



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DEL POTENCIAL REDOX EN LA SIALIDACIÓN DE UN
ANTICUERPO MONOCLONAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Ing. Frania Jaqueline Zúñiga Bañuelos

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rosario Vera Estrella
Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Iván Martínez-Dunker
Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM

Cuernavaca, Morelos, Diciembre 2017



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 de la Dra. Laura A. Palomares Aguilera. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de maestría no. 384123 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT. Investigación realizada gracias al programa UNAM-PAPIIT IT 200315 y proyecto SEP-CONACyT 255445.

A mis Padres, por toda su confianza, amor y por el esfuerzo que han realizado en impulsarme para alcanzar mis sueños. A mis hermanos, Carlos, Arcelia, Ernesto y Fátima a quienes jamás dejaré solos. A todos y cada uno de ellos, dedico esta Tesis.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Alicia Palomares por haber aceptado ser mi asesora, haberme impulsado a ir por caminos inimaginables, por su paciencia, su gran apoyo, y su valiosa confianza.

Al Dr. Tonatiuh Ramírez Reivich por haberme aceptado en su grupo, por sus consejos y por brindarme su apoyo a lo largo de mi formación.

A la familia Zavala Alvarado por brindarme su apoyo y confianza, especialmente a J. Crispín Zavala Alvarado por contagiarme de su optimismo y entusiasmo.

Al Dr. Arturo Pimentel, Técnico Académico del LNMA, por brindarme entrenamiento y asesoría técnica en el manejo de los microscopios. Además, por su colaboración al desarrollar los códigos aplicados en el análisis de las imágenes obtenidas en este trabajo.

A las Técnico Académico Vanessa Hernández, Ana Ruth Pastor, Rosa Román y Martha Contreras por brindarme entrenamiento, apoyo y por su respetable organización al tener siempre disponibles los materiales necesarios para desarrollar mis experimentos.

Al Dr. Alejandro Alagón, la Dra. Marcela Ayala, la Dra. Angélica Meneses, el Dr. Arturo Pimentel y el Dr. Takuya Nishigaki por sus sabias críticas sobre este trabajo y por haber aceptado formar parte de mi jurado.

A los miembros de mi comité tutorial la Dra. Rosario Vera y el Dr. Iván Martínez-Dunker, por sus observaciones y consejos durante el desarrollo experimental de este trabajo.

A mi familia y amigos por su confianza, alentarme y acompañarme en cada etapa de mi vida.

A Karin Levy Pop y Larisa Campos por su excelente trabajo administrativo.

A Xóchitl González, Antonio Dorantes y Cinthya Olvera porque sin su trabajo como Auxiliares de Laboratorio, nuestro trabajo sería más difícil.

A mis compañeros y amigos del grupo Palomares-Ramírez, porque en ellos encontré una nueva familia que me auxilió en los momentos más difíciles, particularmente a Enrique Paz, Alberto Porras, Elizabeth Carrasco, Carolina Gómez, Diana Vázquez, Emma Arévalo, David Moreno, Dubhe Bulte y David Montes.

Al Dr. Edson Cárcamo por su apoyo en la purificación de roGFP2, por sus consejos.

A Adrián Vergara Huicochea, quien además de asegurarse de llevarnos con bien a casa, es principalmente un invaluable amigo.

Al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada por su excelente soporte técnico.

A Gloria Villa y Antonio Bolaños por su eficiente y arduo trabajo en docencia a lo largo de mi maestría y proceso de titulación.

A Shirley Ainsworth y Omar Arriaga porque sin su trabajo en la Unidad de Biblioteca, la cimentación de este estudio no sería posible.

A los miembros de la Unidad de Cómputo, porque sin su trabajo el mío no hubiera sido posible.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1. <i>El anticuerpo monoclonal y la importancia de su N-glicosilación</i>	5
2.2. <i>Células CHO (Chinese hamster ovary) como sistema de producción de biofarmacéuticos</i>	7
2.3. <i>Impacto del metabolismo celular en la producción y N-glicosilación de anticuerpos monoclonales</i>	8
2.4. <i>Regulación de la sialidación en un IgG</i>	10
2.5. <i>La proteína roGFP2 como sensor de potencial redox intracelular (PRI)</i>	13
2.6. <i>Potencial redox en Golgi</i>	15
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	18
4.1. <i>General</i>	18
4.2. <i>Específicos</i>	18
5. METODOLOGÍA	19
5.1. <i>Producción y purificación de roGFP2 por cromatografía de afinidad a níquel</i> ...	20
5.2. <i>Determinación del grado de oxidación de roGFP2 en TBS</i>	21
5.3. <i>Aplicación de condiciones redox al AcM y determinación de su efecto en la estructura terciaria</i>	22
5.3.1. <i>Análisis de fluorescencia intrínseca del AcM</i>	23
5.4. <i>Aplicación de condiciones redox al AcM y determinación de su efecto en la sialidación</i>	23
5.4.1. <i>Reacción de sialidación de AcM</i>	24
5.4.2. <i>Determinación del perfil de N-glicosilación del AcM por HPLC fase normal</i>	

5.5.	<i>Construcción del gen roGFP2 con péptido señal dirigido a trans-Golgi</i>	26
5.5.1.	Selección del péptido señal a Golgi en células CHO (<i>Cricetulus griseus</i>)..	26
5.5.2.	Selección y diseño de oligos.....	26
5.5.3.	Amplificación de secuencia codificante de péptido señal mediante PCR de alta fidelidad	27
5.5.4.	Integración del péptido señal a Golgi al gen roGFP2	28
5.5.5.	Ligación de roGFP2 _{golgi} en vector pJET 1.2.....	29
5.5.6.	Construcción del vector pFBGR-roGFP2 _{golgi} a partir del vector pFBGR-EGFP	30
5.5.7.	Generación del báculo recombinante roGFP2 _{golgi}	33
5.5.8.	Generación del baculovirus recombinante roGFP2 _{golgi}	35
5.6.	<i>Cultivo de línea celular CHO</i>	37
5.7.	<i>Localización de la proteína roGFP2</i>	37
5.8.	<i>Medición de potencial redox mediante roGFP2 en Golgi</i>	38
6.	RESULTADOS Y DISCUSION.	42
6.1.	<i>Producción de roGFP2 y purificación por cromatografía de afinidad a níquel</i> ...	42
6.2.	<i>Determinación del grado de oxidación de roGFP2 en TBS.</i>	44
6.3.	<i>Evaluación del efecto del potencial redox en la estructura terciaria de un AcM.</i>	47
6.4.	<i>Evaluación del potencial redox en la sialidación del AcM.</i>	56
6.5.	<i>Cinética de CHO en cultivos en matraz agitado.</i>	70
6.6.	<i>Expresión de roGFP2 en células CHO y análisis de colocalización en el Golgi.</i>	73
6.6.1.	Análisis de colocalización de roGFP2 en el complejo de Golgi.....	75
6.7.	<i>Evaluación del potencial redox en Golgi de células CHO.</i>	78
7.	CONCLUSIONES	83
8.	PERSPECTIVAS	84
9.	REFERENCIAS	85
10.	ANEXOS	90
10.1.	<i>Distribución del tamaño de las partículas por tratamiento de IgG1 a distintos potenciales redox.</i>	90
10.2.	<i>Efecto de potencial redox en BSA. Experimento de referencia</i>	92
10.3.	<i>Cinética de desplegamiento de IgG en PBS y TBS.</i>	95
10.4.	<i>Construcción del gen roGFP2_{golgi}</i>	99
10.5.	<i>Resultados de cuantificación indirecta de ácido siálico transferido. Evaluación del efecto del potencial redox en la sialidación de un IgG1.</i>	103

10.6.	<i>Perfil de N-glicosilación del IgG1 tratado a distintos potenciales redox.</i>	106
10.7.	<i>Estado de oxidación de roGFP2 en Golgi. Valores estadísticos</i>	111
	<i>Artículo de divulgación científica. El Potencial Redox Intracelular y su Importancia en Biotecnología.</i>	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura de anticuerpo IgG.	6
Figura 2.	N-glicanos característicos en los AcM humanos.	7
Figura 3.	Gradientes de oxígeno disuelto en biorreactor.	10
Figura 4.	Comparación de perfiles de glicosilación de un IgG3 con la sustitución F243A.	11
Figura 5.	Relación N-glicano con estructura C _H 2 de IgG.	12
Figura 6.	Cambios en el pico de excitación de roGFP2 dependientes del potencial redox.	14
Figura 7.	Relación entre el potencial redox (E) y el grado de oxidación del sensor (OxDroGFP2).	15
Figura 8.	Simulación de restricción	33
Figura 9.	Ejemplo de representación de potencial redox en Golgi.	40
Figura 10.	Etapas del algoritmo diseñado para el análisis de las imágenes.	41
Figura 11.	Purificación de roGFP2 y verificación de funcionalidad	43
Figura 12.	Relación entre potencial redox (E) y el grado de oxidación del sensor (OxDroGFP2).	45
Figura 13.	Cambio de potencial redox de roGFP2 a distintas concentraciones de DTT con respecto al tiempo	46
Figura 14.	Estructura de IgG1.	47

Figura 15. Efecto de DTT en los primeros 10 minutos de incubación a 37°C.....	48
Figura 16. Efecto de 2-mercaptoetanol y DTT en CME de IgG1	50
Figura 17. Efecto del DTT en el tamaño del AcM a los 10 minutos	52
Figura 18. Efecto del DTT y BME en el tamaño de un AcM a los 3 días	52
Figura 19. Grado de reducción de IgG1 a los 10 minutos a distintas concentraciones de DTT.	53
Figura 20. Grado de reducción de IgG1 a las 24 h a 10 mM DTT (-316.3mV)	54
Figura 21. Descripción de reacción de sialidación.	57
Figura 22. Perfiles de glicosilación después de sialidación acoplada a fosfatasa obtenidos por HPLC fase normal (experimento "A").	60
Figura 23. Cromatograma HPLC. Perfiles de glicosilación después de sialidación <i>in vitro</i> y desialidación	61
Figura 24. Cromatograma de muestra IgG1 -316.3 mV sialidado (A3) en fase móvil de 250 mM y 25 mM formato de amonio.	63
Figura 25. Abundancia relativa de glicanos después de las reacciones de sialidación experimento "B".	64
Figura 26. Cinética de sialidación de N-glicanos 2-AB sialidados a distintas concentraciones de DTT.	67
Figura 27. Estructura cristalográfica de ST6Gal1	68
Figura 28. Abundancia relativa de glicanos después de reacciones de sialidación experimento "C"	69
Figura 29. Cinética de crecimiento y metabolitos.	72
Figura 30. PCR de báculo	74
Figura 31. Ensayo de colocalización roGFP2 _{golgi} con el marcador de Golgi Bodipy TR ceramide en células CHO.	77

