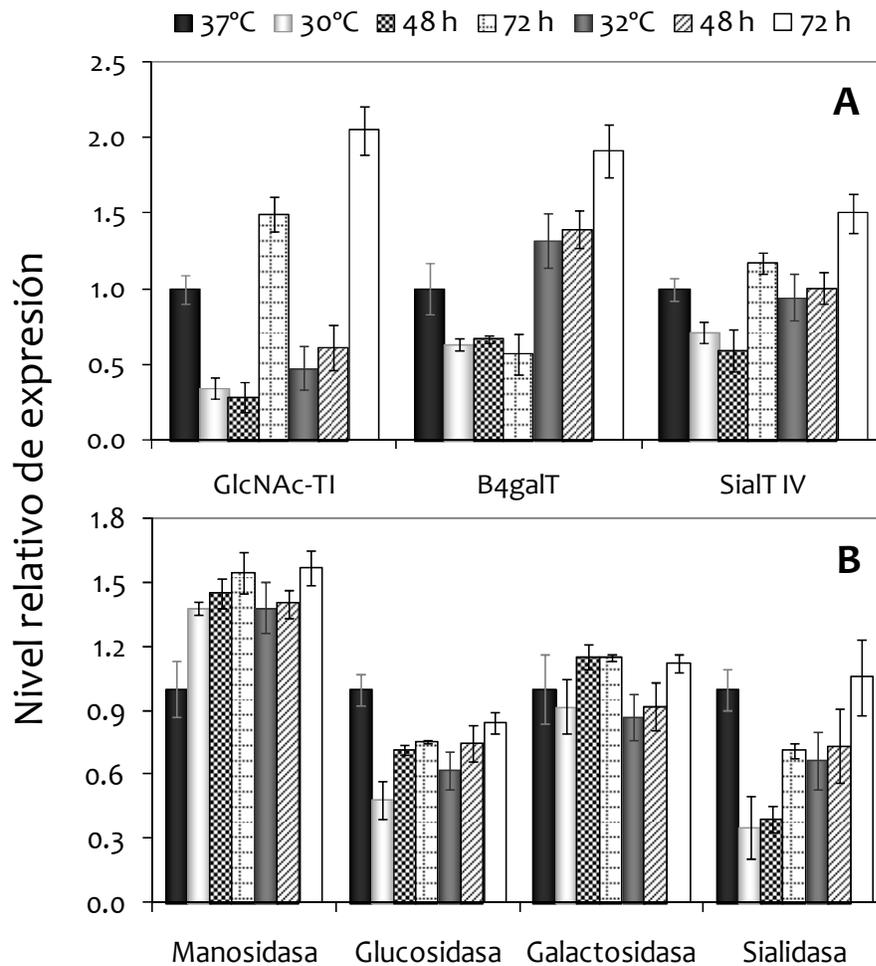
1.6 y 3.5 veces [respecto a 37°C] en los cultivos control y escalonados con cambio a las 48h, tanto a 30 como a 32°C; mientras que en los escalonados con cambio a las 72 h la expresión de gen incrementó entre 1.5 y 2 veces respecto a 37°C. La expresión del gen codificante para B4galT (*B4galt*) fue hasta 1.8 veces menor en los cultivos a 30°C, permanece relativamente constante en el control a 32°C y se incrementa entre 1.4 y 1.9 veces en los escalonados a 32°C. Por otro lado, la expresión del gen codificante para SialT IV (*St3gal4*) a 30°C fue 1.4 y 1.7 veces menor [respecto a 37°C], para el control y escalonado con cambio a las 48 h, permaneció relativamente constante en el control y escalonado con cambio a las 48 h a 32°C y en el escalonado a 30°C con cambio a las 72 h. Únicamente el escalonado a 32°C con cambio a las 72 h presentó una ligera sobreexpresión (1.5 veces) del gen *St3gal4* ( $p \leq 0.005$ ).

Considerando que los cambios observados en la expresión de los genes codificantes para las glicosiltransferasas son atribuidos únicamente a la disminución de la temperatura, que dichos cambios pueden reflejarse en la actividad enzimática en el aparato de Golgi, así como el hecho de que la extensión de la cadena de N-glicanos es secuencial, entonces la disminución observada en la expresión de *Mgat1* y *B4galt* (Figura 24A) sugiere una alteración importante (i.e. disminución) en la galactosilación de proteínas en los cultivos a 30°C [excepto para el escalonado con cambio a las 72 h]. Posiblemente la mayor afectación se presentaría en el cultivo control, debido a una limitación en el transporte de UDP-galactosa hacia de Golgi provocada por la disminución en la expresión del transportador (Figura 23B).

Dada la secuencialidad de las reacciones de N-glicosilación, lo anterior también podría sugerir una reducción en los procesos de sialilación [no habría residuos de galactosa unidos al N-glicano precursor] que correspondería con la disminución observada en la expresión del gen *St3gal4* (al menos en el control a 30°C y escalonado con cambio a las 48 h), aún cuando la expresión del gen codificante para CMPSAT (*Slc35a1*) se mantiene constante.

En contraste, la sobreexpresión de *B4galt* a 32°C en el control y escalonado con cambio a las 48 h, no corresponde con la disminución en la expresión del gen codificante para GlcNAc-T 1, ni con la expresión constante de los genes codificantes para UDPgalT y-

SialT IV, y la sobreexpresión del gen codificante para CMPSAT. Suponiendo que la síntesis del N-glicano conservado no fue afectada (la expresión de los genes involucrados fue constante o aumentó, Figura 23), la sobreexpresión de los genes codificantes para B4galT y CMPSAT posiblemente se deba a un aumento en la demanda de glicoproteínas por procesar en el aparato de Golgi (incremento en la IgG<sub>máx</sub>). No obstante, los datos presentados son insuficientes para determinar en que grado la disminución de la expresión de *Mgat1* afectaría los procesos de galactosilación y sialilación a esta temperatura.



**Figura 24. Efecto de la disminución de la temperatura sobre la expresión de genes codificantes para glicosiltransferasas (A) y glicosidasas (B).** La expresión de la N-acetil glucosaminiltransferasa I (GlcNAc-TI),  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa (4galT),  $\alpha(2,3)$ -sialiltransferasa IV (SialT IV), endomanosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa I,  $\beta$ -galactosidasa I y sialidasa fue determinada a las 72 y 96 h de cultivo y se representa como el cociente normalizado respecto al gen *Actb* y al cultivo a 37°C (nivel relativo de expresión). Los datos representan la media y la desviación estándar de triplicados (30°C) y duplicados (32°C) experimentales. Un nivel relativo de expresión de 0.5 implica una disminución de 2 veces en la expresión de un gen.

---

En la Figura 24B se muestra el efecto de la disminución de la temperatura sobre la expresión de los genes codificantes para la manosidasa (*Manea*),  $\alpha$ -glucosidasa I (*Gaa*),  $\beta$ -galactosidasa I (*GlbI*) y sialidasa (*Neu*). Se observa que la expresión del gen *Manea* se incrementa entre 1.4 y 1.6 veces independientemente de la temperatura, presentando los mayores incrementos en los escalonados con cambio a las 72 h para ambas temperaturas. La expresión de *Gaa* se redujo entre 16 y 52% para todos los cultivos y la expresión de *GlbI* se mantuvo relativamente constante independientemente de la temperatura y tiempo de cambio. Por otro lado, la expresión de *Neu* disminuyó para todos los cultivos a 30°C, siendo entre 26 y 64% menor respecto a 37°C; mientras que en los cultivos a 32°C su expresión permaneció relativamente constante (Figura 24B). Más adelante estos resultados se correlacionaron con la actividad extracelular de algunas de estas enzimas.

En conjunto, una mayor susceptibilidad a la temperatura fue observada en la expresión de los genes codificantes para enzimas localizadas en el aparato de Golgi respecto a aquellas localizadas en el RE. De manera general y ubicando las observaciones anteriores como parte de un proceso único, resulta evidente que a baja temperatura se podría producir un desequilibrio entre los primeros pasos que consisten en la síntesis del N-glicano conservado, y los pasos de ramificación del mismo al final de la vía (adición de NAcGlc, galactosa y ácidos siálico), pudiendo generar una mayor microheterogeneidad del N-glicano unido al AcMo.

Un caso particular lo representan los cultivos escalonados con cambio a las 72 h a ambas temperaturas, donde la expresión de la gran mayoría de genes analizados se incrementó, sugiriendo que en estos cultivos la vía de N-glicosilación es más activa respecto a 37°C y planteando la posibilidad de que en estos cultivos, el patrón de glicosilación pueda mantenerse consiste respecto al de 37°C, pero con una mayor productividad. No obstante, todas las suposiciones anteriores deben ser confirmadas analizando el patrón de glicosilación y observando si los cambios en la expresión de la enzimas se reflejan en el patrón de glicosilación final del AcMo-IL8.

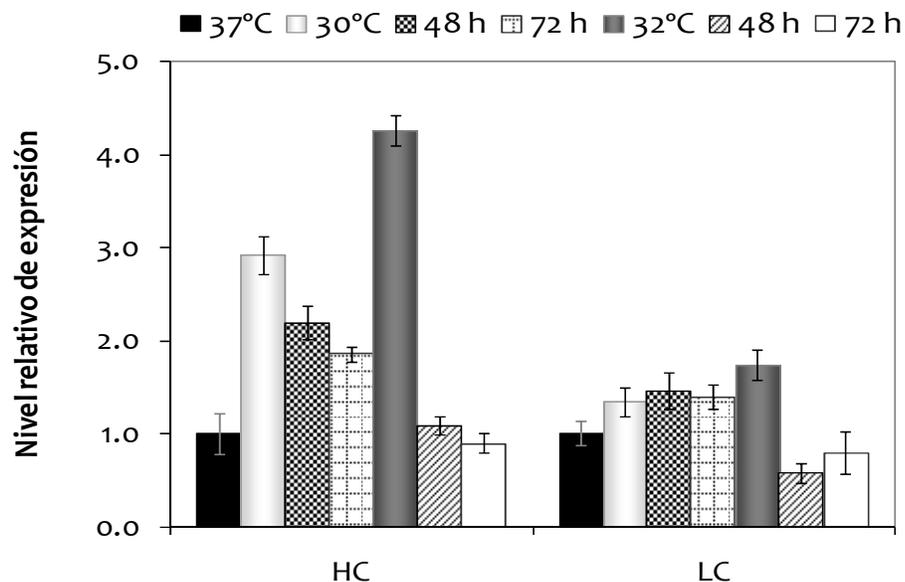
#### 6.3.2.5. Efecto de la disminución de la temperatura sobre la expresión de los genes codificantes para: la proteína recombinante, chaperonas del RE y proteínas de choque térmico por frío

El incremento en el nivel relativo de ARNm de diversas proteínas recombinantes producidas en condiciones de hipotermia moderada, ha sido reportado y se ha propuesto como una explicación al incremento observado en la productividad [3,40,84,147]. Por ello, para determinar si el incremento de la productividad a baja temperatura correspondía con un incremento en la transcripción del AcMo-IL8, la expresión de los genes codificantes para la cadena ligera (LC) y pesada (HC) fue cuantificada por qPCR.

Como se puede observar en la Figura 25, a 30°C la expresión del gen codificante para la cadena pesada (*hc*) aumenta de manera inversamente proporcional al tiempo de cambio, presentando una sobreexpresión de hasta 2.9 veces en el control y de 1.8 veces en el escalonado con cambio a las 72 h. Mientras tanto, la expresión de *hc* en el control a 32°C aumentó 4.2 veces respecto a 37°C y se mantuvo relativamente constante en ambos cultivos escalonados.

Por otro lado, la expresión del gen codificante para la cadena ligera del AcMo-IL8 (*lc*) fue más homogénea (Figura 25), incrementando aproximadamente 1.5 veces en los cultivos a 30°C y 1.7 veces en el control a 32°C, en el cultivo escalonado a 32°C con cambio a las 48 h la expresión de *lc* disminuyó 1.7 veces y en el escalonado con cambio a las 72 h no hubo un cambio significativo respecto a 37°C (disminuyó  $1.26 \pm 0.22$  veces, cuando se estableció un cambio mínimo de 1.35).

El comportamiento observado en la expresión de los genes codificantes para el AcMo-IL8 es consistente con lo reportado por diversos autores; por ejemplo, Jiang y Sharfstein (2008) observaron una respuesta diferente en la transcripción de la HC y LC de un AcMo al adicionar butirato de sodio, donde la expresión de *hc* incrementó entre 1.1 y 4 veces respecto al control, mientras que “los cambios en el ARNm de LC mostraron mayores fluctuaciones, desde una disminución del 20% hasta un incremento de 5 veces” [65]. Asimismo, Marchant, et al. (2008) reportaron un incremento en la expresión de gen codificante para la cadena ligera de una IgG<sub>4</sub> quimérica producida en cultivos escalonados de células CHO a 27 y 32°C [84].

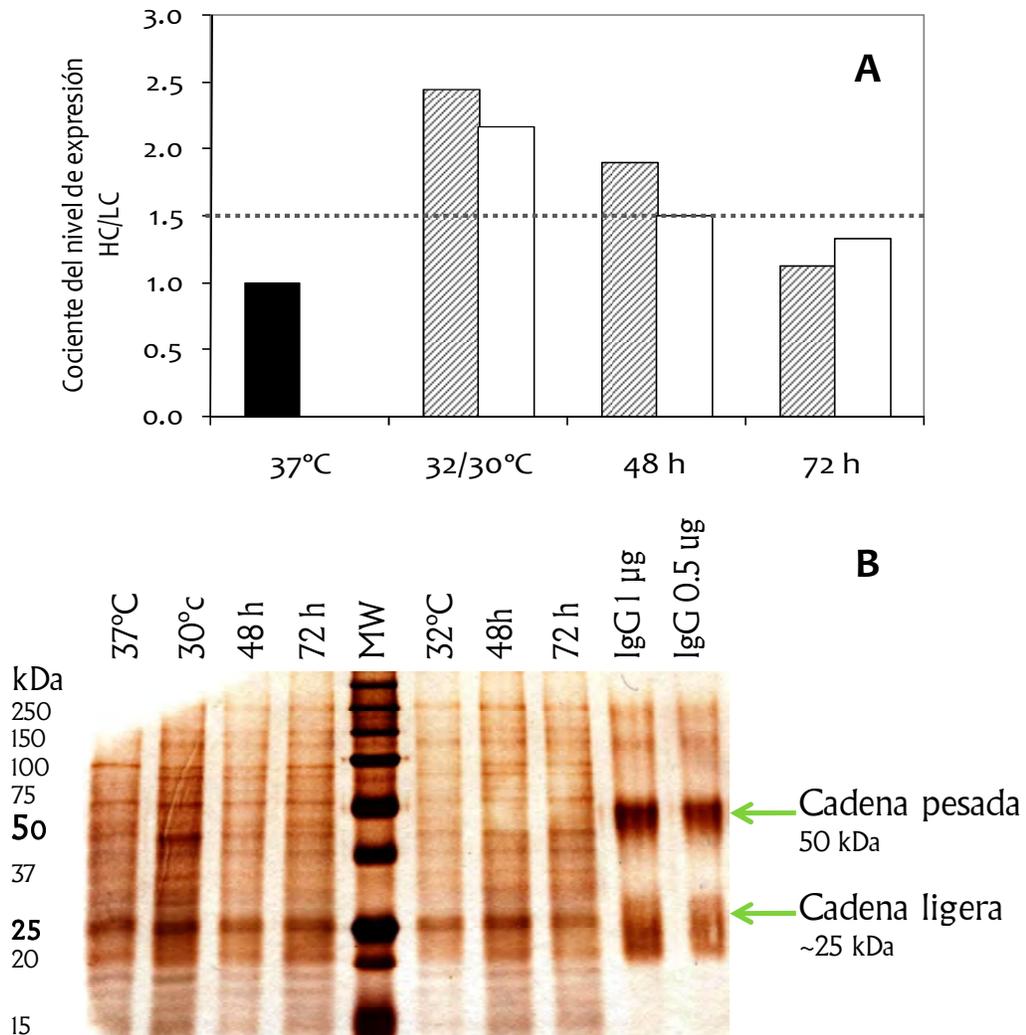


**Figura 25. Efecto de la disminución de la temperatura sobre la expresión de los genes codificantes para la cadena pesada (HC) y ligera (LC) del AcMo-IL8.** La expresión de la cadena pesa (HC) y ligera (LC) del AcMo, fue determinada a las 72 y 96 h de cultivo y se representa como el cociente normalizado respecto al gen *Actb* y al cultivo a 37°C (nivel relativo de expresión). Los datos representan la media y le desviación estándar de triplicados (30°C) y duplicados (32°C) experimentales.