Figura 32. Límites de mínima y máxima reducción de Golgi.	79
Figura 33. Profundidad de pixel multiplicada por el cociente R resultante en las regiones seleccionadas a partir de la segmentación.	80
Figura 34. Cambio en R media con respecto al estado basal.....	81
Figura 35. Estructura de BSA.....	93
Figura 36. Espectros de emisión de triptófanos de la proteína BSA colectados a lo largo del tiempo.....	94
Figura 37. Efecto de DTT en el CME de BSA.	95
Figura 38. Efecto de DTT en el CME de IgG1	96
Figura 39. Dependencia de la temperatura del pKa.....	97
Figura 40. Espectro de emisión de la fluorescencia intrínseca del triptofano bajo condiciones reductoras.	98
Figura 41. Amplificación de la secuencia del péptido señal a Golgi	99
Figura 42. PCR de células de <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue transformadas con la ligación pJET1.2 (roGFP2golgi)	100
Figura 43. Mapa de restricción del vector pFBGR-EGFP con roGFP2 _{golgi}	101
Figura 44. PCR de células de <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue después de la transformación con la ligación pFBGR- roGFP2 _{golgi}	102
Figura 45. Confirmación de construcción pFBGR-roGFP2 _{golgi} proveniente de la colonia 2.6.....	103
Figura 46. Determinación de ácido siálico transferido mediante el ensayo de fosfatasa acoplada a sialiltransferasa	105
Figura 47. Abundancia relativa en glicofomas de experimento "A".....	106
Figura 48. Cromatograma típico del IgG1 sin tratamiento.	106

Figura 49. Cinéticas de sialidación de N-glicanos 2AB en presencia de DTT	110
Figura 50. Análisis de proporcionalidad (I_{405}/I_{488}) de roGFP2 en Golgi de células CHO ante la adición	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de reacciones con la enzima sialiltransferasa	24
Tabla 2. Oligos a utilizar para la construcción del gen <i>roGFP2_{golgi}</i>	26
Tabla 3. Componentes de reacción de PCR usando Phusion high-fidelity PCR master mix Thermo Scientific®	28
Tabla 4. Plásmidos utilizados para la generación del baculovirus roGFP2golgi	28
Tabla 5. Composición de reacción de PCR de colonia	30
Tabla 6. Reacción de ligación del vector pFBGR con gen <i>roGFP2_{golgi}</i> PacI/XhoI	31
Tabla 7. Esquemas resultantes de la predicción de restricción con SpeI y XbaI en los plásmidos pFBGR-EGFP y pFBGR-roGFP2 _{golgi}	32
Tabla 8. Rendimientos logrados a partir de la purificación de roGFP2	42
Tabla 9. Parámetros para el cálculo de Ox_{roGFP2}	44
Tabla 10. Valores de las constantes en la ecuación de Nernst para las condiciones del experimento	44
Tabla 11. Comparación de diferencias en el desplegamiento de IgG1 a distintas condiciones redox.	49
Tabla 12. Reacciones de sialidación conjunto de experimentos "A, B y C"	58
Tabla 13. Cálculo de picomoles de galactosa equivalentes a un nanomol de AcM añadido a la reacción con base en el patrón de glicosilación del anticuerpo utilizado	59

Tabla 14. Datos del consumo de sustratos durante el crecimiento de CHO.....	70
Tabla 15. Análisis de colocación de roGFP2 en Golgi.....	76
Tabla 16. Cálculo de nanomoles de galactosa equivalentes al total de AcM añadido a la reacción con base en el patrón de glicosilación del anticuerpo utilizado.	104
Tabla 17. Reacciones de sialidación experimento "A".	104
Tabla 18. Perfil de glicosilación típico del AcM.	107
Tabla 19. Abundancia relativa de glicofomas en las muestras de las reacciones de sialidación experimento B.	108
Tabla 20. Abundancia relativa de glicofomas en las muestras de las reacciones de sialidación experimento C.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 21. Valores estadísticos del cociente R según etapa de equilibrio redox. .	111

ABREVIATURAS

2AB	2-amino benzamida
AcM	Anticuerpo monoclonal
ACS	Alta concentración de sales
Amp	Ampicilina
AmpR	Resistencia a ampicilina
Ar-JP	Autosomal recessive juvenile Parkinsonism
BA	Paso de altas (longitud de onda)
BCS	Baja concentración de sales
BME	2-mercaptoetanol
BSA	Albúmina sérica bovina
CD37	5' Nucleotidasa CD37
cel	Células
C _H	Dominio de la cadena pesada fracción cristalizable
CHO	Células de Ovario de Hámster Chino
CME	Centro de masa espectral
CMP	Citidín monofosfato
CMV	Citomegalovirus
CT	Carboxilo terminal
Ctrl	Control
DE	Desviación estándar
dNTP	desoxirribonucleótidos
DTT	Ditiotreitol
E	Potencial Redox
Em	Emisión
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Ex	Excitación
Fc	Fracción cristalizable
PF	Proteína fluorescente
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
fwd	Iniciador hacia delante
GC	Guanidina-Citosina
GenR	Gentamicina resistencia
HBSS	Solución salina balanceada de Hank
HEPES	Amortiguador ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetano sulfónico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICQ	Por sus siglas en inglés " <i>Intensity Correlation Quotient</i> "
IF	Intensidad de fluorescencia
IFN- γ	Interferón gamma

IgG	Inmunoglobulina
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
KanR	Resistencia a kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
M1, M2	Coefficiente de Manders
M13	Región de recombinación en báculo
MDI	Multiplicidad de Infección
NeoR	Resistencia a neomicina
NT	Amino terminal
NT-2	Línea clonal de células pluripotenciales de carcinoma embrional humano
ORP	Potencial de óxido-reducción
P ₁₀	Promotor p10 de Baculovirus
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
P _{CMV}	Promotor de citomegalovirus
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P _{T7}	Promotor T7
R	Cociente de proporcionalidad
R ^P	Coefficiente de Pearson
R/R ₀	Cociente de proporcionalidad
rev	Iniciador reverso
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SCM	Sitio de clonación múltiple
SK-N-MC	Células de neuroblastoma humano
ST6Gal1	α (2,6)-Sialiltransferasa
TA	Temperatura ambiente
TBS	Amortiguador trizma base salino
Tm	Temperatura de fusión
TnL7	Sitio específico de transposón Tn7 izquierdo
TnR7	Sitio específico de transposón Tn7 derecho
U	Unidades de actividad enzimática
UFP	Unidades formadoras de placa
UG	Unidades de glucosa
URF	Unidades relativas de fluorescencia
VAA	Virus adenoasociado
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

En años recientes, los anticuerpos monoclonales han sido un biofarmacéutico de gran relevancia por su uso terapéutico contra el cáncer, infecciones y enfermedades autoinmunes. Los anticuerpos son glicoproteínas que contienen una secuencia biantenaria de azúcares en la región Fc, denominada N-glicosilación. La N-glicosilación modula la función efectora del anticuerpo, ya que la fracción Fc es reconocida por receptores celulares que desencadenan mecanismos de remoción. Por lo que diseñar modelos de producción que generen un perfil de N-glicosilación sistemático en el anticuerpo, es una condición indispensable para su aplicación en terapias de uso clínico.

La producción comercial de anticuerpos requiere cultivos de cientos de litros, susceptibles a presentar heterogeneidades en la distribución de nutrientes y gases, especialmente oxígeno disuelto. Se ha observado que periodos largos de limitación de oxígeno provocan un aumento en la producción de anticuerpos con N-glicanos los sialidados, escasos en la población típica de IgG1 en humanos. Se puede esperar que el equilibrio de factores que regulan la N-glicosilación, se remodele durante la limitación de oxígeno, pues al ser el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria, tiene un papel importante en la homeóstasis celular, especialmente en el equilibrio de las especies redox. También se ha demostrado, que la sialidación depende de la estructura terciaria del anticuerpo. De manera que surge la motivación de buscar una relación entre el equilibrio de especies redox, la estructura terciaria del anticuerpo y su sialidación.

En este proyecto se estudió el potencial redox en el Golgi, donde sucede la glicosilación compleja de proteínas. Se utilizó la proteína sensora de potencial redox roGFP2, dirigida a Golgi. Se expresó de forma transitoria en células CHO mediante la transducción con un baculovirus que contiene la secuencia codificante. Como reportero del estado redox intracelular, ésta proteína es capaz de medir potenciales redox en el rango de -240 a -320 mV. Se realizaron mediciones del cambio del potencial redox intracelular en células CHO usando

microscopía de fluorescencia como herramienta de cuantificación. De manera paralela, se diseñó un modelo experimental *in vitro*, para emular las condiciones redox encontradas en Golgi por roGFP2. Este diseño experimental fue aplicado a un anticuerpo, evaluando el cambio de su estructura terciaria y el grado de sialidación en presencia de una sialiltransferasa y ácido siálico.

El estudio realizado revela que condiciones reductoras inducen el desplegamiento de la estructura terciaria del anticuerpo y disminuyen su sialidación. El análisis de los resultados relativos al grado de oxidación del sensor roGFP2 en Golgi y su respuesta ante DTT y H₂O₂, permitió establecer una hipótesis sobre el estado basal del potencial redox del Golgi y su comportamiento ante cambios en el ambiente redox, sugiriendo que el Golgi mantiene un equilibrio oxidante. El estudio resultante del desarrollo experimental y analítico realizado en este trabajo, plantea nuevas perspectivas para el estudio del fenómeno de sialidación en la maquinaria de glicosilación, no solo desde un punto de vista industrial, sino también desde el punto de vista inmunológico, por ejemplo, como parte de un sistema que existe durante la producción de anticuerpos por células B.

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación, se realizó una revisión sobre el estado del arte del potencial redox intracelular y su importancia en biotecnología, publicada en la revista BioTecnología por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.

1. INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos monoclonales recombinantes (AcM) han revolucionado la medicina, 17 de los 54 productos biofarmacéuticos aprobados en EE. UU. y la Unión Europea, desde el 2010 a la fecha son anticuerpos monoclonales (Walsh 2014). El modo de acción de los medicamentos basados en AcM dependen de la unión del anticuerpo a algún epítipo específico, mediada por la región Fab del anticuerpo, y en muchos casos, de su función efectora mediada por la región Fc, la que posee un sitio de N-glicosilación en la Asn297 de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo (Ahmed *et al.* 2014).

La N-glicosilación es una modificación postraducciona l de las proteínas que sucede en el retículo endoplásmico (RE) y en el Golgi, en la cual un oligosacárido (N-glicano) se une al péptido naciente y posteriormente es modificado por una serie de reacciones catalizadas por exoglicosidasas y glicosiltransferasas (van Anken y Braakman 2008). Se ha demostrado que la estructura del N-glicano determina la estabilidad y la función efectora del AcM (Ghirlando *et al.* 1999). La N-glicosilación es un proceso energéticamente demandante, que puede ser afectado por las condiciones de cultivo (Serrato *et al.* 2004; Amand *et al.* 2014; Costa *et al.* 2013).

Los anticuerpos monoclonales recombinantes se producen en cultivos de células de ovario de hámster chino (CHO), frecuentemente en biorreactores de miles de litros. A estas escalas, deficiencias en el mezclado son frecuentes, resultando en la exposición de las células a condiciones fluctuantes, frecuentemente no óptimas para su crecimiento o para la producción de proteínas recombinantes (Palomares y Ramírez 2010). En nuestro grupo, se ha observado que el someter células animales a condiciones fluctuantes de oxígeno disuelto resulta en cambios en el patrón de N-glicosilación de AcM (Serrato *et al.* 2004). Los patrones de N-glicosilación resultantes difieren de aquellos típicos de AcM, especialmente por la presencia de N-glicanos complejos, mayormente con ácido siálico terminal.

Este trabajo analiza la forma en que la heterogeneidad en la concentración de especies redox extracelulares afecta el equilibrio en las especies oxido-reductoras al interior de la célula. La hipótesis de trabajo es que cambios en el potencial redox reductor intracelular, resultan en la alteración de la estructura terciaria del AcM y la modificación de sus N-glicanos.

2. ANTECEDENTES

2.1. El anticuerpo monoclonal y la importancia de su N-glicosilación

Como parte esencial del sistema inmune, los anticuerpos son moléculas centrales en el proceso de identificación, marcaje y eliminación de moléculas ajenas al organismo huésped. El creciente uso terapéutico de los AcM ha derivado en el desarrollo y sofisticación de las metodologías experimentales utilizadas para su producción. Al respecto, la calidad de un anticuerpo se determina en base a varios factores, por ejemplo, la ausencia de contaminantes, de agregados y uno de los más importantes, dado que influye en la eficacia del AcM, su N-glicosilación (Jefferis 2009).

Usualmente la estructura de un anticuerpo IgG se representa como forma de “Y”: los brazos constituyen la fracción variable de unión al antígeno (Fab), la cual se compone por dos cadenas ligeras y los dominios V_H y C_{H1} de las cadenas pesadas (Figura 1). El resto del anticuerpo constituye la fracción cristalizable (Fc) y está formada por los dominios C_{H2} y C_{H3} . Esta última fracción cumple la función de unirse a los receptores FcγR y C1q, activando diversos mecanismos de respuesta inmune, como fagocitosis, citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad mediada por complemento (CDC) (Wright y Morrison 1997). Los dominios C_{H2} de la fracción Fc tienen una característica importante, están N-glicosilados de manera conservada en el aminoácido Asn297.

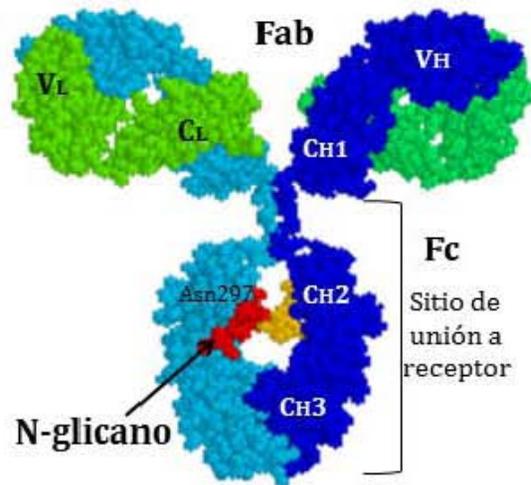


Figura 1. Estructura de anticuerpo IgG. Cadenas pesadas señaladas en azul, cadenas ligeras señaladas en verde. Fab: Fracción de unión a antígeno, FC: Fracción cristalizante. Asn297 indica el sitio de unión a N-glicano, los cuales se muestran como el área roja.

La N-glicosilación es una de las principales modificaciones postraduccionales de las proteínas, y consiste en una cascada de reacciones mediadas por glicosiltransferasas, glicosidasas y transportadores de azúcares, en las que se enlazan monosacáridos dentro del RE, forman un oligosacárido que es translocado a la proteína naciente en la Asn de la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X≠Pro); la cadena unida es modificada por exoglicosidasas antes de ser transportada al Golgi, como parte del control de calidad del plegamiento de la proteína dentro del RE. Una vez en el Golgi, el N-glicano es nuevamente modificado por exoglicosidasas y glicosiltransferasas para conformar glicanos bi, tri- o tetra-antennarios, los que pueden contener ácido siálico terminal (sialidación) (Palomares y Ramirez 2007; Shi y Goudar 2014). La N-glicosilación de la región Fc del anticuerpo IgG en humanos se caracteriza por tener glicanos biantenarios con galactosas terminales y sialidación menor al 10%, como se muestra en la Figura 2.

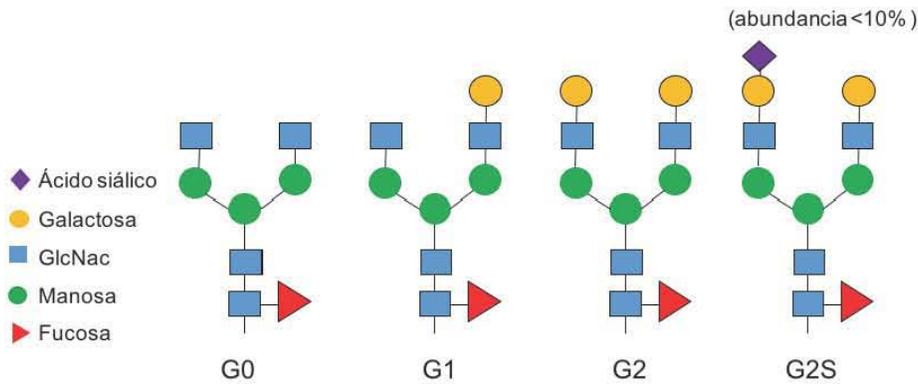


Figura 2. N-glicanos característicos en los AcM humanos. (Raju 2008).

Se ha demostrado que un patrón de N-glicosilación sin galactosas (G0) induce respuestas autoinmunes, como la artritis reumatoide. Además, la no fucosilación y los glicanos biantenarios aumentan el efecto citotóxico al incrementar la afinidad de la región Fc por el receptor. Por otro lado, la sialidación induce respuesta anti-inflamatoria, además de aumentar el reconocimiento del anticuerpo por proteasas (Kaneko *et al.* 2006; Raju 2008; Jefferis 2009).

2.2. Células CHO (*Chinese hamster ovary*) como sistema de producción de biofarmacéuticos

Las células de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*) son una de las más utilizadas para la generación de una amplia gama de proteínas recombinantes terapéuticas, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, factores de crecimiento, hormonas, interferones y enzimas (Walsh 2014). Entre las características que presenta esta línea celular se encuentra que realizan modificaciones postraduccionales similares a las de humano, son genéticamente manipulables y pueden crecer de forma adherente o en suspensión (Wurm 2004; Durocher y Butler 2009; Kennard *et al.* 2009), factores que convierten a este modelo biológico

en un buen candidato para usarse en procesos de manufactura en biorreactores a gran escala.

A lo largo del tiempo se han desarrollado estrategias de producción para conseguir una constante mejora en calidad, sistematicidad y eficiencia. (Fischer *et al.* 2015). En relación a las proteínas glicosiladas como los AcM, se han estudiado los genes involucrados en las vías de glicosilación encontrando, por ejemplo, que la línea celular CHO/K1, carece solamente de 3 genes homólogos de los 300 genes involucrados con la síntesis de glicanos en humanos, a pesar de esto, únicamente se ha detectado expresión del 53% de los genes identificados (Xu *et al.* 2011). El impacto de la expresión diferencial de genes en células CHO es relativo al perfil de glicosilación de cada glicoproteína, por ejemplo, dado que la mayoría de las sialidaciones encontradas en humanos poseen el enlace $\alpha(2-6)$ es necesario que la producción de glicoproteínas terapéuticas sializadas presente este enlace, sin embargo, no se ha detectado expresión en células CHO de la enzima $\alpha(2-6)$ sialiltransferasa, aunque se ha confirmado la presencia de su gen (Xu *et al.* 2011). Una solución a este problema fue propuesta por Lin *et al.* (2015), al sobreexpresar el gen ST6GAL1 en células CHO, obteniendo un aumento del ácido siálico, unido al N-glicano de un IgG1.

2.3. Impacto del metabolismo celular en la producción y N-glicosilación de anticuerpos monoclonales

Existen formas de mejorar la producción de las proteínas terapéuticas sin utilizar herramientas de manipulación genética, este es el caso de un estudio realizado en células CHO productoras de un AcM en el que lograron predecir y controlar el proceso de N-glicosilación variando la composición del medio de cultivo (Grainger y James 2013). Restelli *et al.* (2005) reporta la producción de eritropoyetina por células CHO en biorreactores, variando la concentración de oxígeno disuelto (OD) de 3 a 200%. Ellos encontraron que la fucosilación aumentó significativamente a las concentraciones de 50 y 100% de OD.