Jiang y Sharfstein [2008] encontraron que con una relación (a nivel ARNm) HC:LC cercana a 1.5 se obtiene la máxima productividad de AcMo producido en células CHO [65,84,148], mientras que cocientes menores mejoran la utilización de la cadena pesada; es decir, se generan mayores rendimientos de AcMo por copia de ARNm de HC [65].

El cociente de los niveles de expresión [HC/LC] calculado para todos los cultivos se muestra en la Figura 26A. Se puede observar que los cultivos que presentaron un cociente menor a 1.5 (escalonados con cambio a las 72 h para ambas temperaturas) son justamente aquellos que presentaron el metabolismo más eficiente y las mayores productividades específicas y volumétricas. Por el contrario, en los cultivos control a 30 y 32°C donde la  $q_p$  fue menor respecto a 37°C, el cociente de expresión HC/LC fue de 2.5 y 2.3 respectivamente. Sugiriendo que es la expresión del gen codificante para la cadena ligera, la que condiciona la producción y ensamble del AcMo-IL8, esto coincide con lo reportado por diversos autores [84,148].

Al analizar los sobrenadantes de cada cultivo mediante SDS-PAGE, se determinó que el incremento en los niveles de expresión no se reflejaron a nivel proteína (particularmente de HC), pues se observó una mayor proporción de cadena ligera respecto a la cadena pesada (Figura 26B), posiblemente debido a una limitación en la traducción y/o secreción del AcMo.



**Figura 26. Cociente de la expresión relativa HC/LC y producción de cadena pesada y ligera del AcMo-IL8 a baja temperatura.** En (A) se muestra el cociente de la expresión relativa del gen codificante para la cadena pesada (HC) respecto a la expresión relativa del gen codificante para la cadena ligera (LC) en los cultivos a 32°C (barras rayadas), 30°C (barras blancas) y 37°C (barra negra); la línea punteada indica un cociente HC/LC=1.5, al cual se ha reportado la máxima productividad de AcMo producido en células CHO [65]. En (B) Se muestra un gel desnaturalizante al 12% teñido con sales de plata en el que se cargaron 10 µg de proteína total del sobrenadante de cada cultivo colectado a las 120 h. MW: marcador de peso molecular, 48 y 72 h tiempo de cambio de los cultivos escalonados; IgG 0.5 y 1 µg de IgG humana estándar.

---

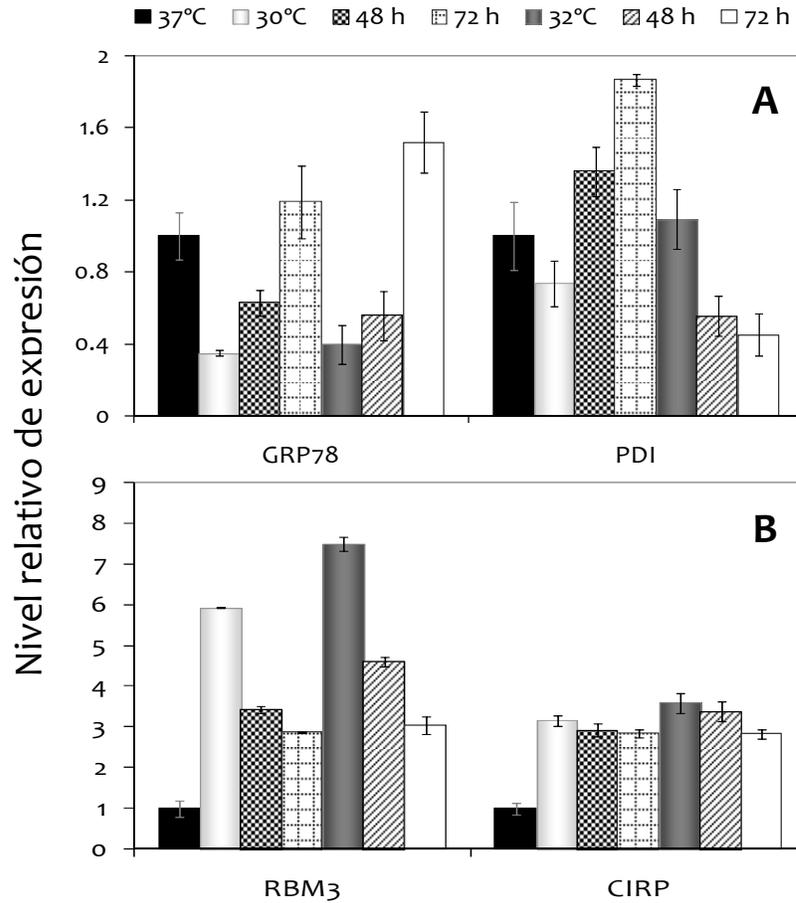
Se ha reportado que en linfocitos, la producción de AcMo está limitada a nivel post-transcripcional y depende de una coordinación entre la expresión, plegamiento y ensamble de ambas cadenas [33]. Teóricamente las cadenas pesadas que no se unen a cadenas ligeras no pueden dejar el RE al ser retenidas por GRP78, provocando que se acumulen y eventualmente sean degradadas; mientras que la tasa de plegamiento de cadenas ligeras es mayor, pudiendo ser secretadas como dímeros o monómeros sin haberse unido a la cadena pesada [33]. Este mecanismo de retención de HC parece ser generalizado para diversas líneas celulares. Se ha reportado para células CHO, que la sobreexpresión de LC minimiza la acumulación de HC mal plegadas, incrementando la tasa de plegamiento y ensamble del AcMo y reduciendo por ende el estrés en RE [65,84,116].

Para determinar si la disminución de la temperatura limitaba la secreción del AcMo-IL8, la expresión de los genes codificantes para la proteína de 78 kDa regulada por glucosa (GRP78) y para la proteína disulfuro isomerasa (PDI), fue evaluada por qPCR. Ambas chaperonas están localizadas en el RE y participan en el plegamiento y en la respuesta proteínas mal plegadas en el RE (UPR); siendo GRP78 el regulador maestro de dicha vía [118].

En la Figura 27A se muestran los niveles relativos de expresión de los genes codificantes para GRP78 (*Hspa5*) y PDI (*P4hb*). Como se puede observar, la expresión de *Hspa5* fue entre 1.6 y 2.9 veces menor para los cultivos control y escalonados con cambio a las 48 h a ambas temperaturas, respecto a 37°C. Mientras que en los escalonados con cambio a las 72 h la expresión permaneció constante (30°C) o se incrementó 1.5 veces (32°C). Por otro lado, la expresión de *P4hb* fue altamente dependiente de la temperatura y del tiempo de cambio; por ejemplo, en los escalonados a 30°C su transcripción aumenta entre 1.4 y 1.9 veces proporcionalmente al tiempo de cambio, permanece relativamente constante en los cultivos monotérmicos y disminuye en los escalonados a 32°C, siendo el cultivo escalonado a 32°C con cambio a las 72 h, el que tuvo la menor expresión (2.2 veces menor respecto a 37°C).

Se ha planteado que el aumento en la expresión de *Hspa5*, es indicativo de una mayor traducción de GRP78 y de la activación de UPR como parte importante de los mecanismos que controlan el daño asociado al estrés en el RE [1,25,47,83,118,122]. Mientras

que la expresión y traducción de PDI no sólo son inducidas al activarse la UPR, sino también durante el choque frío y como resultado de adicción de butirato de sodio al medio de cultivo [73,118]; de tal forma que se ha demostrado que la sobreexpresión de PDI en células CHO incrementa un 40% la productividad específica de AcMo [12,73].



**Figura 27. Efecto de la disminución de la temperatura sobre la expresión de los genes codificantes para chaperonas del RE (A) y proteínas de choque frío (B).** La expresión de la proteína regulada por glucosa de 78 kDa [GRP78], la proteína disulfuro isomerasa (PDI), la proteína con motivos de unión a ARN (RBM3) y la proteína de unión a ARN inducible por frío [CIRP], fue determinada a las 72 y 96 h de cultivo y se representa como el cociente normalizado respecto al gen *Actb* y al cultivo a 37°C (nivel relativo de expresión). Los datos representan la media y la desviación estándar de triplicados (30°C) y duplicados (32°C) experimentales.

Considerando lo anterior, la disminución de la expresión de *Hspa5* en los cultivos monotérmicos y escalonados con cambio a las 48 h, puede deberse a la represión génica global que se desata como parte de la respuesta al choque frío [2], limitando la capacidad de contender con el estrés que resulta del incremento en la carga de proteína recombinante

---

a procesar. En respuesta, la inducción de la expresión de otras chaperonas como PDI, podría sustituir la función de adaptación de GRP78, esto corresponde con la sobreexpresión de *P4hB*, al menos en el escalonado a 30°C con cambio a las 48 h. Esta última propuesta concuerda con las observaciones de Suzuki, et al. (2007), quienes demostraron que el silenciamiento de *Hspa5* en células HeLa activa la vía IRE1p-XBPI de la UPR, provocando la sobreexpresión de los genes codificantes para CHOP (30 veces), GRP94 (6 veces) ERdj4 (8 veces) y PDI (9 a 10 veces) e induce apoptosis, sin registrarse una activación de la vía mediada por PERK [129].

En particular en el escalonado a 30°C con cambio a las 72, donde la expresión de *Hspa5* permanece constante, la capacidad de plegamiento en el RE posiblemente fue acelerada por la sobreexpresión de *P4hB* y se haya reflejado en el incremento de la productividad. No obstante, la razón por la cual a 32°C no sólo no se induce la expresión de *P4hB*, sino que además se abate (escalonados) se desconoce.

En general, los cambios observados en la expresión de GRP78 y PDI al disminuir la temperatura, sugieren una alteración en la vía de secreción RE-Golgi-membrana y en los procesos asociados como la N-glicosilación. Sin embargo, nuestros resultados son insuficientes para definir si la UPR fue activada, por lo que sería interesante estudiar la expresión de algunos de los principales reguladores de la UPR, concretamente los 3 transductores principales (PERK, IRE1 y ATF), además de XBPI y CHOP.

Finalmente, como indicadores de la respuesta molecular al estrés por frío, la expresión de los genes codificantes para la proteína con motivos de unión a ARN (RBM3) y la proteína de unión a ARN inducible por frío (CIRP), fue determinada. Como se había comentado anteriormente CIRP y RBM3 son chaperonas encargadas de proteger y favorecer la traducción y estabilidad de ciertos ARNm; siendo señaladas como las principales moduladoras de la expresión genética en condiciones de hipotermia moderada, y de incrementar la tolerancia celular a condiciones de estrés por frío [2,36].

Como se puede observar en la Figura 27B, el gen codificante para RBM3 (*Rbm3*) se sobreexpresó entre 2.8 y 7.5 veces de manera inversa al tiempo de cambio para ambas temperaturas, siendo los cultivos control los que presentaron los mayores incrementos (6 veces a 30°C y 7.5 veces a 32°C). Por otra parte, el gen codificante para CIRP (*Cirpb*)

---

se sobreexpresó aproximadamente 3 veces en los cultivos a 30°C independientemente del tiempo de cambio, mientras que a 32°C *Cirpb* se sobreexpresó 3.6 veces en el cultivo control, 3.3 veces en el escalonado con cambio a las 48 h y sólo 2.8 veces en el escalonado con cambio a las 72 h.

El comportamiento en función del tiempo de cambio de temperatura en la expresión de *Rbm3*, pudo ser resultado ya sea de una inducción *de novo* en su transcripción y/o de la acumulación debida a la estabilización de su propio mensajero [2,36]. Por otra parte, se sabe que *Cirpb* se expresa constitutivamente a 37°C y que su ARNm no es estabilizado al reducir la temperatura, por lo que el incremento en su transcripción es transitoria y altamente dependiente del choque frío; además se ha demostrado que su expresión sólo se induce en condiciones de hipotermia moderada pero no en condiciones de frío severo (menos de 15°C) [2,36]. Esto último explicaría por qué a 32°C la expresión de *Cirpb* fue ligeramente mayor respecto a los cultivos a 30°C, confirmando que hay una relación inversa entre la disminución de la temperatura y la función de dicha proteína. Curiosamente la relación temperatura-expresión de *Rbm3* fue similar a la de *Cirpb*, sugiriendo que la respuesta al choque frío no fue la misma a pesar de ser sólo 2 grados de diferencia.

En general, el hecho de que la mayor expresión de ambos genes ocurriera en los cultivos control sugiere que en ellos se monta una respuesta de estrés más severa y prolongada respecto a los escalonados, entrando en juego una vez más el contexto en el que se encontraban las células antes de la disminución de la temperatura. Cabe resaltar que la proporción que guardaron la expresión de estas proteínas entre las 2 temperaturas analizadas es aproximadamente similar a la observada en el incremento en la expresión del gen codificante para HC. Así, es probable que el incremento en la transcripción de HC se deba a la acumulación y estabilización del ARNm a través de su unión a RBM3 y/o CIRP. No obstante, los datos presentados son insuficientes para afirmar o refutar la propuesta anterior, quedando como una perspectiva interesante analizar sí hay una interacción física entre estas chaperonas y el ARNm del AcMo-IL8.

---

Nuestros resultados sugieren que en los cultivos control a baja temperatura el estado de estrés celular causado por el choque frío es mayor respecto a los escalonados, situación que provoca la sobreexpresión del gen codificante para la HC del AcMo, la disminución en la expresión de GRP78 y de otras enzimas relacionadas con las vías de N-glicosilación. En conjunto esto pudo haber provocado una acumulación de HC mal plegada (y de otras proteínas) aumentando el estrés celular y repercutiendo negativamente en la productividad. Por otra parte, considerando que el aumento en la transcripción de GRP78 y PDI ayuda a la supervivencia celular, entonces en los cultivos escalonados con cambio a las 72 h es probable que el plegamiento y N-glicosilación del AcMo hayan sido favorecidos, dado que en general se observó un incremento en la expresión de los genes codificantes correspondientes.

Se ha establecido que distintos tipos celulares presentan capacidades diferentes para manejar y lidiar con el estrés celular [33], en nuestro caso al parecer el contexto ambiental en el que se encuentra la célula también influye en su capacidad de respuesta, y por ello sólo los escalonados con cambio a las 72 h, con un metabolismo más eficiente fueron capaces de lidiar con la demanda impuesta por la sobreexpresión del AcMo, reflejándose en el incremento de la productividad.

En particular la posible activación de la vía mediada por IRE1-XBP1 como parte de la UPR en los cultivos a 30°C, podría explicar el aumento del diámetro celular, pues XBP1 es considerada la proteína encargada de remodelar la estructura celular a favor de la síntesis de proteínas, promoviendo la expansión física del RE, incrementando la masa y función de la mitocondria, el número de ribosomas y el tamaño celular [33,47,83]. De esta forma, resulta de suma importancia estudiar sí la UPR es activada y sí existe un diálogo con los efectores del choque frío que pudiera explicar el incremento de la productividad.

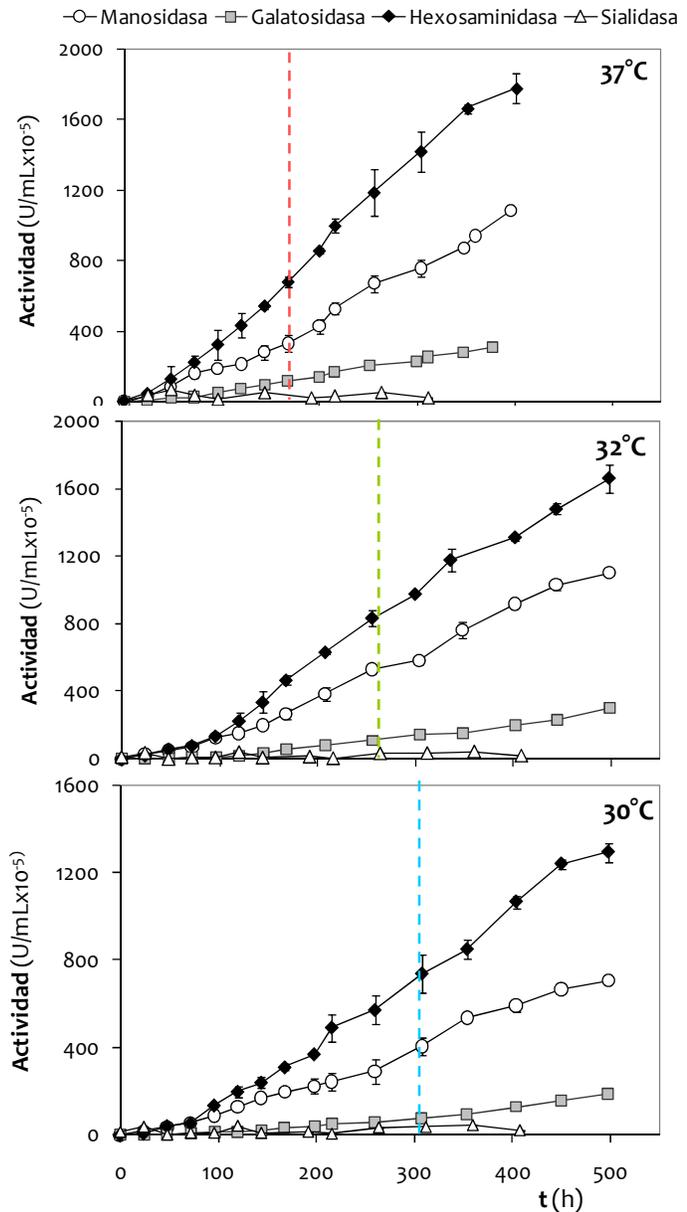
---

#### 6.4. ACTIVIDAD DE EXOGLICOSIDASAS EXTRACELULARES

La heterogeneidad de las glicoproteínas producidas en cultivos celulares ha sido atribuida principalmente a la gran cantidad de factores y pasos involucrados en la biosíntesis de oligosacáridos [48,49], la disponibilidad de los azúcares-nucleótido, así como a la variabilidad en las condiciones de bioproceso [18,48,49,63,62,121,126]. Sin embargo, se ha demostrado que la degradación extracelular por glicosidasas también puede contribuir a dicha heterogeneidad [48,49], existiendo la posibilidad de que una vez producida la glicoproteína recombinante, su patrón de glicosilación sea modificado extracelularmente a causa de la liberación de glicosidasas al medio de cultivo [49]. Así, para evaluar el potencial de degradación extracelular de los glicanos unidos al AcMo, la actividad extracelular de la manosidasa, hexosaminidasa, sialidasa y galactosidasa fue determinada mediante un método fluorométrico (sección 5.5), para todos los cultivos.

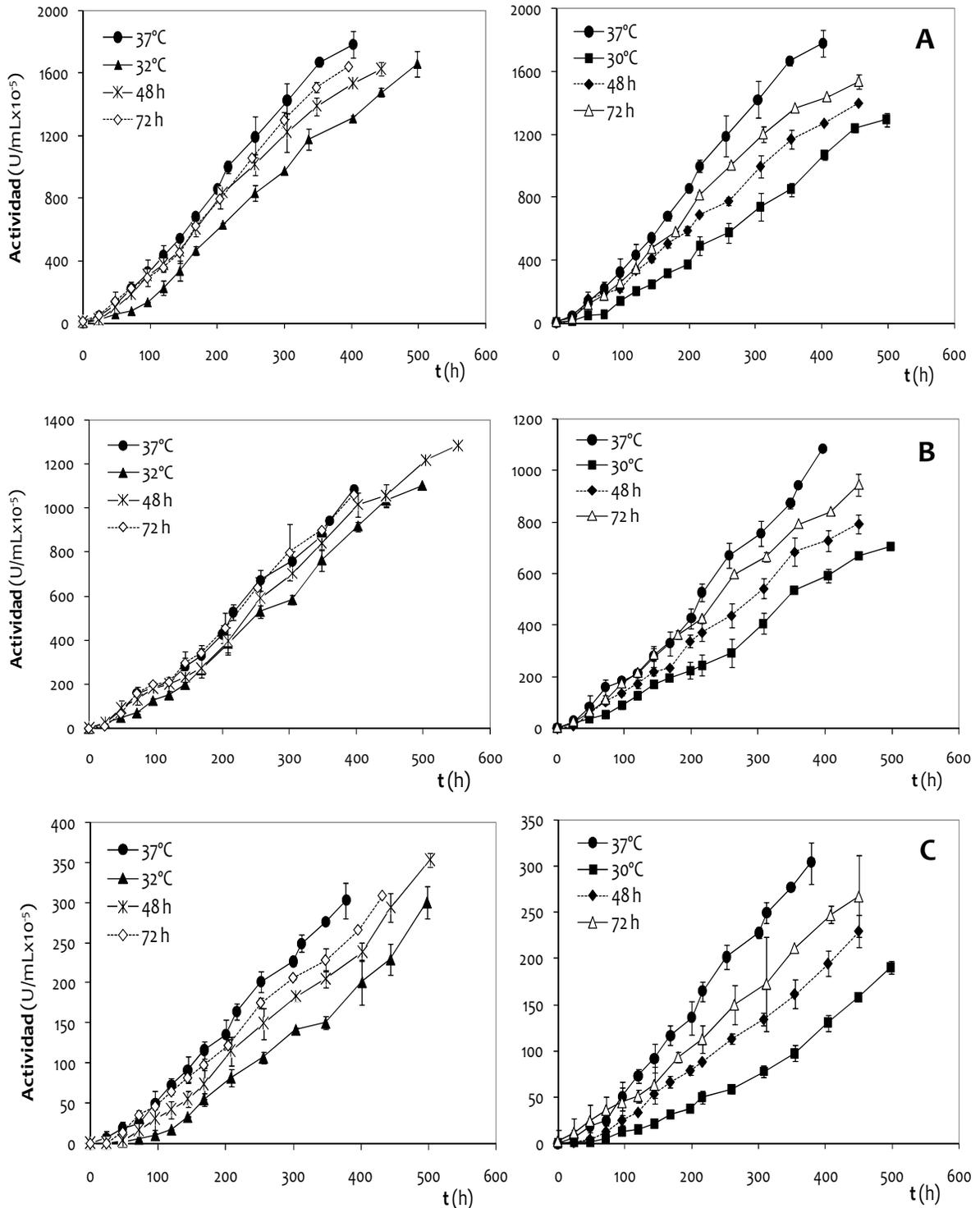
En la Figura 28, se muestra el perfil de actividad de las 4 enzimas estudiadas para los cultivos control a 37, 32 y 30°C. Como se puede observar, la actividad enzimática de la hexosaminidasa, manosidasa y galactosidasa incrementa de manera proporcional al tiempo de cultivo, presentando los mayores incrementos a partir de las 168 h en correspondencia con el momento en que las células comienzan a morir (Figura 28, líneas punteadas). Esto sugiere que el aumento de la actividad extracelular de estas 3 exoglicosidasas podría deberse a la pérdida de la integridad de la membrana (menor viabilidad y tamaño celular, respecto a 37°C) provocando su liberación y acumulación en el sobrenadante.

La actividad de las enzimas presentó una “jerarquía”, siendo la  $\beta$ -galactosidasa la que presentó la actividad más baja, la  $\alpha$ -manosidasa una actividad intermedia y la  $\beta$ -hexosaminidasa la mayor actividad (Figura 28). Esta “jerarquía” coincide con los datos reportados por Gramer, et. Al [1993 y 1994] para células CHO e hibridomas [49], fue consistente para todas las condiciones de cultivo estudiadas y se mantuvo a lo largo del tiempo de cultivo (Figura 29). Cabe resaltar que en ninguna de las condiciones evaluadas (escalonados y controles) se registró actividad alguna de sialidasa (Figura 28).



**Figura 28. Actividad extracelular de exoglicosidasas en cultivos de células CHO a 30, 32 y 37°C.** La actividad extracelular de la sialidasa, manosidasa, hexosaminidasa y galactosidasa, fue registrada a lo largo del tiempo en los cultivos control a 30, 32 y 37°C. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes y las líneas punteadas el momento en el que la viabilidad disminuye.

El efecto de la disminución de la temperatura sobre la actividad de la hexosaminidasa, galactosidasa y manosidasa en los cultivos control y escalonados se muestra en la Figura 29, resultando evidente que dicho efecto parece depender del tiempo de cambio, de la temperatura y de la enzima en cuestión. En general, se observa una disminución significativa en la actividad de las 3 glicosidasas en los cultivos a 30°C [control y escalonados], mientras que a 32°C sólo la actividad de la hexosaminidasa y de la galactosidasa fueron afectadas. La actividad de la galactosidasa fue la más afectada por la disminución de la temperatura.



**Figura 29. Actividad extracelular de exoglicosidasas en células CHO cultivadas a baja temperatura.** Se muestra la actividad extracelular de la hexosaminidasa [A], manosidasa [B] y galactosidasa [C] en función del tiempo, para los cultivos control y escalonados a 32° (izq.) y 30°C (derecha). Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

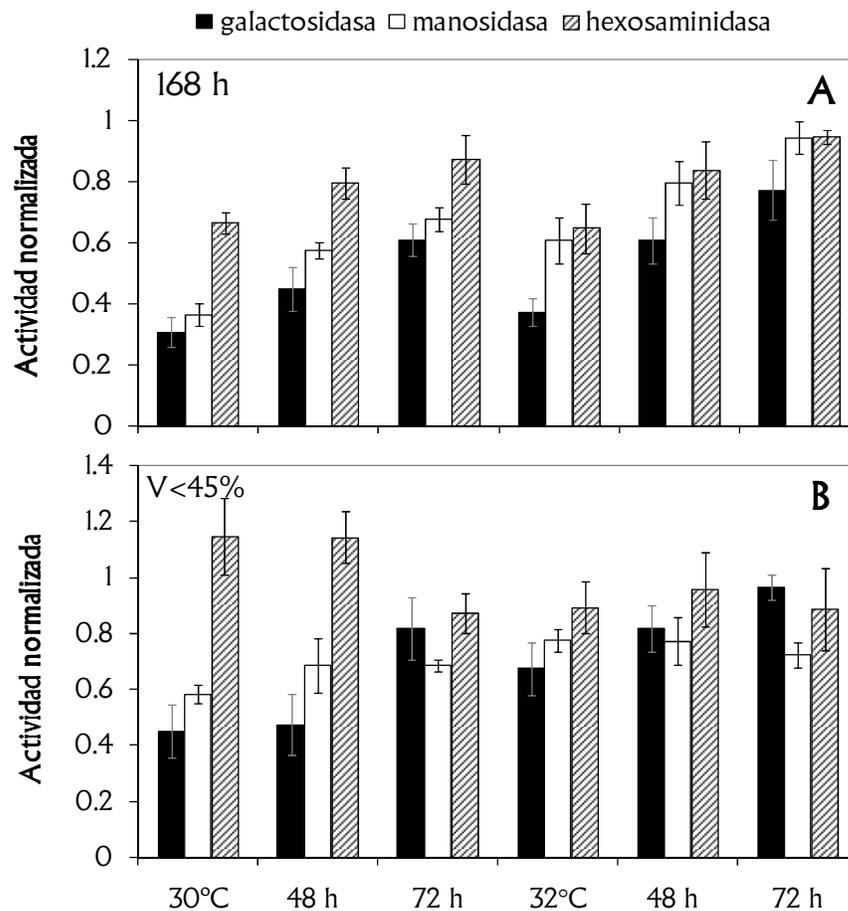
---

Específicamente, la actividad de la hexosaminidasa a las 300 h y 30°C fue 48%, 30% y 15% menor para los cultivos control y escalonados con cambio a las 48 y 72 h respecto a 37°C, mientras que a 32°C la actividad sólo se redujo entre 31% (control a 32°C) y 9% (cambio a las 72h), respecto a 37°C (Figura 29). Tomando como referencia las 300 h y el cultivo a 37°C, la actividad de la galactosidasa fue 66% y 37% menor en los controles, 19 y 41% menor en los escalonados con cambio a las 48 h, 9 y 24% en los escalonados con cambio a las 72, a 30 y 32°C respectivamente (Figura 29). La actividad de la manosidasa en los cultivos a 32°C no disminuyó significativamente respecto a 37°C (Figura 29), mientras que para los cultivos a 30°C durante las primeras 168 h la actividad de la manosidasa fue similar incluso al cultivo a 37°C, después de lo cual la actividad aumenta de manera proporcional al tiempo de cambio (Figura 29). Por ejemplo, a las 300 h la actividad de la manosidasa en el sobrenadante del cultivo a 30°C fue 48% menor respecto a la observada a 37°C, mientras que en el escalonado con cambio a las 72 h, la actividad de la manosidasa fue únicamente 12% menor respecto a 37°C.

La actividad de cada exoglicosidasa fue evaluada a una temperatura óptima de reacción de 37°C (sección 5.5) para determinar si a baja temperatura se estaba produciendo menor cantidad de exoglicosidasas o sólo la actividad de las mismas fue afectada. En la Figura 30 se muestra la actividad normalizada de las 3 exoglicosidasas respecto al cultivo control a 37°C. Como se puede observar en la Figura 30A, a las 168 h cuando la viabilidad era superior al 85%, todos los cultivos hipotérmicos presentaron una disminución en la cantidad de exoglicosidasas liberadas al sobrenadante, proporcional al tiempo de cambio de temperatura. Por ejemplo, la cantidad de galactosidasa fue entre 23 y 39% menor en los escalonados con cambio a las 72 h, 39 y 55% en los escalonados con cambio a las 48 h y hasta de 69% en los cultivos control a 32 y 30°C, respectivamente. La cantidad de manosidasa fue entre 32 y 64% menor en los cultivos a 30°C, a 32°C sólo disminuyó 39% en el control y 21% en el escalonado con cambio a las 48 h, mientras que en el escalonado con cambio a las 72 h se registró una cantidad de manosidasa similar a la del cultivo a 37°C. Por su parte, las cantidades de hexosaminidasa presentes en los cultivos a baja temperatura fueron únicamente 13-35% menores, excepto en el cultivo escalonado a 32°C con cambio a las 72 h donde sólo se observó una disminución del 5% en la actividad normalizada.

Todos los cultivos hipotérmicos produjeron la misma cantidad de hexosaminidasa; sin embargo, los cultivos a 32°C produjeron entre 17 y 26% más galactosidasa y alrededor de 30 a 40% más manosidasa respecto a los cultivos a 30°C. Lo anterior sugiere que aún cuando la actividad de manosidasa pudo haber sido afectada a 32°C durante las primeras 168 h de cultivo (Figura 29B), el efecto pudo haber sido atenuado ante una mayor concentración de enzima en el sobrenadante (Figura 30A).