El cultivo de células animales a gran escala puede presentar deficiencias en la disponibilidad de nutrientes, pH, CO₂, O₂, etc., cuando hay mezclado deficiente, lo que resulta en condiciones ambientales heterogéneas (Lara *et al.* 2006). El oxígeno disuelto resulta un parámetro importante a controlar debido a su participación en respiración celular y en la producción de EROs (especies reactivas de oxígeno). La limitación de oxígeno disuelto afecta el metabolismo central, principalmente a la cadena respiratoria, pues al no haber suficiente oxígeno como último aceptor de electrones, disminuye la velocidad de generación de ATP, reduciendo al mismo tiempo la velocidad de oxidación de NADH, provocando su acumulación y el desplazamiento del equilibrio redox hacia un ambiente más reductor (Hevehan y Miller, 1999). En consecuencia, la necesidad de ATP inducirá un aumento en el consumo de glucosa a través de la glicólisis, y la necesidad de equivalentes reductores, resultará en la generación de lactato. Al mismo tiempo, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos será inhibido, lo que reducirá la producción de precursores metabólicos (Young 2013). Como resultado, el efecto metabólico de la limitación de oxígeno también se verá reflejado en la maquinaria de glicosilación, al afectar la síntesis de azúcares, nucleótidos transportadores de azúcares, la tasa de transcripción de glicosiltransferasas y glicosidasas, así como la producción de la glicoproteína recombinante.

La Figura 3 muestra la concentración de oxígeno disuelto en un tanque agitado, de acuerdo al código de color, ilustrando que cuando la limitación de oxígeno es transitoria y recurrente, como en el caso de los biorreactores de gran escala, las células enfrentan condiciones ambientales heterogéneas. Con el fin de determinar el efecto de estas condiciones en la producción de un AcM, Serrato *et al.* (2004) estudiaron la producción de un AcM en hibridoma murino cultivado bajo oscilaciones de oxígeno disuelto, emulando los gradientes de oxígeno presentes en condiciones de mezclado ineficiente, encontrando que periodos largos de limitación de oxígeno disuelto resultan en el aumento del porcentaje de glicanos sializados, atípicos en anticuerpos.

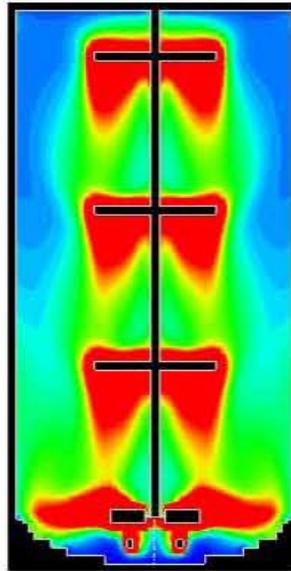


Figura 3. Gradientes de oxígeno disuelto en biorreactor. Zonas azules menor concentración a zonas rojas mayor concentración. © André Bakker 1998.

2.4. Regulación de la sialidación en un IgG

Resulta interesante entender qué controla la unión de un ácido siálico al N-glicano de un anticuerpo. Indagaciones previas sugieren que el incremento de la sialidación en un anticuerpo obedece a un cambio en la estructura del anticuerpo, esto fue reportado por Jassal *et al.* (2001). En su estudio, en células CHO, se comparó el perfil de glicosilación resultante de la producción de un anticuerpo IgG3 nativo, contra un IgG3 que presentaba la sustitución F243A. Ellos encontraron un aumento de las glicofomas mono y di-sialidadas en el anticuerpo que presenta la sustitución F243A con respecto al anticuerpo nativo. Adicionalmente, contrastaron un IgG3 F243A producido en células CHO transfectadas con una $\alpha(2-6)$ sialiltransferasa de rata, como se muestra en la gráfica de la Figura 4, encontrando un incremento del 10% en la di-sialidación de los glicanos. En este contexto, Raymond *et al.* (2012) proponen que los azúcares de la hebra 1,6 del N-glicano mantiene interacciones CH/ π con el anillo bencénico de la fenilalanina 243 y 241 del IgG (Figura 5-A), por lo que se sugiere, que al sustituir fenilalanina por alanina, se favorece la flexibilidad del N-glicano ya que disminuyen las interacciones hidrofóbicas originalmente presentes. Además,

Ahmed *et al.* (2014) encontró que la mutación en IgG1 F241A, muestra un aumento en heterogeneidad conformacional del interdominio C_H2 (Figura 5-B), justo en la zona en el que esté presente el oligosacárido. Esta flexibilidad conformacional podría estar asociada con el aumento en la sialidación del anticuerpo. Con base en esto, se sugiere que la sialidación en un AcM está controlada por su estructura terciaria.

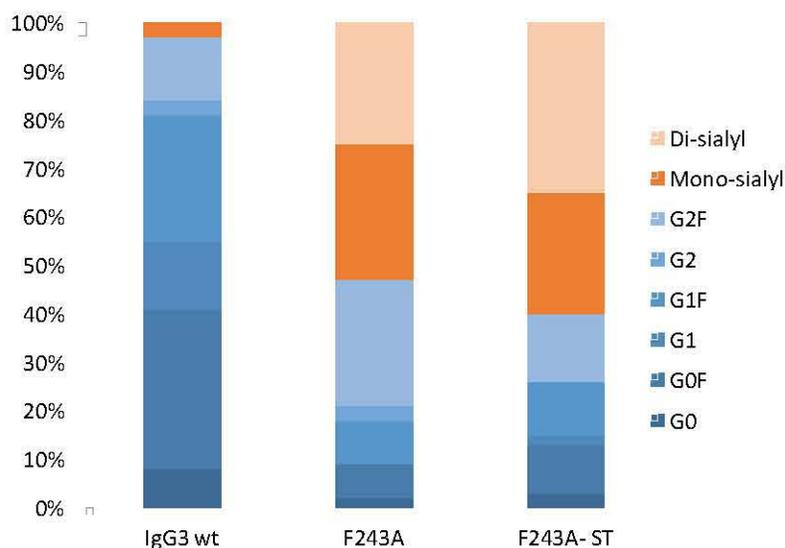


Figura 4. Comparación de perfiles de glicosilación de un IgG3 con la sustitución F243A. La primer barra (IgG3 wt), muestra las glicofomas resultantes de la producción de IgG3 nativo. La barra F243A muestra las glicofomas de un IgG3 con la sustitución de F243A y la barra F243A-ST, representa los perfiles del IgG3 F243A producido en células que sobreexpresan una $\alpha(2-6)$ sialiltransferasa de rata (Modificado de Jassal *et al.* 2001).

Adicionalmente, Kaneko *et al.* (2006) cuantificaron la abundancia de IgG sialidados en ratones preinmunes e inmunizados contra suero nefrotóxico. Ellos encontraron que la población de IgG sialidados es 40% menor en ratones inmunizados que en ratones preinmunes. Se propone entonces, que la población de IgG sialidados se modula de manera que aumenta cuando es deseable mantener un estado estacionario (respuesta anti-inflamatoria) y disminuye cuando es importante tener la capacidad de eliminar un antígeno (respuesta inflamatoria).

La capacidad intracelular de regular la sialidación de un IgG existe en el sistema inmunológico, y podría estar relacionada con la modificación de la estructura terciaria del IgG a lo largo de la vía secretora, particularmente en el *trans*-Golgi, donde ocurre la sialidación del IgG.

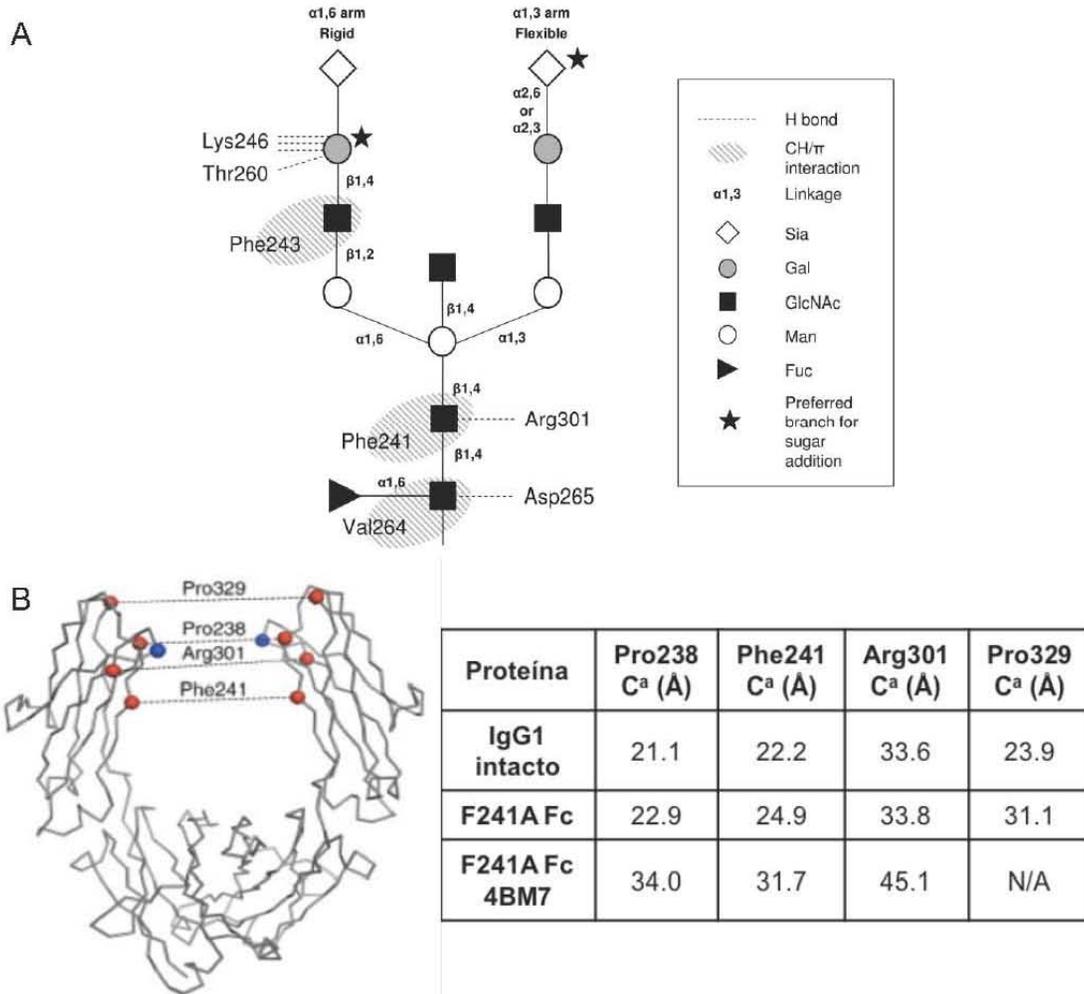


Figura 5. Relación N-glicano con estructura C_{H2} de IgG. A) Interacción N-glicano con aminoácidos del dominio CH₂ de IgG (Raymond *et al.* 2012) Sia: Ácido siálico, Gal: galactosa, GlcNAc: N-acetilglucosamina, Man: Manosa, Fuc: Fucosa. B) Comparación de la distancia entre el dominio C_{H2} en estructuras Fc. (Modificado de Ahmed *et al.* 2014).