En la Figura 30B se puede observar que al final de los cultivos cuando la viabilidad es menor al 45%, las cantidades de galactosidasa y manosidasa fueron 18-55% y 22-42% (respectivamente) menores en comparación con las registradas en el cultivo a-



**Figura 30. Actividad normalizada de las exoglicosidasas en los cultivos a 30 y 32°C.** La actividad normalizada [respecto al cultivo control a 37°C] de la manosidasa, hexosaminidasa y galactosidasa fue registrada a las 168 h, cuando todos los cultivos presentaban una viabilidad superior al 85% [A] y al final de los cultivos cuando la viabilidad era menor o igual al 45% [B]. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

---

37°C, pero no hubo una diferencia clara entre las cantidades de manosidasa producidas entre los cultivos control y escalonados. En los cultivos a 30°C control y escalonado con cambio a las 48 h, la actividad normalizada de hexosaminidasa fue 14% mayor, mientras que para el resto de los cultivos la actividad fue muy similar respecto a 37°C. En particular, las cantidades de las 3 enzimas en los cultivos escalonados con cambio a la 72 h (ambas temperaturas) fueron similares, siendo de particular importancia el incremento en la cantidad de galactosidasa.

Dado que la síntesis de las exoglicosidasas ocurre en el citoplasma celular y que al parecer su liberación al sobrenadante está relacionada con la pérdida de la integridad de la membrana (Figura 28), las diferencias observadas en la actividad normalizada a baja temperatura, pueden ser atribuidas tanto a una represión en la síntesis de las enzimas (represión global de la traducción como resultado del choque frío) como al retraso de la caída de la viabilidad. Por lo cual, los resultados anteriores sugieren que tanto la actividad como la producción y/o liberación de las exoglicosidasas disminuyeron en función de la temperatura y tiempo de cambio.

Para determinar si los cambios observados en la expresión de los genes codificantes para la manosidasa (*Manea*) y  $\beta$ -galactosidasa 1 (*Glb1*) correspondían con la actividad de exoglicosidasas en el sobrenadante, la actividad normalizada (respecto al cultivo a 37°C) fue comparada con el nivel relativo de expresión (Figura 31). La comparación se realizó en este punto, considerando que la expresión los genes es estable durante la fase de crecimiento exponencial y que la acumulación de las glicosidasas debido a la lisis celular no es representativa durante esta etapa, dado que la viabilidad se encuentra alrededor del 90% en todos los cultivos.

Como se puede observar en la Figura 31A, la sobreexpresión del gen *Manea* en los cultivos control a 30°C y 32°C, así como en los escalonados con cambio a las 48 h, no corresponde con la disminución en la actividad de la manosidasa (Figura 31B), pero sí están relacionados en los cultivos con cambio a las 72 h a ambas temperaturas. De tal forma que en los escalonados con cambio a las 72 h donde la expresión del gen *Manea* incrementa 1.6-1.7 veces, la actividad enzimática de la manosidasa fue similar a la del cultivo a 37°C para ambas temperaturas. Esto concuerda con el incremento observado en-

---

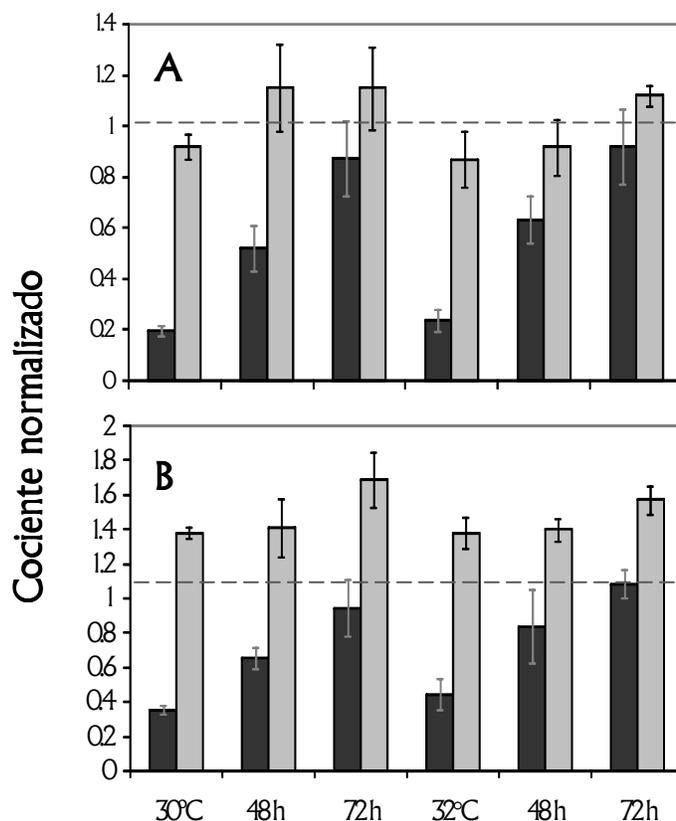
la cantidad de manosidasa detectada a 32°C (Figura 30), sugiriendo que antes de las 168 h la actividad de la manosidasa podría estar relacionada con el incremento en la expresión del gen codificante, tal vez mediante una regulación a nivel transcripcional. Después de ese periodo de tiempo, la disminución en la actividad de manosidasa parece estar más relacionada con el retraso de la muerte celular a baja temperatura [44,90], limitando su liberación al sobrenadante.

Por otro lado, en los cultivos escalonados con cambio a las 72 h la actividad de la galactosidasa incrementó en promedio 1.4 veces respecto a 37°C y es justamente en estos cultivos donde la expresión del gen *GlbI* permanece relativamente constante, mientras que en los controles y escalonados con cambio a las 48 h donde la expresión de *GlbI* fue alrededor de 10% menor respecto a 37°C (cambio que no fue considerado significativo), la actividad de la galactosidasa fue entre 37 y 80% menor respecto a 37°C (Figura 31B). Esto sugiere que la regulación de la galactosidasa a baja temperatura ocurre preferentemente a nivel enzimático, habrá que definir si la disminución en la actividad es resultado de una menor traducción del gen, una afectación en la actividad de hidrolasa o debido a una carencia de sustrato.

Para que la degradación extracelular de una glicoproteína por acción de una o varias exoglicosidasas sea significativa, éstas deben “ser sintetizadas por la célula huésped y liberadas al sobrenadante, donde las enzimas deben ser estables y activas bajo las condiciones del bioproceso” [48,49]. Dado que la actividad de las 3 glicosidasas estudiadas disminuye a baja temperatura, ya sea limitando su producción/liberación al sobrenadante o regulando su actividad, el riesgo potencial de degradación del N-glicano unido al AcMo disminuye.

Considerando el patrón de glicosilación característico reportado para una IgG [69,116], y que la actividad de las exoglicosidasas también es secuencial, podemos argumentar que la actividad más importante a considerar es la de la galactosidasa, pues su acumulación en el sobrenadante podría incrementar la proporción de glicofomas G0 de AcMo y disminuiría la eficacia del biofármaco [60,69].

**Figura 31. Relación entre la expresión del ARNm y la actividad extracelular de las exoglicosidasas.** Se muestra el cociente de la actividad normalizada [negro] y el nivel relativo de expresión [gris] de la manosidasa [A] y galactosidasa [C], a las 72 h para los cultivos control y escalonados a 30 y 32°C. La actividad normalizada consiste en el cociente de la actividad exhibida en el cultivo problema entre la actividad a 37°C, el nivel relativo de expresión se refiere a la expresión del gen problema en función del gen *Actb* y del cultivo a 37°C [valor asignado de 1]. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados.



La determinación del patrón de glicosilación del AcMo producido a baja temperatura se planteó como parte importante del presente trabajo. Sin embargo, durante el avance de esta investigación, nos topamos con problemas metodológicos importantes que impidieron realizar el análisis del patrón de glicosilación en cultivos hipotérmicos. La estrategia experimental abordada para solucionar esta problemática y los resultados obtenidos se discuten en detalle en el Anexo I, en donde también se muestra el patrón de glicosilación para el AcMo producido en un cultivo a 37°C.

Por todo lo anterior, queda como perspectiva de primera prioridad comprobar si el efecto de la temperatura sobre la expresión de los genes involucrados en las vías de N-glicosilación y sobre la actividad de las exoglicosidasas estudiadas, se reflejarán en el patrón de glicosilación del AcMo-IL8 producido a baja temperatura.

---

## 7. CONCLUSIONES

- Independientemente de las condiciones de cultivo, el sustrato limitante y principal fuente de energía para esta línea celular fue la glutamina, con una velocidad de consumo 7 veces mayor respecto a la de glucosa.
- A baja temperatura:
  - Las velocidades de crecimiento, consumo y producción de metabolitos se redujeron hasta 65% y la caída de la viabilidad se retrasó entre 3 días y 1 semana, respecto a 37°C.
  - La productividad específica y volumétrica incrementaron hasta 21% en los cultivos escalonados.
  - El desperdicio de las fuentes de carbono en forma de lactato disminuyó, reflejándose en un menor rendimiento  $Y_{lac/glc}$  en los cultivos escalonados respecto a 37°C.
- En términos de la eficiencia del metabolismo y el incremento observado en la productividad, el tiempo óptimo de cambio para ambas temperatura fue al tercer día, justo a la mitad de la fase exponencial.
- El análisis transcripcional sobre las vías de N-glicosilación, mostró que al disminuir la temperatura de cultivo:
  - La expresión de los genes codificantes para enzimas localizadas en el aparato de Golgi tales como la  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa,  $\alpha(2,3)$ -sialiltransferasa IV, transportador de UDP-galactosa y sialidasa disminuyó para la mayoría de las condiciones evaluadas, en comparación con el cultivo a 37°C, presentando la expresión más baja en los cultivos monotérmicos.
  - Los genes relacionados con la síntesis de precursores lipídicos en el RE (*Ugp*, *Dpml* y *Dpm2*) fueron sobreexpresados en casi todas las condiciones evaluadas. Con excepción del gen *Dpagt1*, cuya expresión disminuyó en los cultivos monotérmicos.

- 
- Hubo un incremento importante en la expresión de los genes codificantes para el transportador de GDP-Fucosa y CMP-ácido siálico en los cultivos escalonados a ambas temperaturas con cambio a las 72 h.
  - Únicamente en los cultivos escalonados con cambio a las 72 h, la expresión de los genes relacionados con la N-glicosilación incrementó o fue similar al control a 37°C.
  - La expresión de los genes *Rbm3* y *Cirpb* incrementó hasta 7 y 3 veces en los cultivos a baja temperatura, indicando la presencia y severidad del estrés por frío.
  - La expresión del ARNm de la cadena pesada del AcMo-IL8 incremento hasta 4 veces, presentando su máxima expresión en los cultivos control a 32°C.
  - La expresión del gen codificante para la cadena ligera del AcMo no fue afectada significativamente
  - El mayor incremento en la actividad extracelular de las 3 exoglicosidasas estudiadas, correspondió con el momento en que los cultivos comienzan a morir, independientemente de la temperatura.
    - Tanto la actividad como la producción/liberación de exoglicosidasas al sobrenadante disminuyó en función de la temperatura y tiempo de cambio.
    - La actividad de la galactosidasa fue la más afectada por la disminución de la temperatura, siendo hasta 66% menor respecto a 37°C, mientras que la actividad de la manosidasa y hexosaminidasa se redujeron hasta un 48%.
      - La producción de galactosidasa se redujo entre 23 y 69%, la de manosidasa 21 a 64% y de hexosaminidasa entre 5-35% respecto al cultivo a 37°C, a la mitad de la fase exponencial (168 h).
      - La producción de galactosidasa y manosidasa fueron hasta 55 y 42% menores respecto a 37°C, mientras que la producción de hexosaminidasa se mantuvo constante o aumentó 14% a 30°C, al final de los cultivos.
      - La sobreexpresión del gen *Manea* sólo estuvo relacionada con el mantenimiento de la actividad normalizada de la manosidasa en los cultivos escalonados con cambio a las 72 h. No se observó relación alguna entre la actividad de la galactosidasa y la expresión del gen codificante correspondiente (*Glb1*)

---

## 8. PERSPECTIVAS

A lo largo de la realización del presente trabajo y las conclusiones que de ellas derivan, diversas propuestas surgieron y otras quedaron pendientes, por lo que para entender mejor el comportamiento de células de mamífero cultivadas en condiciones de hipotermia moderada sería conveniente:

- Determinar la concentración de amonio, aspartato y alanina en los sobrenadantes de cultivo, para saber si a baja temperatura se aprovecha mejor la glutamina y como se está distribuyendo a través del metabolismo.
- Analizar por qPCR, la expresión de los genes codificantes para: Acetil-CoA carboxilasa, piruvato deshidrogenasa, carnitoil palmitoil transferasa I, glutaminasa y lactato deshidrogenasa. Esto permitiría comprender mejor cómo se genera energía a baja temperatura, por qué el metabolismo se vuelve más eficiente y el papel que desempeñan los lípidos en estos procesos.
- De cumplirse el modelo propuesto para la generación de energía a partir de lípidos, una opción alternativa para mejorar la productividad consistiría en adicionar lípidos al medio, en cultivos escalonados a baja temperatura.
- Determinar la actividad intracelular de exoglicosidasas permitiría relacionar mejor los niveles de expresión de los genes con la actividad enzimática, para estimar el potencial de degradación extracelular de la glicoproteína.
- Determinar el patrón de glicosilación del AcMo producido a baja temperatura, permitiría saber si las alteraciones observadas en los niveles de expresión y/o actividad de exoglicosidasas se refleja en la calidad final del AcMo.
- Estudiar la expresión de los genes codificantes para los 3 transductores principales de la UPR: PERK, Ire1 y ATF6, además de XBPI y CHOP, para concluir si a baja temperatura esta respuesta se enciende.
- Realizar ensayos de interacción de RBM3 y CIRP con el ARNm de enzimas involucradas en la N- glicosilación y del AcMo, permitiría establecer si las estas chaperonas están involucradas directamente en el incremento de la productividad.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K. and Walter P. (2002) Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Garland Science. 1616 pp.
2. Al-Fageeh M.B. and Smales M.C. (2006) Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems, *Biochem. J.*, 397: 247-259.
3. Al-Fageeh M.B., (2005). The cold-shock response in cultured mammalian cells: harnessing the response for the improvement of recombinant protein production *Biotechnol. Bioeng.*, 93 (5): 829-835.
4. Altamirano C., Illanes A., Becerra S., Cairó J.J. and Gòdia F. (2006) Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *J. Biotechnol.*, 125: 547-556.
5. Altamirano C., Paredes J., Cairó J. and Gòdia F. (2000) Improvement of CHO Cell Culture media formulation: Simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnol. Prog.*, 16: 69-75.
6. Andersen C.L., Jensen J.L and Ørntoft FT (2004) Normalization of Real-Time Quantitative reverse transcription- PCR Data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*, 64: 5245-5250.
7. Amersham Pharmacia Biotech (2000) Antibody Purification, Handbook. *Amersham Pharmacia Biotech*
8. Anh W.S., Jeon J.J., Jeong Y.R., Lee S.J. and Yoon S.K. (2008) Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 101 (6): 1234-1244.
9. Applied Biosystems (2008) Guide to performing relative quantification of gene expression using Real-Time Quantitative PCR. Disponible en: <http://tinyurl.com/39oqvj>
10. Applied Biosystems (2006) Relative quantitation using comparative Cr. Getting started guide. Disponible en: <http://tinyurl.com/35coo9j>
11. Ars E., Serra E., de la Luna S., Estivill X. and Lázaro C. (2000) Cold shock induces the insertion of a cryptic exon in the neurofibromatosis type 1 (NF1) mRNA *Nucleic Acids Res.*, 28 (6): 1307-1312.
12. Baik J.Y., Lee M.S., An S.R., Yoon S.K., Joo E.J., Kim Y.H., Park H.W. and Lee G.M. (2006) Initial transcriptome analyses of low culture temperature- induced expression in CHO cells producing erythropoietin. *Biotechnol. Bioeng.*, 93: 361-371.
13. Barnabe N. and Butler M. (1994). Effect of temperature on nucleotide pools and monoclonal antibody production in a mouse hybridoma *Biotechnol. Bioeng.*, 44: 1235-1245.
14. Barnes L.M. and Dickson A.J (2006) Mammalian cell factories for efficient and stable protein expression. *Curr. Opin. Biotech.*, 17: 381-386.
15. Barrón Castillo Mauricio (2009) Estudio de la temperatura subfisiológica en cultivos de células CHO recombinantes: efectos sobre el metabolismo, ciclo y muerte celular. Tesis de maestría, México, Cuernavaca Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. 100 pp.
16. Board M., Humm S. and Newsholme E.A. (1990) Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells. *Biochem. J.*, 265: 503-509.
17. Bollati-Fogolin M., Forno G., Nimitz M., Conradt H.S., Etcheverrigaray M. and Kratje R. (2005). Temperature reduction in cultures of hGM-CSF-expressing CHO Cells: Effect on productivity and product quality. *Biotechnol. Prog.*, 21: 17-21.