2.5. La proteína roGFP2 como sensor de potencial redox intracelular (PRI)

Uno de los temas que ha sido objeto de estudio para la optimización de cultivos en biorreactores a gran escala, es el potencial redox de cultivos celulares (Zúñiga y Palomares, 2016). Al respecto, se ha desarrollado una amplia variedad de biosensores basados en proteínas fluorescentes (PF), que son capaces de reportar de manera indirecta información del ambiente químico dentro y fuera de la célula (Vizcaino-Caston *et al.* 2012). Un ejemplo de esta clase de biosensores, es la proteína verde fluorescente EGFP (por sus siglas en inglés, *enhanced green fluorescent protein*) y particularmente, su versión sensible a las condiciones redox ambientales, la proteína roGFP2. Se sabe que el cromóforo de la EGFP está formado por una ciclación de los aminoácidos T65/Y66/G67, tiene dos longitudes de onda máximas de excitación, a consecuencia de diferentes estados de protonación, determinados por las condiciones de residuos aledaños que en conjunto son afectados por el entorno que los rodea. La proteína EGFP dio lugar al biosensor roGFP2 al sustituir los residuos S147 y Q204 por cisteínas. La Figura 6 muestra los espectros de excitación y emisión de roGFP2 en dos condiciones redox distintas; reductoras (roja), oxidantes (azul), es importante considerar que los máximos de excitación a 405 y 488 nm se incrementan para el estado oxidado y reducido, respectivamente (Meyer y Dick 2010) la relación entre la intensidad de ambos picos permite conocer el grado de oxidación del sensor (OxDroGFP2), es decir la proporción de moléculas roGFP2 oxidadas en el sistema. Considerando la interacción entre roGFP2 con la especie intracelular más abundante, glutatión (2GSH/GSSG) y algunas consideraciones prácticas, se utiliza la ecuación de Nernst para encontrar la relación entre potencial redox y el grado de oxidación de roGFP2 intracelular, como se observa en la Figura 7. De esta forma ha sido posible conocer el ambiente redox de diversos sistemas (Meyer *et al.* 2007; Meyer y Dick 2010).

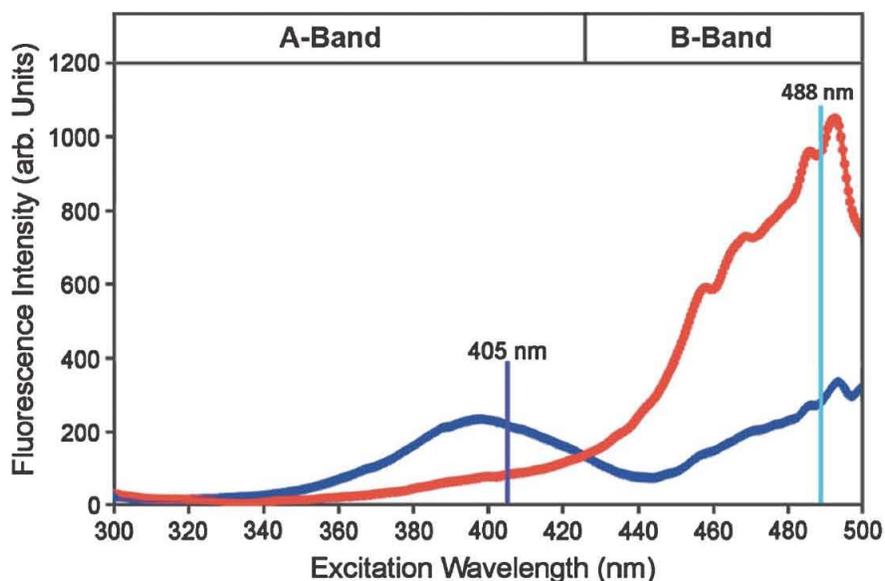


Figura 6. Cambios en el pico de excitación de roGFP2 dependientes del potencial redox. Cuando el fluoróforo está completamente reducido, el espectro de excitación muestra su máximo a 488 nm (línea roja). Cuando se encuentra completamente oxidada, muestra el espectro de excitación descrito por la línea azul, mostrando un máximo cercano a 405 nm (Meyer y Dick, 2010).

Dooley y colaboradores (2004) determinaron el potencial redox citosólico en células HeLa con roGFP1 y roGFP2, encontrando valores de -315mV y -325mV respectivamente, además en mitocondria se encontró un potencial redox más reductor, aproximadamente de -360mV. Austin *et al.* (2005) determinaron el potencial redox en lisosomas utilizando la proteína roGFP dirigida a este sitio, encontrando que su potencial redox es de -240 mV, mucho menos reductor que en mitocondria, pero similar al estado redox encontrado en retículo endoplásmico por Enyedi *et al.* (2010). En nuestro grupo se utilizó roGFP2mit expresada en baculovirus bac-roGFP2mit, para estudiar el efecto de la limitación de oxígeno disuelto en el potencial redox mitocondrial de células de insecto Sf+[®], encontrando que el equilibrio del potencial redox mitocondrial varía con respecto a cada condición entre -300 y -280 mV (Porrás, 2017 resultados no publicados).

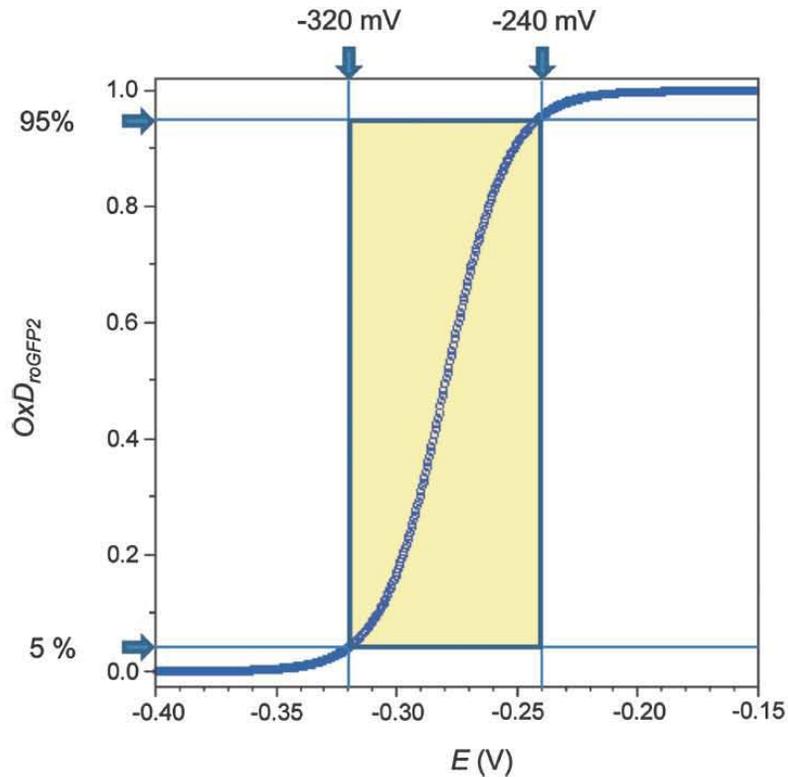


Figura 7. Relación entre el potencial redox (E) y el grado de oxidación del sensor (OxDroGFP2). (Meyer y Dick, 2010).

2.6. Potencial redox en Golgi

Después del descubrimiento del aparato de Golgi, hace más de 100 años, la complejidad de este organelo ha atraído el interés de muchos investigadores en diversos temas. El complejo de Golgi es un organelo dinámico formado por cisternas ajustadas, clasificadas como *cis*, *medio* y *trans*. En ellas existe una compartimentalización de enzimas y microambientes (pH y Ca^{2+}) (Pizzo *et al.* 2011; Hassinen y Kellokumpu 2014, Maeda 2015) que permiten la modificación post-traduccional de proteínas y lípidos de manera secuencial (Potelle *et al.* 2015). Aunque no se conoce el potencial redox en el Golgi, se han descrito mecanismos de respuesta ante estrés oxidante (Jiang *et al.* 2011). Por ejemplo, cuenta con las bombas $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPasas codificadas por los genes *ATPC1/ATP2C2* en mamíferos (Vanoevelen *et al.* 2005), que contribuyen a disminuir la concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} en el citoplasma, lo cual es muy relevante, por ser iones

involucrados en vías de señalización para la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) e inducción de apoptosis (Brookes *et al.* 2004; Görlach *et al.* 2015). En el Golgi también hay producción de antioxidantes por componentes en su membrana. La ubiquinona es un transportador de electrones y antioxidante (Nyquist *et al.* 1970; Crane *et al.* 1993; Maroz, *et al.* 2009), que evita principalmente la peroxidación lipídica relacionada a enfermedades cardiovasculares (Siegel *et al.* 2014). Dos glutarredoxinas (Grx6 y Grx7) y la proteína parkin se añaden a la lista de antioxidantes. Las primeras evitan la oxidación y posible degradación de proteínas citoplásmicas, lo que aumenta la resistencia de la célula al estrés oxidante (Mesecke *et al.* 2008). Parkin fue localizada en el *trans*-Golgi por Kubo *et al.* (2001). Posee un dominio ubiquitin en la región N-terminal y dos motivos tipo dedo de zinc. Fue llamada así porque es codificada por un gen que presenta amplias deleciones en pacientes con AR-JP (“Autosomal recessive juvenile Parkinsonism”) (Kitada *et al.* 1998). La sobreexpresión de parkin silvestre y mutada en células NT-2 y SK-N-MC por Hyun *et al.* (2002) mostró que la concentración de lípidos peroxidados es más alta en las células expresando la mutante. Lo anterior sugiere que estos componentes son vitales para conservar la homeostasis celular.