18. Brooks S.A. (2006) Protein glycosylation in diverse cell systems: implication for modifications and analysis of recombinant proteins. *Expert Rev Proteomics*, 3 (3): 345-359.
19. Brooks S.A., Dwek M.V. and Schumacher U. (2002) Functional & Molecular Glycobiology. BIOS Scientific Publishers, Padstow, UK. 354 pp.
20. Butler M. (2005) Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68: 283–291.
21. Butler M. and Spier R.E. (1984) The effects of glutamine utilization and ammonia production on the growth of BHK cells in microcarrier cultures. *J. Biotechnol.*, 1: 187-196.
22. Bustin S.A. (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.*, 29: 23-39.
23. Calderwood S.K. (2005) Regulatory interfaces between the stress protein response and other gene expression programs in the cell. *Methods*, 35: 139-148.
24. Campbell C. and Stanley P. (1984) A dominant mutation to ricin resistance in Chinese hamster ovary cells induces UDP-GlcNAc: glycopeptide beta-4-N-acetylglucosaminyltransferase III activity. *J. Biol. Chem.*, 259: 13370–13378.
25. Caramelo J.J. (2009) La *dolce vitta*: el papel de los azúcares en la biosíntesis de glicoproteínas, Química Viva, 8(2) [www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)
26. Chang A., Scheer M., Grote A., Schomburg I. and Schomburg D. (2009) BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Res.*, Vol. 37, Database issue, D588-D592.
27. Chappell S.A., Owens G.C., and Mauro V.P. (2001) A 5' leader of Rbm3, a cold stress-induced mRNA, mediates internal initiation of translation with increased efficiency under conditions of mild hypothermia. *J. Biol. Chem.*, 276: 36917-36922.
28. Chen P. and Harcum S.W. (2006) Effects of elevated ammonium on the glycosylation gene expression in CHO cells. *Metab. Eng.*, 8: 123-132.
29. Chu L., Blumentals I. and Maheshwari G. (2005) "Production of Recombinant Therapeutic Proteins by Mammalian Cells in Suspension Culture" En: Smales C.M and Smales D.C (Eds.) *Therapeutic Proteins, Methods and Protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press. pp. 107-121 (4<sup>o</sup> edición)
30. Chuppa S., Tsai Y.S., Yoon S., Shackleford S., Rozales C., Bhat R., Tsay G., Matanguihan C., Konstantinov K. and Naveh D. (1997). Fermenter temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 55: 328-338.
31. Clark K.J.R, Griffiths J., Bailey K.M. and Harcum S.W. (2005) Gene-expression profiles for five key glycosylation genes for galactose-fed CHO cells expressing recombinant IL-4/13 cytokine trap. *Biotechnol. Bioeng.*, 90 (5): 568-577.
32. Cudna R.E. and Dickson A.J., (2003) Endoplasmic reticulum signaling as a determinant of recombinant protein expression. *Biotechnol. Bioeng.*, 81 (1): 56-65.
33. Dinnis DM and James DC. (2005) Engineering mammalian cell factories for improved recombinant monoclonal antibody production: lesson for nature? *Biotechnol Bioeng.*, 91 (2): 180-189.
34. Donnelly M. and Scheffler E.I. (1976) Energy metabolism in respiration-deficient and wild type Chinese hamster fibroblast in culture. *J. Cell Physiol.*, 89: 39-52.
35. Dorner A.J., Wasley L.C. and Kaufman R.J., (1989) Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose regulated proteins in butyrate treated CHO cells. *J. Biol. Chem.*, 264: 20602–20607.
36. Dresios J., Aschrafi A., Owens G.C., Vanderklis P.W., Edelman G.M. and Mauro V.P. (2005) Cold-stress induced protein Rbm3 binds 60s ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 1865-1870.

37. Enders J.F., Weller T.H., Robbins F.C. [1949] Cultivation of Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science* 109: 85-87.
38. Faulhammer F., Konrad G., Brankatschk B., Tahirovic S., Knödler A. and Mayinger P. [2005] Cell growth-dependent coordination of lipid signaling and glycosylation is mediated by interactions between Sac1p and Dpmlp. *J. Cell Biol.*, 168 (2): 185-191.
39. Fox S.R., Yap M.X., Yap M.G. and Wang D.I. [2005] Active hypothermic growth: a novel means for increasing total interferon gamma production by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 41: 265-272.
40. Fox S.R., Tan H.K., Tan M.C., Wong S.C., Yap M.G. and Wang D.I. [2005]. A detailed understanding of the enhanced hypothermic productivity of interferon gamma by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Appl. Biochem.*, 41: 255–264.
41. Fujita J. [1999] Cold shock response in mammalian cells. *J Mol Microbiol. Biotechnol.*, 1: 243-255.
42. Furukawa K. and Ohsuye K. [1999]. Enhancement of productivity of recombinant a C-terminal alpha-amidating enzyme by low temperature culture. *Cytotechnology*, 31: 85–94.
43. Furukawa K. and Ohsuye K. [1998]. Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C-terminal alpha-amidating enzyme. *Cytotechnology*, 26: 153-164.
44. Fussenegger M. and Bailey J.E. [1999] Molecular regulation of cell-cycle progression and apoptosis in mammalian cells: implications for biotechnology, *Biotechnol. Prog.*, 14 (6): 807-33.
45. Galbraith D., Tait A., Racher A., Birch J., and James D. [2006] Control of culture environment for improved polyethylenimine-mediated transient production of recombinant monoclonal antibodies by CHO cells. *Biotechnol. Prog.*, 22: 753-762.
46. Gao N., Shang J. and Lehrman M.A. [2008] Unexpected basis for impaired Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-dolichol biosynthesis by elevated expression of GlcNAc-1-P transferase. *Glycobiology*, 18 (1): 125-134.
47. Gass J.N., Jiang H.Y., Wek R.C. and Brewer J.W. [2008] The unfolded protein response of B-lymphocytes: PERK-independent development of antibody-secreting cells. *Mol. Immunol.*, 45: 1035-43.
48. Gramer M.J. [1999] Measurement of cell-culture glycosidase activity. In: *Methods in Biotechnology, Vol. 8: Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols*, Ed. Jenkins N., Totowa, NJ, Humana Press p. 289-298
49. Gramer M. and Goochee C. [1994] Glycosidase activities of the 293 and NSO cell lines, and of an antibody-producing hybridoma cell line. *Biotechnol. Bioeng.*, 43: 423-428.
50. Grose J.H., Smith T.L., Sabic H. and Rutter J. [2008] Yeast PAS kinase coordinates glucose partitioning in response to metabolic and cell integrity signaling. *EMBO J.*, 26: 4824-4830.
51. Harcum S. in "Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies" Ed. Taylor & Francis group. 2006, 113-145.
52. Harrison R.G. [1907] Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 4: 140-143.
53. Helenius A. and Aebi M. [2001]. Intracellular Functions of N-Linked Glycans. *Science*, 291: 2364-69.
54. Hendrick V., Winnepenninckx P., Abdelkafi C.V., Andeputte O., Cherlet M., Marique T., Renemann G., Loa A., Kretzmer G. and Werenne J. [2001] Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator [t-PA] by butyrate and shift of temperature: A cell cycle phases analysis. *Cytotechnology*, 36: 71-83.
55. Herbert D.N., Garman S.C. and Molinari M. [2005] The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagines-linked carbohydrates as protein maturation and quality control tags. *Trends in Cell Biol.*, 15 (7): 364-370.
56. Herscovics A. [1999] Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1473: 96-107.
57. Higgins E. [2010] Carbohydrate analysis throughout the development of a protein therapeutic. *Glycoconj. J.* 27: 211-255.

58. Huopaniemi L., Kolmer M., Niittymäki J., Pelto-Huikko M. and Renkonen R. (2004) Inflammation-induced transcriptional regulation of Golgi transporters required for the synthesis of sulfo sLex glycan epitopes. *Glycobiology*, 14 (12): 1285-1294.
59. Jayapal K.P., Wlaschin K.F., Yap M.G.S., Hu W-S. (2007) Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting. *Chem. Eng. Prog.*, 103 (7): 40-47.
60. Jefferis R. (2009) Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 8 (3): 226-234.
61. Jelkmann W. (1992) Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol. Rev.*, 72: 449-489.
62. Jenkins N., Parekh R.B. and James D.C. (1996) Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nat. Biotechnol.*, 14: 975-961.
63. Jenkins N. and Curling E.M.A. (1994) Glycosylation of recombinant proteins: Problems and prospects. *Enzyme Microb. Technol.*, 16: 354-364.
64. Jenkins H.A., Butler M. and Dickson A.J. (1992) Characterization of glutamine metabolism in two related murine hybridomas. *J. Biotechnol.*, 23: 167-182.
65. Jiang Z. and Sharfstein S.T. (2008) Sodium Butyrate stimulates monoclonal antibody over-expression in CHO cells by improving gene accessibility. *Biotechnol. Bioeng.*, 100 (1): 189-194.
66. Kaufmann H., Mazur X., Fussenegger M. and Bailey J.E. (1999) Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 63 (5): 573-582.
67. Kawakita M., Ishida N., Miura N., Sun-Wada G.H., Yoshioka S. (1998) Nucleotide sugar transporters: elucidation of their molecular identity and its implication for future studies. *J Biochem.*, 123 (5): 777-85.
68. Keller N., Kiratli S., Roulin S., Spahr U., Leuenberger S., Spycher C., Dorsch K., Jenal U. (2007) Classification of organism: cell lines (draft). The Swiss Agency for the Environment, Forests and Landscape (SAEFL), Berne 12 pp., Federal Office for the Environment (FOEN). Disponible en <http://www.bafu.admin.ch/biotechnologie/O1744/O1753/index.html?lang=en>
69. Kim W.D., Tokunaga M., Ozaki H., Ishibashi T., Honda K., Kajiura H., Fujiyama K., Asano R., Kumagai I., Omasa T. and Ohtake H. (2009) Glycosylation pattern of humanized IgG-like bispecific antibody produced by recombinant CHO cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85 (3): 535-542.
70. Kita H., Carmichael J., Swartz J., Muro S., Wyttenbach A., Matsubara K., Rubinsztein D. and Kato K. (2002) Modulation of polyglutamine-induced cell death by genes identified by expression profiling. *Hum. Mol. Genet.*, 11 (19): 2279-2287.
71. Kochanowski N., Blanchard F., Cacan R., Chirat F., Guedon E., Marc A. and Goergen J.L. (2008) Influence of intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents on recombinant Interferon-glycosylation during batch and fed-batch cultures of CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 100 (4): 721-733.
72. Kretzmer G. (2002) Industrial processes with animal cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:135-142.
73. Kumar N., Gammell P. and Clynes M. (2007) Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. *Cytotechnology*, 53: 33-46.
74. Kurano, N., Leist, C., Messi, F., Kurano, S. and Fiechter, A. (1990) Growth behavior of Chinese Hamster Ovary Cells in a compact loop bioreactor. Effects of medium components and waste products. *J. Biotechnol.*, 15: 113-128.
75. Lamotte D., Buckberry L., Monaco L., Soria M., Jenkins N., Engasser J-M. and Marc A., (1999) Na-butyrate increases the production and  $\alpha$ 2,6-sialylation of recombinant interferon- $\gamma$  expressed by  $\alpha$ 2,6 sialyltransferase engineered CHO cells. *Cytotechnology*, 29: 55-64.
76. Lee E.U., Roth J. and Paulson J.C., (1989) Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside  $\alpha$  2,6-sialyltransferase *J. Biol. Chem.*, 264: 13848-13855.

77. Livak K.J. and Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25:402–408.
78. Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2004) *Molecular Cell Biology*, 5a edición, 1090 pp.
79. Ludwig A., Tomczkowski J. and Kretzmer G. (1992). Influence of the temperature on the shear stress sensitivity of adherent BHK 21 cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38: 323–327.
80. Lloyd D.R., Holmes P., Jackson L.P., Emery A.N. and Al-Rubeai M. (2000) Relationship between cell size, cell cycle and specific recombinant protein productivity. *Cytotechnology*, 34: 59-70.
81. Maeda Y. and Kinoshita T. (2008) Dolichol-phosphate mannose synthase: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1780 (6): 861-868.
82. Maggon K. (2008) Global Monoclonal Antibodies Market Review 2008 (World Top Ten mAbs), knoll™ beta. Disponible en: <http://tinyurl.com/3xr9t9j>
83. Malhotra J.D. and Kaufman R.J. (2007) The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Cell. Dev. Biol.*, 18: 716-31.
84. Marchant R.J., Al-Fageeh M.B., Underhill M.F., Racher A.J. and Smales C.M. (2008) Metabolic rates, growth phase, and mRNA levels influence cell-specific antibody production levels from in vitro-cultured mammalian cells at sub-physiological temperatures. *Mol. Biotechnol.*, 39: 69-77.
85. Martínez-Duncker I., Mollicones R., Codogno P. and Oriol R. (2003) The nucleotide-sugar transporter family: a phylogenetic approach. *Biochimie*, 85: 245-260.
86. Mendoza A. R., Aguilera G.C. y Carreón M.L. (2002) Ácidos nucleicos para evaluar la condición de larvas de peces, *Ciencia UANL*, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México 002: 211-217.
87. Meng M., Geisler M., Johansson H., Harholt J., Scheller H.V., Mellerowicz E.J. and Kleczkowski L.A. (2009) UDP-glucose pyrophosphorylase is not rate limiting, but is essential in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, 50 (5): 998-1011.
88. Merten O.W. (2006) Introduction to animal cell culture technology-past, present and future. *Cytotechnology*, 50: 1-7.
89. McKeehan W.L. (1982) Glycolysis, Glutaminolysis and cell proliferation. *Cell Biol. Int. Rep.*, 6(7): 635- 650
90. Moore A., Mercer J., Dutina G., Donahue C.J., Bauer D. K., Mather J.P., Etcheverry T. and Ryll T. (1997) Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures. *Cytotechnology*, 23: 47-54.
91. Morris A. and Schmid J., (2000) Effects of insulin and LongR3 on serum-free Chinese Hamster Ovary Cell cultures expressing two recombinant proteins. *Biotechnol. Prog.*, 16: 693-697.
92. Nam J.H., Zhang F., Ermonval M., Linhardt R.J. and Sharfstein S. (2008) The effects of culture conditions on the glycosylation of secreted human placental alkaline phosphatase produced in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*, 100 (6): 1178-1192.
93. Neermann J. and Wagner R. (1996) Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *J. Cell. Physiol.*, 166: 152-169.
94. Ni M. and Lee A.S. (2007) ER chaperones in mammalian development and human diseases *FEBS letters*, 581: 3641-3651.
95. Nicot N., Hausma J-F., Hoffmann L. and Evers D. (2005) Housekeeping selection for the real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress *J. Exp. Bot.*, 56 (421): 2907-2914.
96. Ochoa H.E., Nagore R.N y Zamudio H.N. (2006) Capítulo II: Estructura Funcional Celular En: *Bioquímica: una exploración a la complejidad de la vida*, Ochoa H. E. y Zamudio H.N (Eds.) Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Esc. De Químico Farmacobiología, Coordinación de Innovación Educativa (<http://dieumsnh.qfb.umich.mx/bioquimica/>)

97. Oguchi S., Saito H., Tsukahara M. and Tsumura H. (2006) pH condition in temperature shift cultivation enhances cell longevity and specific hMab productivity in CHO culture. *Cytotechnology*, 52: 199-207.
98. Ozturk S.S., Hu W.S. (2006) "Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies". Ed. Taylor & Francis group, 1-11 p.p.
99. Pavlou A. and Reichert J. (2004) Recombinant protein therapeutics-success rates, market trends and values to 2010. *Nat. Biotech.*, 22 (12): 1513-1519.
100. Palomares L.A., Uribe JM, Delgado A., Hernández M., Servín P., Pérez J., Lecea L., Henández V., Cruz N., Ramírez O.T., (2006), The impact of the bioprocess on the glycosylation of recombinant human erythropoietin. *Cell Culture Engineering X*, Whistler, Canada.
101. Pecqueur C., Bui T., Gelly C, Hauchard J., Barbot C., Bouillaud F., Ricquier D., Miroux B, Thompson CB. (2008) Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization. *FASEB J.*, 22: 9-18.
102. Petch D. and Buttler M. (1994) Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilization. *J. Cell. Physiol.*, 161: 71-76.
103. Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29 (9): e45.
104. Pfaffl M.W. (2004a) Quantification Strategies in Real-Time PCR. In: A-Z of Quantitative PCR Ed. Bustin, S.A. La Jolla AA, USA International University Line, p. 87-120.
105. Pfaffl, M.W., Tichopad A., Prgomet C., and Neuvians T.P. (2004b) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.*, 26: 509-515.
106. Phadare S., Alsina J. and Inouye M. (1999) Cold shock response and cold shock proteins. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2: 175-180.
107. Puck T.T., Cieciura S.J., and Robinson A. (1958) Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Mol. Med.*, 108 (6): 945-955.
108. Ramakers C., Ruijter J.M., Deprez R.H. and Moorman A.F. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.*, 339 (1): 62-66.
109. Ramirez O.T. and Mutharasan R. (1990) Cell cycle and growth phase dependent variations in size distributions, antibody productivity and oxygen demand in hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 36: 839-848.
110. Reichert J. and Pavlou A. (2004) Monoclonal antibodies market. *Nat Rev.*, 3: 383-384.
111. Reitzer L.J., Burton M.W. and Kennell D. (1979) Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for culture HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, 254: 2669-2676.
112. Renard J.M., Spagnoli R., Mazier C., Salles M.F. and Mandin E. (1988) Evidence that monoclonal antibody production kinetics is related to the integral of viable cells in batch systems. *Biotechnol. Lett.*, 10:91-6
113. Rodríguez J., Spearman M., Huzel N. and Butler M., (2005) Enhanced production of monomeric interferon- $\beta$  by CHO cells through the control of culture conditions. *Biotechnol. Prog.* 21: 22-30.
114. Sallustio S. and Stanley P. (1989) Novel genetic instability associated with a developmentally regulated glycosyltransferase locus in Chinese hamster ovary cells. *Som. Cell Mol. Genet.*, 15: 387-400.
115. Sandford K.K., Earle W.R., Evands V.J., Waltz H. and Shannon J.E. (1951) The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. *J. Natl. Cancer Inst.*, 11: 773-795.
116. Satoh M., Shitara K. and Hanai N. (2006) The current stream and prospect of glycoscience application- Therapeutic Antibodies- *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 18 (100): 129-136.
117. Schatz S.M., Kerschbaumer R.J., Gerstenbauer G., Kral M., Dorner F. and Scheiflinger F. (2003) Higher expression of Fab antibody fragments in a CHO cell line at reduced temperature. *Biotechnol Bioeng* 84: 433-38.

118. Schröder M. and Kaufman R.J. (2005) ER stress and the unfolded protein response, *Mutat. Res.*, 569: 29-63.
119. Schwarz G., Baumler S., Block A., Felsenstein F.G. and Wenzel G. (2004) Determination of detection and quantification limits for SNP allele frequency estimation in DNA pools using real time PCR. *Nucleic Acids Res.*, 32 (3): e24. Published online DOI: 10.1093/nar/gnh020
120. Serrato J.A., Hernández V., Estrada-Moncada S., Palomares L.A. y Ramírez O.T. (2007) Differences in the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by hybridomas cultures in serum-supplemented, serum-free or chemically defined media. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 47: 113-124.
121. Serrato J.A., Palomares L.A., Meneses-Acosta A. and Ramírez O.T. (2004) Heterogeneous conditions in dissolved oxygen affect N-glycosylation but not productivity of a monoclonal antibody in hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 88: 176-188.
122. Shen X., Zhang K. and Kaufman R.J. (2004) The unfolded protein response—a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J. Chem. Neuroanat.*, 28: 79-92.
123. Shi M., Xie Z., Yu M., Shen B. and Guo N. (2005) Controlled growth of Chinese hamster ovary cells and high expression of antibody-IL-2 fusion proteins by temperature manipulation. *Biotechnol Lett.*, 27 (23-24): 1879-84.
124. Sinacore M.S., Drapeau D. and Adamson S.R. (2000) Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media, Protocol. *Mol. Biotechnol.*, 15 (3): 249-257.
125. Sonna L.A., Fujita J., Gaffin S.L. and Lilly C.M. (2002). Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J. Appl. Physiol.*, 92: 1725–1742.
126. Spiro R.G (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation and disease implications of glycopeptides bonds *Glycobiology*, 12: 43R-56R.
127. Stanisz J., Wice B.M. and Kennell D.E. (1983) Comparative energy metabolism in cultured heart muscle and HeLa cells. *J. Cell Physiol.*, 115 (3): 320-330.
128. Stanley P., Raju T.S., Bhaumik M. (1996) CHO cells provide access to novel N-glycans and developmentally regulated glycosyltransferases. *Glycobiology*, 6 (7): 695-699.
129. Suzuki T., Lu J., Zahed M., Kita K. and Suzuki N. (2007) Reduction of GRP78 expression with siRNA activates unfolded protein response leading to apoptosis in HeLa cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 468: 1-14.
130. Swiderek H. and Al-Rubeai M. (2007) Functional genome-wide analysis of antibody producing NSO cell line cultivated at different temperatures. *Biotechnol Bioeng.*, 98 (3): 616-30.
131. Teeling J. (Krommenie, NL), Parren P. (Odijk, NL), Baadsgaard O. (Malmo, SE), Hudson D. (Livermore, CA, US), Petersen J. (Rungsted Kyst, DK), 2004 Human monoclonal antibodies against interleukin 8 (IL-8), United States, MEDAREX, INC. (707 State Road, Princeton, NJ, US), GENMAB A/S (Toldbodgade 33, Copenhagen K, DK), **20040208873**.
132. Trummer E., Fauland K., Seidinger S., Schriebl K., Lattenmayer C., Kunert R., Weik R., Borth N., Katinger H. and Muller D. (2006A) Process Parameter Shifting: Part I. Effect of DOT, pH and temperature on the performance of EPO-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 94 (6): 1034-1044.
133. Trummer E., Fauland K., Seidinger S., Schriebl K., Lattenmayer C., Kunert R., Vorauer-Uhl K., Weik R., Borth N., Katinger H. and Muller D. (2006B) Process Parameter Shifting: Part II. Biphasic Cultivation—A tool for enhancing the volumetric productivity of batch processes using EPO-Fc expressing CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 94 (6): 1045-1052.
134. Van Breukelen F. and Martin S.L (2002) Molecular adaptations in mammalian hibernators: unique adaptations or generalized responses? *J. Appl. Physiol.*, 92: 2640-2647.
135. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. and Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3 (7): 1-12.

136. Walsh G. and Jeffris R. (2006) Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins *Nat. Biotechnol.* 24 (10): 1241-1252.
137. Weidmann R., Ludwig A. and Kretzmer G. (1994) Low temperature cultivation: a step towards process optimization. *Cytotechnology*, 15:111–116.
138. Wellman S., Buhner C., Moderegger E., Zelmer A., Kirschner R., Koehne P., Fujita J. and Seeger K. (2004) Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by HIF-1 independent mechanism. *J. Cell Sci.*, 117: 1785-1794.
139. Winkler C., Denker K., Wortelkamp S. and Sickmann A. (2007) Silver- and Coomassie-staining protocols: Detection limits and compatibility with ESI MS. *Electrophoresis*, 28 (12): 2095 – 2099.
140. Wulhfard S., Tissot S, Bouchet S, Cevey J, De Jesus M, Hacker DL and Wurm FM (2008) Mild hypothermia improves transient gene expression yields several fold in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Prog.*, 24 (2): 458-65.
141. Wurm F.M. (2004) Production of recombinant protein in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol.*, 22: 1393-1398.
142. Yee J.C., de Leon Gatti M., Philp R.J., Yap M. and Hu W.S. (2008) Genomic and proteomic exploration of CHO and hybridoma cells under sodium butyrate treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 99 (5): 1186-1204.
143. Yoon S.K., Anh Y.H. and Jeong M.H. (2007) Effect of culture temperature on follicle-stimulating hormone production by Chinese hamster ovary cells in a perfusion bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76: 83-89.
144. Yoon S.K., Hong K.J., Choo H.S., Soon Y.J., Park H.W. and Lee G.M. (2006a) Adaptation of Chinese hamster ovary cells to low culture temperature: Cell growth and recombinant protein production. *J. Biotechnol.*, 122: 463-472.
145. Yoon S.K., Kim S.H., song J.Y. and Lee G.M. (2006b) Biphasic culture strategy for enhancing volumetric erythropoietin productivity of Chinese hamster ovary cells. *Enzyme and Microb. Technol.*, 39: 362-365.
146. Yoon S.K., Hwang S.O. and Lee G.M. (2004) Enhancing effect of low culture temperature on specific antibody productivity of recombinant Chinese hamster ovary cells: Clonal variation. *Biotechnol. Prog.*, 20 (6): 1683-1688.
147. Yoon S.K., Song J.Y. and Lee G.M. (2003a) Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 82 (3): 289-298.
148. Yoon S.K., Kim S.H. and Lee G.M. (2003b) Effect of low culture temperature on specific productivity and transcription level of anti-4-1BB antibody in recombinant Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Prog.*, 19 (4);, 1383-1389.
149. Yun Z., Takagi M., and Yoshida T. (2003) Repeated Addition of Insulin for Dynamic Control of Apoptosis in Serum-Free Culture of Chinese Hamster Ovary Cells. *J. Biosci. Bioeng.*, 96 (1): 59-64.
150. Zielke H. R., Sumbilla C.M., Sevdalian D.A., Hawkins R.L. and Ozand P.T. (1980) Lactate: A major product of glutamine metabolism by human diploid fibroblasts. *J. Cell. Physiol.*, 104 (3): 433-441.

# ANEXO I

## ANÁLISIS DEL PATRÓN DE GLICOSILACIÓN

### A) Purificación y caracterización del AcMo-IL8

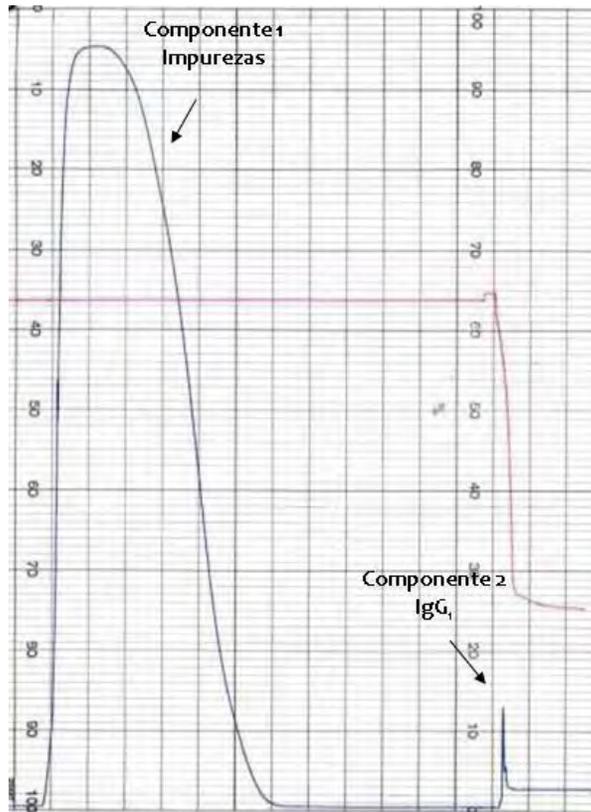
El tiempo de cosecha para la purificación del AcMo se estableció a las 168 h para todos los cultivos, debido a que en ese momento casi todos habían alcanzado las concentraciones celulares y de AcMo máximas (excepto controles a baja temperatura); además, una viabilidad superior al 80% y una baja actividad de exoglicosidasas en el sobrenadante, permitieron asegurar que los eventos de muerte celular no afectaran significativamente la calidad del producto.

La purificación se realizó tal como se describe en la sección 5.6. En la Figura 32 se muestra un cromatograma característico obtenido durante el proceso de purificación con proteína A; en el cual se observaron 2 componentes en el primero (componente 1) eluyeron las impurezas de la muestra al lavar la columna con el buffer de unión y en el componente 2 eluyó el anticuerpo de interés en el momento en el que ocurre el cambio de fuerza iónica y pH. Este componente fue recuperado, desalado y concentrado hasta 400  $\mu$ L. Todas las fracciones recolectadas durante el procesamiento de la muestra se analizaron en geles desnaturalizantes al 12% y Western blot (WB), con lo cual se confirmó la presencia del AcMo (datos no mostrados). El perfil cromatográfico fue similar en todas las muestra analizadas, salvo por la proporción del segundo componente que fue mayor para los cultivos a 30°C.

La concentración final del anticuerpo purificado del cultivo a 37°C fue de **0.428 g/L**; de acuerdo al factor de concentración de la muestra purificada, se estimó que en el sobrenadante habría **34 mg/L** de AcMo-IL8; esta estimación está 75% debajo de la teórica reportada por la ATCC (150 mg/L) para la misma línea celular cultivada en medio con suero. Ahora, si retomamos los resultados obtenidos de la cuantificación mediante ELISA (4.7 mg/L), notaremos que la línea produce 85% menos de lo esperado, es decir, 97% menos de lo reportado por la ATCC y está al menos 3 ordenes de magnitud debajo de los títulos de AcMo obtenidos a nivel comercial (5 g/L) [73] lo cual tuvo repercusiones importantes para el análisis de glicosilación como se discute más adelante.

Esta disminución en los títulos de AcMo, también fue observada por Kim, et al. (2009) al cultivar la línea celular CRL-12445 en medio sin suero, la cual es una “clona hermana” de la línea celular utilizada en el presente trabajo, es decir, fueron transfectadas –

con el mismo vector y también produce un AcMo-IL8 [69].

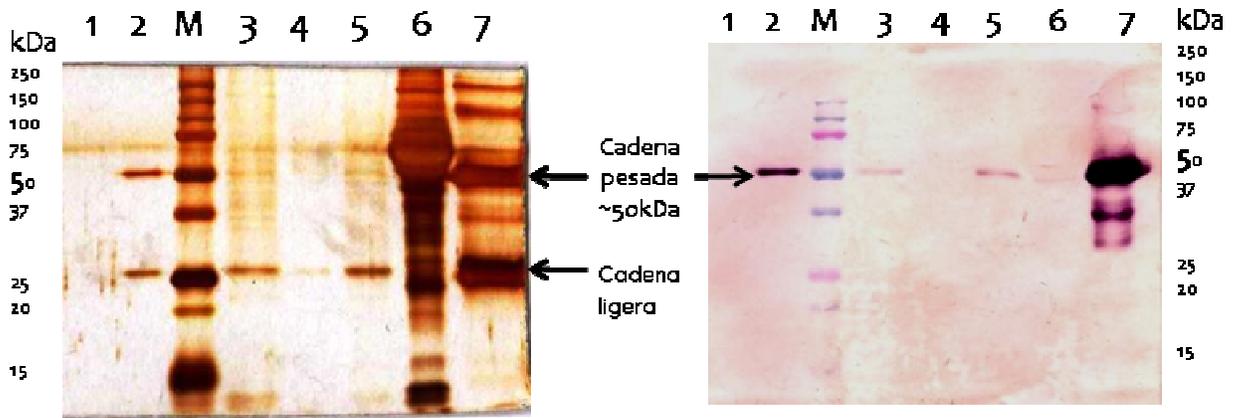


**Figura 32. Cromatograma característico obtenido durante la purificación del AcMo.** En el gráfico se observan 2 componentes (línea azul), el primero corresponde a todas las impurezas presentes la muestra y el segundo [definido y pequeño] corresponde al anticuerpo purificado. La línea roja representa la evolución del pH durante la purificación. El perfil cromatográfico para todas las muestras fue similar independientemente de las condiciones de cultivo.