En el caso de la glicosilación de anticuerpos, se ha reportado que el proceso de maduración de linfocitos B para la producción de anticuerpos implica un cambio de potencial redox (Anken *et al.* 2003), sin embargo, no se sabe cómo afectan estos cambios al patrón de glicosilación del anticuerpo durante su tránsito a través del Golgi. Datos recientes sugieren que, al igual que el retículo endoplásmico y la mitocondria, este organelo responde ante situaciones de estrés (Sasaki y Yoshida 2015). A pesar de su importancia, no hemos encontrado estudios exhaustivos que revelen cuáles especies oxido reductoras se asocian a este organelo, ni cómo cambia su concentración en respuesta a las condiciones ambientales.

El potencial redox cumple una función crucial en el equilibrio y sistema de señalización celular. Además, ofrece la posibilidad de aplicarse como un indicador de calidad en la secreción de proteínas glicosiladas. Dado el trabajo de Serrato *et al.* (2004), en el que el patrón de N-glicosilación resultante en un AcM producido durante limitación de oxígeno mostró una sobrealidación, es posible que el

cambio en el balance de especies redox refleje un reequilibrio en el complejo de Golgi, de tal manera que afecte la estructura del AcM y en consecuencia su sialidación. Para entender esta relación en condiciones de producción adversas, primero debe diseñarse un sistema que emule un entorno redox variable *in vitro* y de esta manera, monitorear cambios conformacionales de la proteína y la transferencia de ácido siálico. Paralelamente, es posible encontrar cambios en el equilibrio redox de Golgi a través de la proteína sensora roGFP2.

3. HIPÓTESIS

El potencial redox provoca cambios conformacionales en la estructura terciaria de la región Fc de un AcM, lo que resulta en la sialidación de sus N-glicanos.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Determinar el efecto del potencial redox en la sialidación de un anticuerpo monoclonal.

4.2. Específicos

- Determinar el efecto del potencial redox en la estructura terciaria del AcM a distintos potenciales redox *in vitro*.
- Evaluar el efecto del potencial redox en la sialidación de un AcM *in vitro*.
- Determinar la respuesta del potencial redox intracelular en Golgi ante la adición de especies oxido-reductoras.

5. METODOLOGÍA

Estrategia experimental

Con la finalidad de generar un ambiente químico semejante al que las células pueden encontrar en un tanque de cultivo, se realizó una titulación del grado de oxidación de roGFP2 en buffer TBS con distintas concentraciones de DTT y H₂O₂. Una vez encontradas las concentraciones de DTT y H₂O₂ que resultan en el rango de potencial redox en el que la proteína sensora exhibe un cambio significativo (-240 a -320 mV), se determinó el potencial redox. Posteriormente el AcM se sometió a las mismas condiciones redox establecidas por la proteína sensora y se determinó el cambio de su estructura terciaria mediante la medición de su espectro de emisión de 300 a 450 nm (excitando a 280 y 295 nm) y el cálculo de su centro de masa espectral (CME), en comparación con el AcM completamente desnaturalizado.

De manera similar, el AcM se sometió al buffer con las condiciones redox determinadas, pero además en presencia de sialiltransferasa y su sustrato, CMP-ácido siálico. Se determinó el grado de sialidación del AcM.

De manera paralela se expresó de forma transitoria la proteína roGFP2 dirigida a Golgi en células CHO, mediante la construcción de un baculovirus que contiene la secuencia codificante. Se realizaron mediciones del cambio del potencial redox intracelular en células CHO usando microscopía de fluorescencia como herramienta de cuantificación y localización de la respuesta en el grado de oxidación del sensor roGFP2.



5.1. Producción y purificación de roGFP2 por cromatografía de afinidad a níquel

Se realizó un cultivo de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Amp^R, Invitrogen ®) que contiene un plásmido pRSET que codifica para roGFP2 bajo el promotor T7 (Donado por James Remington del “Institute of Molecular Biology”, Universidad de Oregon, Hanson *et al.* 2004). Se utilizó medio LB con ampicilina (0.1 mg/mL). Se incubó a 37°C a 220 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) de 3, se indujo con IPGT 100 µM y se continuó la incubación a 25°C 220 rpm toda la noche.

El cultivo fue centrifugado a 1800 g (rotor Eppendorf® F 34-6-38) 20 minutos a 20°C, se desechó el sobrenadante. En adelante, los botones se mantuvieron a 4°C. El sedimento de todos los tubos se resuspendió en 10 mL de buffer TBS (20 mM Trizma base, 150 mM NaCl pH 8) y se sometió a 3 periodos de sonicación de 2.5 minutos con pulsos de 6 s y 9 s de descanso, dejando 3 minutos entre cada periodo. El sonicado se transfirió a tubos de 1.5 mL donde se centrifugó a 25 000g durante 9 minutos a 10°C.

La purificación se efectuó por cromatografía de afinidad en columna preempacada con 1 mL de resina ácido nitriloacético Ni-NTA QIAGEN[®]. La columna se equilibró con 10 volúmenes de cama (VC) del buffer TBS pH 8. Con el objetivo de evitar perder proteína por saturación de la resina, se emplearon dos columnas, el sobrenadante de la centrifugación del sonificado se pasó a través de la primera y su eluido inmediato se pasó por la segunda columna. Primeramente, ambas columnas se lavaron con 10 VC con el buffer TBS sin imidazol, posteriormente se lavaron con 10 VC de TBS imidazol 30 mM, a continuación, roGFP2 se eluyó con TBS imidazol 400 mM (7 VC). Posteriormente, 2 mL de la solución eluída se sellaron dentro de una bolsa de diálisis Spectra/Por[®] de celulosa (12-14 kDa) y se sumergieron en 0.5 L del buffer TBS pH 8 en agitación a TA durante 3 h, esto se repitió en 1.5 L del mismo buffer durante 16 h.

La proteína se cuantificó por el método de Bradford. Se realizaron dos diluciones del dializado, 1:10 y 1:20, se colocaron 160 μ L de cada dilución en cada pozo de una placa de 96 pozos Costar[®] por triplicado y se añadieron 40 μ L de reactivo de Bradford. Se resuspendió sin formar burbujas y se realizó la lectura de absorbancia a 595 nm. Para comprobar la purificación de la proteína se preparó un gel desnaturizante de poliacrilamida al 12% pH 8.83 SDS-PAGE y se cargaron las fracciones colectadas de la purificación de roGFP2, esperando una banda con el peso molecular de roGFP2 (31 kDa), utilizando el marcador de proteínas BenchMark, Life Technologies[®].

5.2. Determinación del grado de oxidación de roGFP2 en TBS

Se preparó TBS pH 7.2 y se colocaron 3 mL en tubos Falcon de 50 mL y se añadieron las concentraciones de ditioneitol (DTT); 100, 10, 1 y 0.1 mM, 1 y 0.01 μ M (una por tubo), y las concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 1 M, 100 mM y 1 μ M. Se midió el potencial redox controlando la temperatura a 37°C en un baño María, utilizando un electrodo ORP de 6 mm de diámetro marca Applikon[®] y un transmisor Mettler Toledo[®] modificado para ORP, recopilando las

mediciones con el software Windaq. Después se midió el pH de tales soluciones con el potenciómetro Fisher Scientific®.

Posteriormente se preparó 1 mL de TBS pH 7.2 con las mismas concentraciones de DTT y se añadió roGFP2 a una concentración de 0.2 μ M. Inmediatamente, se midió el espectro de fluorescencia haciendo un barrido del espectro de excitación de 300 a 500 nm, fijando la emisión a 510 nm con el espectrofluorómetro Ls55 Perkin Elmer Instruments®, con una cubeta de cuarzo de 10 mm PerkinElmer instruments® durante 6 minutos, adquiriendo un barrido cada 2 minutos. La temperatura fue controlada a 37°C en las placas de la celda de medición dentro del espectrofluorómetro mediante un recirculador de agua modelo FC-6. El ensayo se repitió tres veces para cada condición.

5.3. Aplicación de condiciones redox al AcM y determinación de su efecto en la estructura terciaria

El AcM se añadió a una concentración de 0.5 mg/mL en las soluciones preparadas con el buffer TBS pH 7.2 y el agente reductor DTT a las concentraciones; 100, 10 y 1 mM, verificando previamente que el potencial redox de la solución correspondiera a valores que están dentro del rango de sensibilidad de la proteína roGFP2 (-320 mV a -240 mV). Como controles se colocaron el AcM completamente desnaturalizado con 3.5 M de cloruro de guanidina y el AcM en estado nativo en TBS, sin adición de DTT. Se agregaron 150 μ L a la cubeta de cuarzo de 10 mm y se colocó en el espectrofluorómetro, controlando la temperatura a 37°C. Se determinó la fluorescencia intrínseca del AcM sometido a cada condición redox, utilizando el espectrofluorómetro Ls55 (Perkin Elmer Instruments, EUA) a las longitudes de onda de excitación de 295 nm para triptófano (Trp), haciendo un barrido del espectro de emisión desde 300 a 500 nm. Se realizó un escaneo del espectro de emisión cada 2 minutos durante 10 minutos, además de un monitoreo de 14 días, muestreando a las 0, 2, 4, 12, 24, 48, 72 h, después de 7 y 14 días. En seguida, se determinó la formación de agregados del AcM, tomando

una alícuota de 50 μL de muestra colocada en una celda de cuarzo de 3 por 3 mm marca Hellma Analytix. Se midió la dispersión dinámica de luz en un Zetasizer Nano-ZS Malvern Instruments® ajustando la temperatura a 37°C y dando un tiempo de equilibrado de 3 minutos. Las mediciones se adquirieron por triplicado para cada tratamiento.