La identificación y pureza del AcMo se confirmó por Western Blot y geles desnaturalizantes al 12% teñidos con sales de plata. De acuerdo a la literatura, una IgG<sub>1</sub> humana tiene un peso molecular de 150 kDa, su cadena pesada es de aproximadamente 50 kDa y entre el 2 y 3% del peso corresponde N-glicanos unidos a su estructura [7,19]. Por lo tanto en condiciones desnaturalizantes se generan dos bandas, una correspondiente a las cadenas pesadas aprox. en 50 kDa, y otra a las cadenas ligeras del anticuerpo, alrededor de 25 kDa.

En la Figura 33, se muestra un gel característico que sirvió para la identificación del anticuerpo, tanto en el sobrenadante de los cultivos como en la muestra purificada. Para todos los casos se observan principalmente dos bandas una a los 50 kDa y otra aproximadamente a los 25 kDa. Claramente en la muestra purificada (carril 2) dichas bandas están bien definidas y son las únicas presentes, indicando una pureza >90%; además al realizar el WB confirmamos que después de la purificación obtuvimos una muestra concentrada y pura respecto al sobrenadante de cultivo del cual partimos (carril 3). Cabe resaltar que en los sobrenadantes, sin importar la suplementación del medio de cultivo, ni la temperatura, la proporción de la banda —

correspondiente a la cadena ligera fue mayor respecto a la de la cadena pesada; mientras que en la muestra purificada la proporción entre las 2 bandas es similar.



**Figura 33. Identificación y pureza del AcMo purificado.** Gel desnaturalizante al 12% teñido con sales de plata (izq.) y el Western blot correspondiente (derecha). M: marcador de peso molecular, 1. CDM4 fresco, 2. AcMo-IL8 purificado, 3. sobrenadante de un cultivo en suspensión a 37°C CON insulina, 4. sobrenadante de un cultivo en suspensión a 37°C SIN insulina, 5. sobrenadante de un cultivo en suspensión a 30°C CON insulina, 6. Sobrenadante de un cultivo adherente a 37°C con insulina y SBF, 7. IgG humana estándar (8 µg).

Un cambio significativo en el peso molecular sólo de la cadena pesada fue observado después de digerir el AcMo purificado con PNGasa F, sugiriendo que sólo esta parte de la molécula está glicosilada (datos no mostrados).

En el mismo experimento observamos que al retirar la insulina (carril 4), la cantidad de proteína recombinante es menor e incluso casi imperceptible (tanto en el gel como en el WB) en comparación con los cultivos que sí fueron suplementados con ella. Por otra parte, para el sobrenadante proveniente del cultivo con suero, se observaron gran cantidad de proteínas contaminantes (gel) y sólo una pequeña proporción correspondía al AcMo (WB, carril 6), lo cual sugiere que incluso al suplementar el medio con suero, la línea celular produce poco AcMo. Comparando de manera cualitativa los cultivos con insulina, se observa que la cantidad de proteína en el sobrenadante a 30°C es ligeramente mayor que la de 37°C, aun siendo el mismo tiempo de cosecha (carriles 3 y 5), esto corresponde con el incremento en la concentración máxima de IgG a 30°C.

El mismo procedimiento de cosecha y purificación se realizó en sobrenadantes provenientes de los cultivos control y escalonados a baja temperatura; sin embargo, en este punto nos topamos con un problema metodológico que nos impidió la determinación del —

---

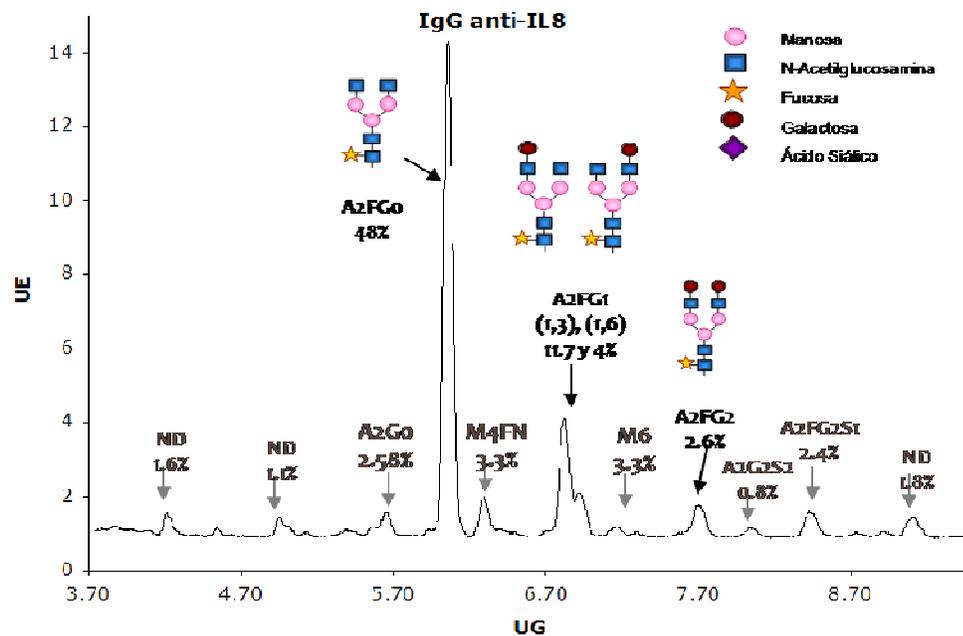
patrón de glicosilación: la productividad de AcMo. Por lo que al término de la purificación, la cantidad de AcMo fue insuficiente para realizar el análisis de glicosilación.

Para favorecer la producción de anticuerpo, la concentración de metrotrexato fue incrementada desde 200 nM hasta 1.5 $\mu$ M para seleccionar aquellas clonas que tuvieran la mayor productividad; sin embargo, las concentraciones de AcMo alcanzadas siempre fueron de alrededor de 5 mg/L (a 37°C), independientemente de la concentración de MTX, lo cual sugiere que la expresión del AcMo está condicionada desde la construcción a favorecer la producción de la cadena ligera sobre la pesada, entrando en juego los procesos de secreción y ensamble propios de la IgG. De esta forma únicamente se pudo determinar el patrón de glicosilación del cultivo realizado en frascos-T75 a 37°C de las primeras cinéticas realizadas para determinar el tiempo de cambio.

### B) Determinación del patrón de glicosilación

El patrón de glicosilación del AcMo producido en el cultivo a 37°C se muestra en la Figura 34; en ella se observan al menos 19 picos correspondientes a oligosacáridos unidos a la cadena pesa del AcMo-IL8. Las estructuras fueron propuestas realizando digestiones consecutivas con diferentes exoglicosidasas como se describe en la sección 5.7 y comparando su migración (en unidades de glucosa) en diferentes bases de datos; esto permitió la identificación de 14 estructuras que se enlistan en la Tabla 16. Como se puede observar cerca del 73% de las estructuras correspondieron a N-glicanos biantenarios complejos fucosilados y no bisectados, 16% a glicanos altos en manosa y paucimanosa, y 8% a estructuras no determinadas. De las estructuras predominantes el 50.6% estuvieron conformadas por glicanos no galactosilados (G0), el 15.6% por glicanos monogalactosilados -G1 (1,3) y G1 (1,6)- y el 6% por glicanos digalactosilados (G2). En conjunto, las estructuras principales (G0, G1 y G2) constituyeron el 72% del total de los oligosacáridos en la muestra, en correspondencia con lo reportado por Kim, et al. (2009), para la línea celular CRL-12445 [69].

Del total de glicofomas el 6% estuvieron sialidadas, el 81% fucosiladas y el 25.5% estuvieron galactosiladas en una o en ambas antenas. Sólo el 6% de las glicofomas contenían N-glicanos biantenarios completamente galactosilados, en contraste con el 20% de estos glicanos contenidos en una IgG purificada de suero humano [69]. Una estructura particular que contenía lactosamina (Gal $\beta$ ,4GlcNAc) fue observada al final del perfil (11.57 UG).



**Figura 34. Patrón de glicosilación del AcMo-IL8 a 37°C.** Se muestra el cromatograma de los N-glicanos del AcMo producido a 37°C. Los picos más representativos y algunas otras estructuras propuestas listadas en la tabla 16, se identifican en el cromatograma.

Se sabe que las secuencias de lactosamina son componentes importantes en los ligandos tipo carbohidrato que coordinan el reconocimiento celular (p. ej. durante la fertilización) y el tráfico de linfocitos [19,63]. No obstante en este caso su presencia no fue significativa y se desconoce el efecto que tendría al ser parte de un biofármaco.

En correspondencia con nuestros resultados, estudios realizados en diversas mutantes de células CHO han evidenciado que:

a) Son incapaces de generar glicanos bisectados debido a que carecen de la enzima N-acetilglucosaminil transferasa III, salvo por algunas mutantes a las que se les ha introducido el gen [24, 114]

b) Unen ácido siálico exclusivamente con un enlace  $\alpha$  [2-3], debido a que carecen de la  $\alpha$  [2-6]-sialiltransferasa; mientras que las glicoproteínas humanas presentan ácido siálico en enlace  $\alpha$  [2-6] y  $\alpha$  [2-3] [76]. No obstante, se ha observado que esta diferencia en el tipo de enlace no alerta el sistema inmune del ser humano [61, 76].

c) Galactosilán en mayor proporción en la posición  $\alpha$  [1,3] respecto a  $\alpha$  [1,6], y dichas estructuras se remueven más rápido del torrente sanguíneo.

d) Presentan una alta proporción de N-glicanos fucosilados (entre el 80 y 90%) con enlace  $\alpha$  [1,6].

Considerando que la ausencia de galactosas terminales provoca la formación de agregados insolubles que pueden causar inflamación y una mayor sensibilidad a la degradación proteolítica [19,63,64]; desde el punto de vista terapéutico la producción de AcMo en esta línea celular a 37°C no es la más idónea debido que produce una gran cantidad de glicofomas agalactosiladas (G0). Lo anterior resalta la importancia de mejorar la galactosilación ya sea mediante ingeniería metabólica o modificando las condiciones de cultivo; por lo cual sería trascendental evaluar si las glicofomas G1, G2 y sialiladas se ven favorecidas al disminuir la temperatura durante los cultivos bifásico favoreciendo así la calidad del producto.

**Tabla 16.** Estructuras propuestas del patrón de glicosilación para el AcMo-IL8 producido en cultivos en suspensión a 37°C.

TR (min)	UG (250mM)	área	%A	UG (25mM)	Estructura propuesta
29.512	1.80	maltosa	NA	1.98	maltosa
51.075	3.15	586612	5.10	3.29	M2N2F
55.217	3.42	798469	6.94	3.54	M3N2
66.413	4.21	257103	2.24	4.25	ND
75.622	4.94	188435	1.64	4.90	ND
80.688	5.39	128816	1.12	5.30	ND
82.565	5.56	97299	0.85	5.46	ND
83.474	5.65	296791	2.58	5.53	A2G0
87.558	6.05	5519748	<b>47.99</b>	<b>5.89</b>	<b>A2G0F</b>
89.827	6.29	380404	3.31	6.11	M4FN
94.633	6.82	1346639	<b>11.71</b>	<b>6.59</b>	<b>A2G1(1,3)F</b>
95.554	6.93	443828	<b>3.86</b>	<b>6.68</b>	<b>A2G1(1,6)F</b>
97.568	7.17	112165	0.98	6.90	M6
101.851	7.70	299504	<b>2.60</b>	<b>7.39</b>	<b>A2G2F</b>
104.464	8.05	92120	0.80	7.71	A2G2S2
107.163	8.43	272757	2.37	8.06	A2FG2S1
111.669	9.10	210362	1.83	8.68	ND
118.462	10.23	109211	0.95	9.72	A4FG3
126.599	11.77	170498	1.48	11.15	A3FG3FS3
128.775	12.22	190027	1.65	11.57	A3FG3LACS2
	<b>Total</b>	<b>11500788</b>	<b>100</b>		

NA: no aplica; ND: No determinado; %A: porcentaje de área con respecto al total

# APÉNDICE A

## MÉTODOS DE CÁLCULO

### Cálculos cinéticos y estequiométricos

La velocidad específica de crecimiento se calculó graficando el logaritmo de la concentración de células viables durante la fase exponencial en función del tiempo, utilizando la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{1}{X} * \left( \frac{dX}{dt} \right)$$

Las velocidades de consumo y de producción de metabolitos fueron calculadas de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$qi = \left( \frac{dSi/dt}{dX/dt} \right) * \mu$$

donde: S es la concentración del metabolito [i]  
X es la concentración de células viables  
t es el tiempo de cultivo  
 $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento

La productividad volumétrica [PV] se calculó con el cociente de la concentración acumulada de producto entre el tiempo de cultivo correspondiente:

$$PV = \frac{P_n - P_0}{t_n - t_0}$$

donde: P<sub>n</sub> es la concentración de AcMo al tiempo n  
P<sub>0</sub> es la concentración de AcMo al inicio del cultivo (t<sub>0</sub>)

Los cálculos consideraron los datos obtenidos durante la fase de crecimiento exponencial; para los cultivos escalonados únicamente se consideraron los datos a partir del momento del cambio de temperatura hasta el final de la fase exponencial.

### Cálculos del análisis transcripcional

La eficiencia de amplificación [E] se calculó realizando un ajuste de mínimos cuadrados y usando la pendiente [S] de la siguiente ecuación:

$$E = 10^{1/S-1} \quad \text{[Schwarz, et al. 2004]}$$

Los cambios en los niveles de expresión ( $r$ ) se evaluaron usando el método de comparación de  $C_q$  ó método del doble delta  $C_q$ , con el cual se realizó una cuantificación relativa al gen *Actb* ( $\beta$ -actina) y al control a 37°C. En dicho método, la cantidad de ARN de una muestra, normalizada respecto a una referencia endógena, está dado por:

$$r = 2^{-\Delta\Delta C_q}$$

$\Delta\Delta C_q$  está dado por:

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_{q,cp} - \Delta C_{q,cc}$$

cp es la condición problema (cultivos a baja temperatura) y cc es la condición control (cultivos a 37°C)

A su vez dichas diferencias ( $\Delta C_q$ ) están dadas por :

$$\Delta C_{q,x} = C_{q,i} - C_{q,hk}$$

dónde:

- $C_{q,i}$  es el ciclo umbral para la amplificación cada gen problema
- $C_{q,hk}$  es el ciclo umbral para la amplificación del gen de referencia
- $\Delta C_{q,x}$  es la diferencia de  $C_q$  para x condición (problema o control)

Para aquellos genes problema cuya eficiencia de amplificación fue  $\pm 5\%$  distinta de la eficiencia del gen codificante para  $\beta$ -actina, el nivel relativo de expresión ( $r$ ) se calculó utilizando el modelo desarrollado por Pfaffl, et Al. [2001] [103], que está dado por la siguiente ecuación:

$$r = \frac{E_i^{\Delta C_{q,i}}}{E_{hk}^{\Delta C_{q,hk}}}$$

dónde:

- $\Delta C_{q,i}$  es la diferencia de  $C_q$  entre la condición control y la condición problema para el gen problema
- $\Delta C_{q,hk}$  es la diferencia de  $C_q$  entre la condición control y la condición problema para el gen de referencia

### Interpretación de resultados

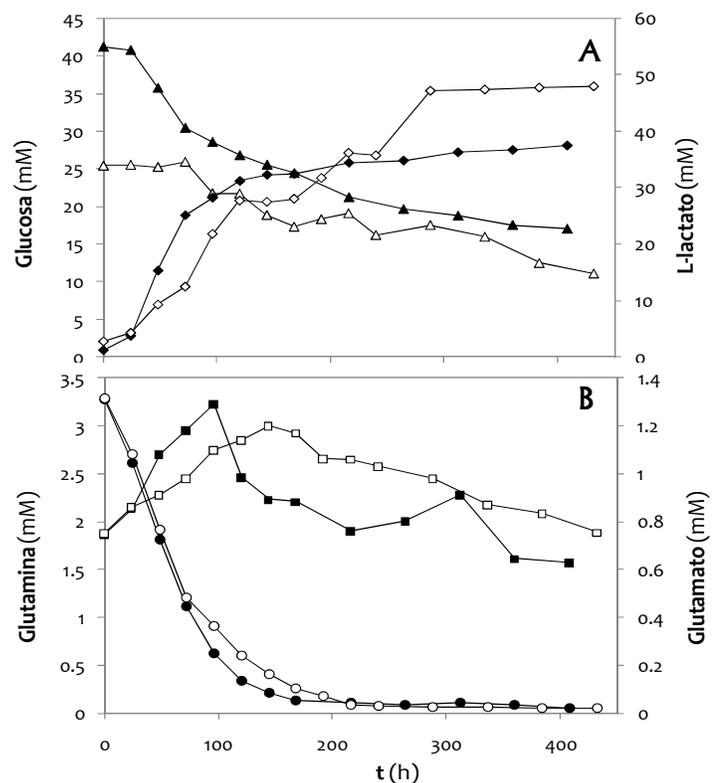
Cuando  $2^{-\Delta\Delta C_q} = 1$ , el nivel de expresión no cambio respecto a 37°C;  $2^{-\Delta\Delta C_q} > 1$ , el nivel de expresión de la condición X fue mayor respecto a 37°C;  $2^{-\Delta\Delta C_q} < 1$ , el nivel de expresión de la condición X fue menor respecto a 37°C. En este último caso, debido a la base del exponente (2) un nivel de expresión de 0.5 implica una disminución de 2 veces en la expresión del gen problema, uno de 0.25 una disminución de 4 veces y así sucesivamente.