5.3.1. Análisis de fluorescencia intrínseca del AcM

Para analizar el cambio de fluorescencia intrínseca del AcM, se calculó el centro de masa espectral (CME), es decir, la longitud de onda correspondiente al centro del área bajo la curva del espectro de emisión de los fluoróforos aromáticos. Sabiendo que *URF* se refiere a las unidades relativas de fluorescencia y λ_i es la longitud de onda (nm) correspondiente a cada punto de la medición, primero se suma el área bajo la curva, y luego se divide entre la suma de las intensidades de fluorescencia, la fórmula se describe en la Ec. 1.

$$CME = \frac{\sum_{450}^{300} URF * \lambda_i}{\sum_{450}^{300} URF} \quad (1)$$

5.4. Aplicación de condiciones redox al AcM y determinación de su efecto en la sialidación

El efecto de condiciones redox en el AcM se determinó incubando por 24 h el AcM en un ambiente reductor y no reductor, en buffer TBS pH 7.2 a 37°C con 10 mM DTT (-316.3 mV potencial redox en función de roGFP2) y sin DTT, respectivamente. Posteriormente, el AcM resultante se aplicó como sustrato aceptor en una reacción sialidación, utilizando una $\alpha(2,6)$ -sialiltransferasa y CMP-ácido siálico como sustrato donador. El ácido siálico unido N-glicano del AcM se determinó con el perfil de glicosilación de los N-glicanos por HPLC fase normal.

5.4.1. Reacción de sialidación de AcM

Después de la incubación del sustrato aceptor (IgG1) en condiciones reductoras y no reductoras, se añadió el buffer necesario para dar estabilidad a la $\alpha(2,6)$ -sialiltransferasa y la fosfatasa 2 CD73 R&D®, obteniendo 13 mM Trizma base, 97.5 mM NaCl, 37 mM Tris-acetato, 10 mM MnCl₂. Como se describe en la Tabla 1, se aplicaron 500 U/reacción de la enzima $\alpha(2,6)$ -sialiltransferasa EC. 2.4.99.1 recombinante de humano Prozyme® y 2 μ L/reacción de fosfatasa acoplada CD73. La mezcla de reacción se incubó a 37°C pH 7.2 durante 4 h, e inmediatamente después fueron congeladas a -20°C para detener la reacción. Para la sialiltransferasa, una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para lograr un picomol de CMP a partir de CMP-ácido siálico (citidín 5'-monofosfo-N-acetilneuraminico ácido sal disodica), por minuto por gramo de enzima a una concentración de enzima de 10 g/mL a un pH de 7.5 y 37°C.

Tabla 1. Composición de reacciones con la enzima sialiltransferasa.

Reacción	Fosfatasa acoplada 2	Sustrato donador CMP-ácido siálico	Sustrato aceptor		$\alpha(2,6)$ -sialIT
IgG1 condición reductora -316.3 mV	0.2 μ g	100 μ g (157 nmol)	IgG1 600 μ g (1.2 nmoles galactosa)	IgG1 120 μ g (0.24 nmoles galactosa)	500 U
IgG1 condición no reductora	0.2 μ g	100 μ g (157 nmol)	IgG1 600 μ g (1.2 nmoles galactosa)	IgG1 120 μ g (0.24 nmoles galactosa)	500 U

5.4.2. Determinación del perfil de N-glicosilación del AcM por HPLC fase normal

El anticuerpo monoclonal (IgG1) procedente de la reacción, se purificó y concentró en cartuchos Spin-X UF Corning 500 μ L 50k MWCO PES para retirar enzimas, sales y ácido siálico libre en la reacción. Su concentración se cuantificó por

absorbancia, el software calcula la concentración en cada muestra de AcM considerando un coeficiente de extinción masa de 13.7 L/g-cm. Además, cada muestra se observó por SDS-PAGE.

Se tomaron 100 µg del IgG1 puro, se desnaturalizó y digirió con la enzima PNGasa F para escindir el N-glicano. Se añadieron 100 pmoles de maltosa como control interno. A continuación, los glicanos se derivatizaron con el reactivo 2-amino benzamida (2AB, Cat. GKK-404, Prozyme), una alícuota de 10 µL se diluyó en acetonitrilo 100% en relación 1:4, finalmente esta muestra de glicanos-2AB fue separada mediante un sistema de cromatografía de fase normal en HPLC y detectada por fluorescencia (λ_{ex} 330/ λ_{em} 420 nm). La columna utilizada (SKgel Amido-80, 5 µm, 80 Å sílica) permite la separación de compuestos polares, basada en la formación de puentes de hidrógeno entre un carbamoilo no iónico (amida 80) y los grupos hidroxilos de los azúcares de la muestra.

El cromatograma obtenido al final de la corrida, muestra en el eje de abscisas el tiempo de retención (en minutos) y en las ordenadas las Unidades Relativas de Fluorescencia (URF). El área bajo la curva de los picos seleccionados se expresa en área total bajo la curva de los picos seleccionados. Se identificaron los picos de interés con base en Serrato *et al.* (2004) e información de la literatura.

Para la identificación de picos no reportados, se revisaron las propuestas de la literatura según tiempo de retención y tratamiento dado. Posteriormente, se realizó una digestión con la exoglicosidasa correspondientes a los azúcares terminales del perfil de glicosilación propuesto. La identificación de ácido siálico terminal se realizó colocando 10µL de la muestra de glicanos-2AB en cuestión, 3µL de buffer 5X (250 mM acetato de sodio pH 5) y 2.4 µL de sialidasa (*C. perfringens* recombinante, GKX-5021, Prozyme), incubando a 37°C por 16-18 h en un tubo de 600 µL. Posteriormente la enzima se precipitó añadiendo 45 µL de etanol frío, incubando por 20 minutos a -20°C y centrifugando a 8, 624 g por 10 minutos. La muestra se secó al vacío, se resuspendió en 10 µL de agua ultrapura filtrada y se inyectó al HPLC.

5.5. Construcción del gen *roGFP2* con péptido señal dirigido a *trans-Golgi*

5.5.1. Selección del péptido señal a Golgi en células CHO (*Cricetulus griseus*)

La construcción del gen *roGFP2_{golgi}* se basó en la amplificación del gen de *roGFP2* a partir del plásmido pEGFP-N1, con la adición del péptido transmembranal de la enzima α -2,3 sialiltransferasa de *Cricetulus griseus* al extremo N-terminal, secuencia proveniente de CHOgenome.org (NP_001233628.1).

5.5.2. Selección y diseño de oligos

Para la adición del péptido señal se mandaron sintetizar los oligos mostrados en la Tabla 2. Previamente, se revisó su contenido de GC, la formación de estructuras secundarias, homodímeros y con otras hebras.

Tabla 2. Oligos a utilizar para la construcción del gen *roGFP2_{golgi}*.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Descripción
AvrII-NTD	A GTG AAT TCC TAG GCC ACC ATG GTG AGT AAA TCC CGC TGT AAG TTC CTG GCC ATG CTG GCT CTG GTC TTT GTC GTCGTC ATG G	Fragmento NT del péptido señal con sitios de restricción AvrII y EcoR1 para clonación en pCHO ó baculovirus.
NTD-roGFP2	GCT CCT CGC CCT TGC TCA CCA TTC TGG GGC TGC TGC CGG AGA TGG AAT ACC ACA CCA TGA CGA CGA CAA AGA CCA GAG C	Fragmento CT del péptido señal con unión a extremo NT de roGFP2.
roGFP2-BstZ171	TAA CTA GTA TAC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC	Extremo CT de roGFP2 con la adición de sitios de restricción BstZ171 y SpeI para clonación en pCHO o baculovirus.
Mini AvrII-ro2	AGT GAA TTC CTA GGC CAC CAT	Oligo idéntico a los primeros 21 nucleótidos del oligo AvrII-NTD. Diseñado para amplificar la construcción.
pJET 1.2 Fwd	CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG G	CloneJET PCR Cloning Kit.
pJET 1.2	CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG	CloneJET PCR Cloning Kit fabricado en

Fwd JZB	GC	IBT.
Pacl-roGFP2 Fw	TAG TTA ATT AAA GTG AAT TCC TAG G	Diseñado para amplificar roGFP2, adicionando el sitio Pacl al extremo 5´
pFBGR Rv a JZB	CTA GTA CTT CTC GAC AAG C	Oligo idéntico a secuencia pFBGR-EGFP río arriba del promotor CMV.

5.5.3. Amplificación de secuencia codificante de péptido señal mediante PCR de alta fidelidad

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un proceso que permite aumentar el número de copias de un segmento de ADN específico mediante una reacción enzimática *in vitro*. Actualmente existe una amplia variedad de enzimas según el producto deseado, como en el caso de la ADN polimerasa de alta fidelidad (Phusion DNA polimerase), que se trata de una variante de la ADN polimerasa termófila de la familia polB, perteneciente a la especie *Pyrococcus furiosus*, está fusionada a un dominio de procesividad mejorada que incrementa la fidelidad y su velocidad. Posee actividad polimerasa 5'→3' y de exonucleasa 3'→5', lo que le permite generar extremos romos y corregir errores al mejorar la especificidad por el sustrato y retirar los nucleótidos incorrectos, sin sacrificar la velocidad de amplificación.

En todos los pasos destinados a conseguir la secuencia completa de la construcción fue importante mantener la misma secuencia. Dado que se presume que la tasa de error de esta enzima es 50 veces menor que la de Taq ADN polimerasa, fue ideal para nuestros objetivos. Los oligos AvrII-NTD y NTD-roGFP2 se traslapan aproximadamente 20 nucleótidos, por ende, pueden unirse mediante una reacción de PCR formando la secuencia codificante del péptido señal a Golgi. Se realizaron dos reacciones de PCR de 50 µL en tubos de polipropileno con capacidad para 0.2 mL. Los componentes de la reacción fueron los mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Componentes de reacción de PCR usando Phusion high-fidelity PCR master mix Thermo Scientific®

Componente	Volumen (μL)
DNA polimerasa de alta fidelidad contenida en la solución "Phusion high fidelity PCR master mix 2X" de Thermo Scientific ® (1 U en 50 μL), concentración final de 1.5 mM MgCl ₂ y 200mM de cada dNTP.	25
Oligos AvrII-NDT (Fwd) y NTD-roGFP2 (rev) a concentración final de 0.5 μM, partiendo de una concentración inicial [10 μM].	2.5 c/u
H ₂ O libre de nucleasas.	20

La desnaturalización inicial fue de 30 s a 98°C, luego 98°C por 5 s, 58°C por 10 s, 72° por 15 s por 30 ciclos y finalmente 5 minutos a 72°C para la extensión. La doble hebra de aproximadamente 130 pb, resultado de la PCR anterior, se purificó de gel mediante el kit "Agarose gel DNA extraction" de Roche® y se utilizó como mega oligo (fwd) del gen *roGFP2* contenido en el plásmido pEGFP-N1 (Tabla 4).