## APÉNDICE B

### COMPARACIÓN DEL CONSUMO Y PRODUCCIÓN DE METABOLITOS, ENTRE CULTIVOS CON SUERO Y SIN SUERO

Durante el proceso de adaptación de la línea celular a crecer en medio libre de suero, no se observó un cambio significativo en el comportamiento cinético, salvo por la concentración celular máxima alcanzada y la producción de lactato. Analizando detalladamente los perfiles de consumo y producción de metabolitos, observamos que aunque ambos cultivos metabolizaron más rápido la glutamina que la glucosa (Figura 35), la glutamina resultó ser el nutriente limitante para el crecimiento del cultivo sin suero; pues el momento en el que la glutamina está por terminarse [0.07 mM] coincide exactamente con el momento en el que disminuye la viabilidad y se alcanza la máxima concentración de lactato [37.5 mM]. Al final del cultivo, sólo la mitad de la glucosa disponible fue consumida y los valores de lactato permanecieron por debajo de los valores de toxicidad reportados. Por su parte, en el cultivo con suero las células dejaron de crecer cuando alrededor del 60% de la glucosa inicial ya había sido metabolizada, justo entonces se alcanzó la máxima concentración de lactato y éste se acumuló hasta 47.9 mM.

**Figura 35. Perfiles de consumo y producción de metabolitos.** En el gráfico (A) se muestra el perfil de consumo de glucosa y producción de lactato y en (B) el perfil de consumo de glutamina y el de producción de glutamato, para el cultivo con suero en frascos T-25 (símbolos blancos) y sin suero en spinner flask (símbolos negros), (■) Glutamato, (◆) L-lactato, (●) glutamina y (▲) glucosa



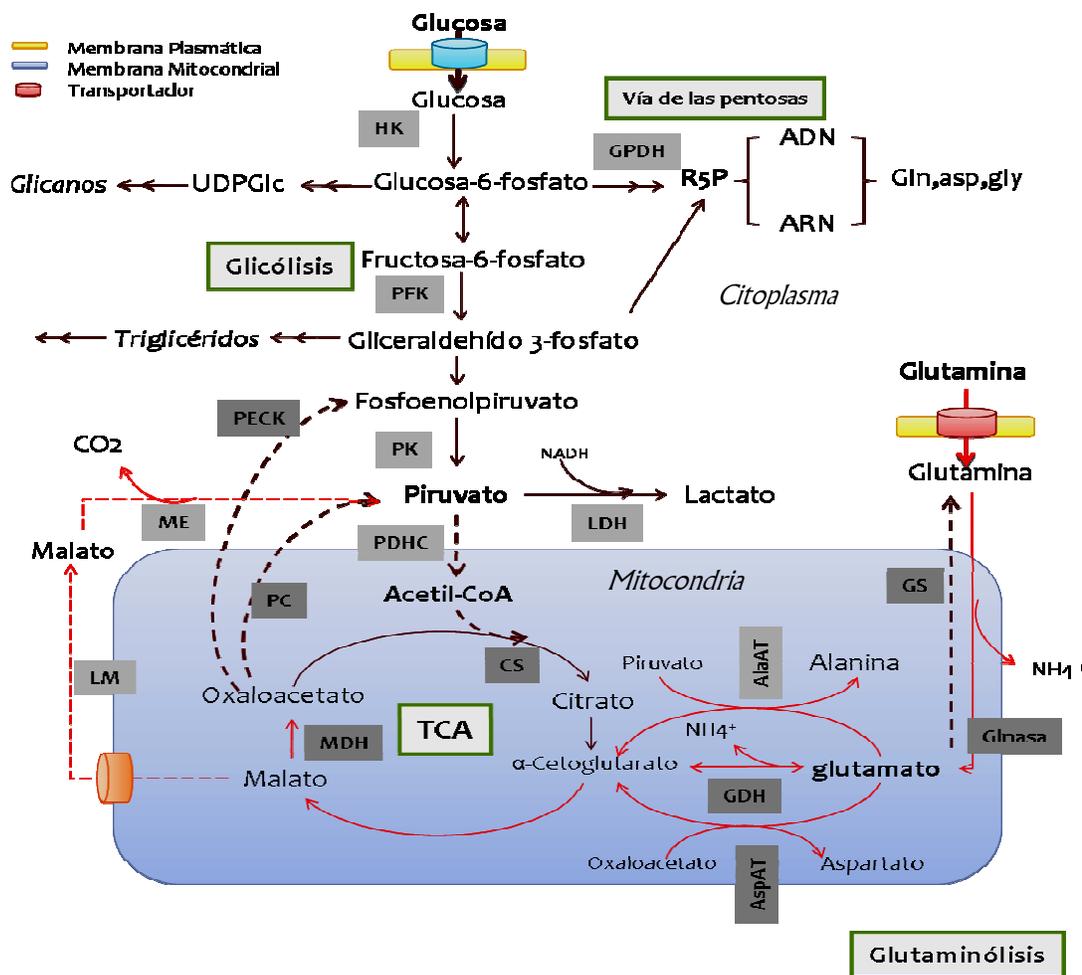
## APÉNDICE C

### EL METABOLISMO DE CÉLULAS ANIMALES: DESPERDICIO DE CARBONO MEDIANTE GLUTAMINÓLISIS

Se sabe que a diferencia del tejido del que provienen, las células animales cultivadas *in vitro*, muestran un metabolismo altamente desregulado y consumen las principales fuentes de energía (glucosa y glutamina) a velocidades muy por encima (>400 veces) de las requeridas para soportar el metabolismo celular [4,5,16,28,93,110,150]. Provocando su rápido agotamiento del medio de cultivo y una utilización ineficiente de ambos sustratos, que deriva en la acumulación de lactato y amonio los cuales a su vez, modifican el pH y generan un ambiente tóxico para la célula [5,21,74,89,93,102,150].

El metabolismo de glucosa puede proveer energía mediante la glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o la vía de las pentosas. Sin embargo se ha demostrado que existe un acoplamiento ineficiente entre glicólisis y TCA, de tal forma que del 95% de la glucosa metabolizada (glicólisis) el 4.6% entra a vía de las pentosas, 18% va a otras vías como metabolismo de lípidos y glicosilación de proteínas, sólo el 0.6% entra a TCA y la gran mayoría se dirige a la formación de lactato [34,102]. Por su parte, la glutamina puede sufrir una oxidación completa hasta CO<sub>2</sub> a través del TCA (entra como  $\alpha$ -cetoglutarato), o una oxidación parcial a través de un proceso conocido como *glutaminólisis*, que comprende al menos 8 vías individuales durante las que se sintetizan compuestos de 3 o 4 carbonos como lactato, alanina y aspartato, liberando amonio y CO<sub>2</sub> [Figura 36] [89,93,102,111,150].

Se ha demostrado para distintos cultivos celulares, que la glutamina consumida se distribuye de la siguiente forma: 35-60% para la formación de CO<sub>2</sub>, 15-25% macromoléculas, 14-18% glutamato y 10-20% lactato, incluso en presencia de altas concentraciones de glucosa [16,89,111,150]. No obstante, la contribución energética de cada sustrato de manera individual ha sido difícil de delimitar, pues se sabe que ambas vías están estrechamente relacionadas entre sí por un equilibrio metabólico interactivo; de tal forma que la glucosa induce la utilización de glutamina y la glutamina a su vez estimula la utilización de la glucosa a través de la glicólisis y la vía de las pentosas, pero inhibe su oxidación a través del TCA [93]. Un estudio interesante realizado por Petch, et. al. (1994) evidenció que en hibridomas cultivados a 37°C en agitación y medio con suero, el 59% del ATP generado por la célula provenía de glucosa y el 41% de la glutamina; además, la contribución energética se distribuía entre las distintas vías metabólicas de la siguiente forma: 3% del ATP provenía de vía de las pentosas, 5% de TCA, 51% de glicólisis, 34% de la formación de -



**Figura 36. Esquema de las vías metabólicas más relevantes en células CHO.** La generación de energía en células animales cultivadas in vitro se lleva a cabo principalmente por glicólisis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), vía de las pentosas y glutaminólisis. Esta última vía comprende al menos 8 vías individuales durante las cuales la glutamina sufre una desaminación (glutaminasa) para sintetizar glutamato y a partir del él se puede sintetizar  $\alpha$ -cetoglutarato (glutamato deshidrogenasa) que puede ser oxidado hasta  $\text{CO}_2$  o salir de la mitocondria como malato, el cual es convertido a alanina, lactato o aspartato en el citoplasma. Esto incrementa el ratio  $\text{NADH}/\text{NAD}$  y favorece la producción de lactato. Las líneas punteadas indican que una actividad enzimática baja y las líneas gruesas las enzimas más activas.

alanina, 2% de la formación de aspartato y 5% de la formación de lactato [102]. De esta forma, ambos sustratos aportan energía a la célula aproximadamente en la misma proporción, siendo la glicólisis y la formación de alanina, las vías metabólicas más activas (Figura 36) [102].

Por otro lado, Neermann, et. al. [1996] demostraron que las actividades enzimáticas son las que realmente condicionan el desempeño del metabolismo, existiendo reacciones limitantes que corresponden a puntos de regulación [93]. Así, la acumulación de glucosa en el citoplasma es resultado de un alto consumo y de la incapacidad de metabolizarla a la misma velocidad, pues la primera enzima de la glicólisis (hexocinasa) presenta una baja actividad, mientras que las enzimas más activas corresponden a los pasos finales (lactato deshidrogenasa y piruvato cinasa). Aunado a

esto, el complejo piruvato deshidrogenasa presenta una actividad casi nula, generando un “sumidero metabólico” [93] que provoca el acoplamiento ineficiente glicólisis-TCA y la acumulación de lactato [4,5,93,102]. Esta ineficiencia se agudiza por que la alta tasa a la que se realiza la glutaminólisis, provoca que el flujo de  $\alpha$ -cetoglutarato a oxaloacetato sea mucho mayor que el flujo de acetil-CoA hacia  $\alpha$ -cetoglutarato; además la mayor parte del citrato producido en el ciclo es transferido fuera de la mitocondria con fines biosintéticos [16,5,93]. En la Tabla 17 se muestran las temperaturas y pH óptimos para enzimas clave del metabolismo energético de mamíferos; considerando que la temperatura disminuye de manera general la actividad enzimática, entonces ambos sustratos seguirían siendo oxidados parcialmente, pues la incapacidad de metabolizarlos se agravaría.

**Tabla 17.** Temperatura y pH óptimos para enzimas clave de la glicólisis, TCA, glutaminólisis, vía de las pentosas, síntesis y degradación de ácidos grasos

Enzima	pH <sub>óptimo</sub>	Temperatura óptima	E.C.
Hexocinasa	7.4*	37,30°C‡	2.7.1.1
Fosfofructocinasa	7.1*	27-28°C*	2.7.1.11
Piruvato cinasa	6.5-7.0‡	37°C‡	2.7.1.40
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	8 <sup>o</sup>	28-32°C <sup>ψ</sup>	1.2.1.12
Lactato deshidrogenasa	7.4*	25°C*	1.1.1.27
<b>Piruvato deshidrogenasa (E1)</b>	<b>7.4-7.6‡</b>	<b>30°C‡</b>	<b>1.2.4.1</b>
Dihidrolipoamida S-acetiltransferasa (E2)	7.4 <sup>ψ</sup>	37°C <sup>ψ</sup>	2.3.1.12
Dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3)	8 <sup>o</sup>	37°C <sup>o</sup>	1.8.1.4
<b>Citrato sintasa</b>	<b>8‡</b>	<b>30°C<sup>o</sup></b>	<b>2.3.3.1</b>
Isocitrato deshidrogenasa	7.2*	25°C*	1.1.1.42
$\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (E1)	7.4*	37°C*	1.2.4.2
Dihidrolipoil succiniltransferasa (E2)	7.2 <sup>ψ</sup>	30°C <sup>ψ</sup>	2.3.1.61
Dihidrolipoil deshidrogenasa (E3)	8 <sup>o</sup>	37°C <sup>o</sup>	1.8.1.4
Malato deshidrogenasa	7.2-7.8‡	NRM	1.1.1.37
Enzima málica	7.4 <sup>o</sup>	30°C <sup>o</sup>	1.1.1.39
Piruvato carboxilasa	7.6‡	NRM	6.4.1.1
Fosfoenolpiruvato carboxicinas	7.5‡	37,25°C‡	4.1.1.32
Alanina aminotransferasa	8.5‡	37°C <sup>o</sup>	2.6.1.2
Aspartato aminotransferasa	8*	37°C <sup>o</sup> ‡	2.6.1.1
Glutaminasa	7.4-8.5*	37°C*	3.5.1.2
Glutamino sintetasa	7.2‡	37°C <sup>o</sup>	6.3.1.2
Glutamato deshidrogenasa	8-9‡	NRM	1.4.1.3
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	7.2-8.1‡	37-38°C‡	1.1.1.49
Acetil-CoA carboxilasa	7.4-7.65‡	NRM	6.4.1.2
Ácido graso sintasa	6.8‡	25°C‡	2.3.1.85
<b>Triacilglicerol lipasa</b>	<b>7-8.6‡</b>	<b>23°C‡</b>	<b>3.1.1.3</b>
<b>Carnitil palmitoil transferasa</b>	<b>7.4-8*</b>	<b>30°C*</b>	<b>2.3.1.21</b>

Los datos se obtuvieron de la base de datos BRAunschweig ENzyme DAtabase (BRENDA) para rata (+), ratón (\*), humano (o) y otros mamíferos ( $\psi$ ), en ese orden de preferencia; NRM=no reportado para mamíferos; E1,E2 y E3: son las enzimas que conforman parte de los complejos piruvato deshidrogenasa y cetoglutarato deshidrogenasa (orden descendente), (°) dato para hibridomas Las filas sombreadas corresponden a puntos de regulación del metabolismo, en negritas se muestran aquellas enzimas cuya actividad y/o expresión han incrementado en el metabolismo de mamíferos hibernantes [134].