Tabla 4. Plásmidos utilizados para la generación del baculovirus roGFP2golgi.

Plásmido	Tamaño (pb)	Características	Referencia
pEGFP-N1 roGFP2	3626	P _{CMV} , KanR, NeoR, SCM, gen <i>roGFP2</i> .	Hanson <i>et al</i> , 2004.
pJET 1.2	2974	P _{T7} , P _{lacUVS} , AmpR, SCM, <i>eco47IR</i> , rep(pMB1).	Thermo Fisher®
pFBGR-EGFP	7240	P _{CMV} , P ₁₀ , AmpR, GenR SCM, gen <i>EGFP</i> , contiene dos ITRs VAA flanqueando el promotor de CMV.	Ponzio, <i>et al</i> . 2012.

5.5.4. Integración del péptido señal a Golgi al gen roGFP2

Se realizaron 4 reacciones de 50 μL de PCR añadiendo como templado 0.6 μL del plásmido pEGFP-N1 (roGFP2) descrito en la Tabla 4, con los oligos roGFP2-BStZ171 (rev) y el mega oligo (fwd). Previo a esto, se preparó una rampa de temperaturas de dos en dos grados desde 60 a 68°C, para elegir la temperatura de fusión (T_m) correcta, encontrando que a cualquier temperatura se obtenía el

mismo patrón de bandas. La PCR se programó de la siguiente forma: la desnaturalización inicial fue de 30 s a 98°C; alineamiento 98°C por 10s, 62°C por 30s, 72° por 30s por 30 ciclos y finalmente 10 minutos a 72°C para la extensión.

El producto de PCR se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, se purificó la banda de peso esperado (844 pb) mediante el kit “Agarose gel DNA extraction” de Roche® y se cuantificó por nanodrop.

5.5.5. *Ligación de roGFP2_{golgi} en vector pJET 1.2*

Esta ligación consiste en la unión de un vector pJET1.2 linealizado con extremos romos, al producto de PCR anterior con extremos romos, usando el kit “CloneJET PCR Cloning”. Sus extremos 5' están fosforilados por lo que no necesitan primers. Cabe resaltar que el producto de PCR fue generado por una DNA polimerasa de alta fidelidad (Phusion DNA polimerasa), por lo que presenta extremos romos.

La ligación se llevó a cabo con la finalidad de incluir el sitio de restricción XhoI contiguo al sitio de SpeI del gen *roGFP2_{golgi}* (por lo que la orientación fue esencial), y de mantener la construcción de un nuevo gen en un vector fácil de amplificar mediante el cultivo de la cepa que lo contiene.

Se verificó que la orientación fuese la necesaria mediante PCR de colonia, tomando las colonias con una punta estéril, diluyéndolas en 20 µL de agua estéril, calentando a 95°C durante 10 minutos y centrifugando a 12 000 g por 30 s. Se realizó una mezcla maestra y se repartió en los tubos de PCR a los que se les añadieron las colonias crecidas, la composición de la reacción se muestra en la Tabla 5. La programación del termociclador fue la siguiente; desnaturalización inicial fue de 3 minutos a 95°C, luego 95°C por 30 s, 58°C por 30 s, 68° por 1 minuto por 30 ciclos y finalmente 10 minutos a 68°C para la extensión.

Tabla 5. Composición de reacción de PCR de colonia

Componente	Volumen (μL)
Buffer Thermo Pol NEB® 10X. Concentración final 1.5 mM MgCl ₂	2.5
Taq DNA polimerasa	0.125
10 mM de cada dNTP	0.5
BSA 10X	2.5
Templado DNA (Colonia)	2
Oligos pJET (Fwd) y Mini AvrII (fwd) a concentración final de 0.5 μM, partiendo de una concentración inicial 10 μM.	0.5 c/u
H ₂ O libre de nucleasas.	16.375

Se analizó la secuencia del gen *roGFP2_{golgi}* como producto de PCR purificado de banda (Unidad de Síntesis y Secuenciación IBT UNAM), y después se comparó por alineamiento mediante BLAST®.

5.5.6. Construcción del vector *pFBGR-roGFP2_{golgi}* a partir del vector *pFBGR-EGFP*

La estrategia consistió en utilizar el plásmido *pFBGR-EGFP* para sustituir el gen de *EGFP* por el de *roGFP2*. A partir de este plásmido, se generó el baculovirus *EGFP* con expresión exitosa en células de insecto y de mamífero.

Se eligieron los sitios de restricción *PacI* y *XhoI* del vector *pFBGR-EGFP*, dado que flanquean el fragmento a retirar (gen *EGFP*). Una desventaja del sitio *PacI* es que está ubicado en el centro de la secuencia del promotor *p10*, el cual se encarga de la transcripción del gen de interés en células de insecto. No obstante, el principal interés es mantener la expresión en células de mamífero, por lo que se procedió a la construcción del vector *pFBGR-roGFP2_{golgi}*.

Se solicitó la síntesis de los oligos *PacI-roGFP2 Fw* y el oligo *Pjet1.2 Fwd JZB* (Tabla 2) a la Unidad de Síntesis y Secuenciación IBT UNAM. Este par de oligos se utilizaron para una reacción de PCR de alta fidelidad, que amplificó el gen *roGFP2*, añadiendo el sitio de restricción *PacI* en el extremo 5' y *XhoI* en el 3'.

Posteriormente se colocó la digestión de 1 μg del vector pFBGR-EGFP y de 3 μg del producto de PCR anterior, en tres reacciones de 30 μL por separado, utilizando el buffer CutSmart 10X de NEB[®], colocando en cada una 1 μL de cada enzima, (20 U XhoI NEB[®] y 10U PacI) a 37°C durante 4 h.

El producto de la doble digestión del inserto (gen *roGFP2_{golgi}* PacI/XhoI), se purificó utilizando el kit “High pure PCR product purification” de Roche[®]. Una vez que la doble digestión del vector se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa, se escindió la banda correspondiente al tamaño esperado para el vector sin el gen *EGFP*. Acto seguido, se procedió a purificar la banda utilizando el kit “Agarose gel DNA extraction” de Roche[®]. Posteriormente se efectuó la ligación con una proporción 1:16 (vector: inserto), a un volumen final de 20 μL , añadiendo los volúmenes mencionados en la Tabla 6.

Tabla 6. Reacción de ligación del vector pFBGR con el gen *roGFP2_{golgi}* PacI/XhoI

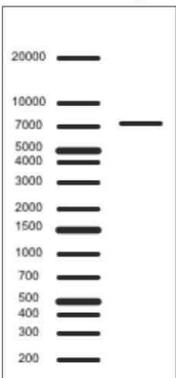
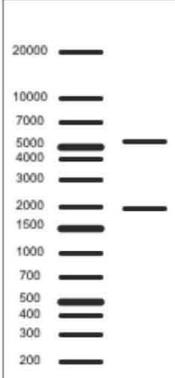
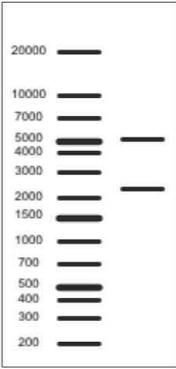
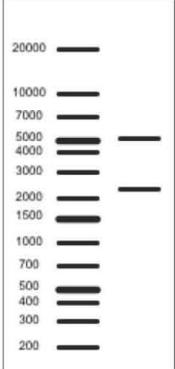
Componente	Volumen (15 μL reacción)
10X Buffer T4 Ligasa NEB [®]	1.5 μL
Vector	8 μL (24.1 ng/ μL)
Inserto	5 μL (36.6 ng/ μL)
T4 DNA Ligasa NEB [®]	1 μL
H ₂ O libre de endonucleasas	0

La ligación fue purificada por precipitación con butanol, resuspendida en 10 μL de agua estéril. La mitad de este volumen se electroporó en células XL1-Blue y se plateó en cajas LB Amp (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A continuación, se seleccionó la clona positiva mediante PCR de colonia con los oligos pFBGR Rv a JZB (del vector) y *roGFP2-Bstz171* (del inserto), para confirmar que se encontraba el inserto completo y en la dirección correcta.

Una vez encontrada la clona del producto de PCR esperado, se procedió a purificar el plásmido y realizar pruebas del patrón de restricción para la confirmación de la correcta construcción del vector pFBGR-*roGFP2_{golgi}*, colocando

las enzimas SpeI y XbaI en digestión sencilla, 0.5 µg de pFBGR-roGFP2_{golgi} (resultado de la ligación) y 2.1 µg del vector pFBGR-EGFP (control de restricción), ambas digestiones se llevaron a un volumen final de 30 µL y con 0.6 µL de la enzima correspondiente, buffer NEB® 2.1. La ligación y las digestiones se simularon usando el programa Serial Cloner analyzer 2.6.1, como se muestra en la Figura 8, dado que a diferencia del vector original pFBGR-EGFP, la ligación del inserto roGFP2_{golgi} agrega un segundo sitio SpeI, se espera que el plásmido sea dividido en dos fragmentos al ser cortado por la enzima SpeI, como se describe en la Tabla 7 y en la Figura 8 B.

Tabla 7. Esquemas resultantes de la predicción de restricción con SpeI y XbaI en los plásmidos pFBGR-EGFP y pFBGR-roGFP2_{golgi}. Software Serial Cloner 2.6.1.

Enzima de restricción	pFBGR-EGFP (Control de restricción)	pFBGR-roGFP2 _{golgi}
SpeI	<p>7,240 bp - Linealizado por SpeI [6373]</p> 	<p>5,299 bp - de SpeI [6394] a SpeI [4432] 1,962 bp - de SpeI [4432] a SpeI [6394]</p> 
XbaI	<p>4,949 bp - de XbaI [6396] a XbaI [4105] 2,291 bp - de XbaI [4105] a XbaI [6396]</p> 	<p>4,949 bp - de XbaI [6417] a XbaI [4105] 2,312 bp - de XbaI [4105] a XbaI [6417]</p> 

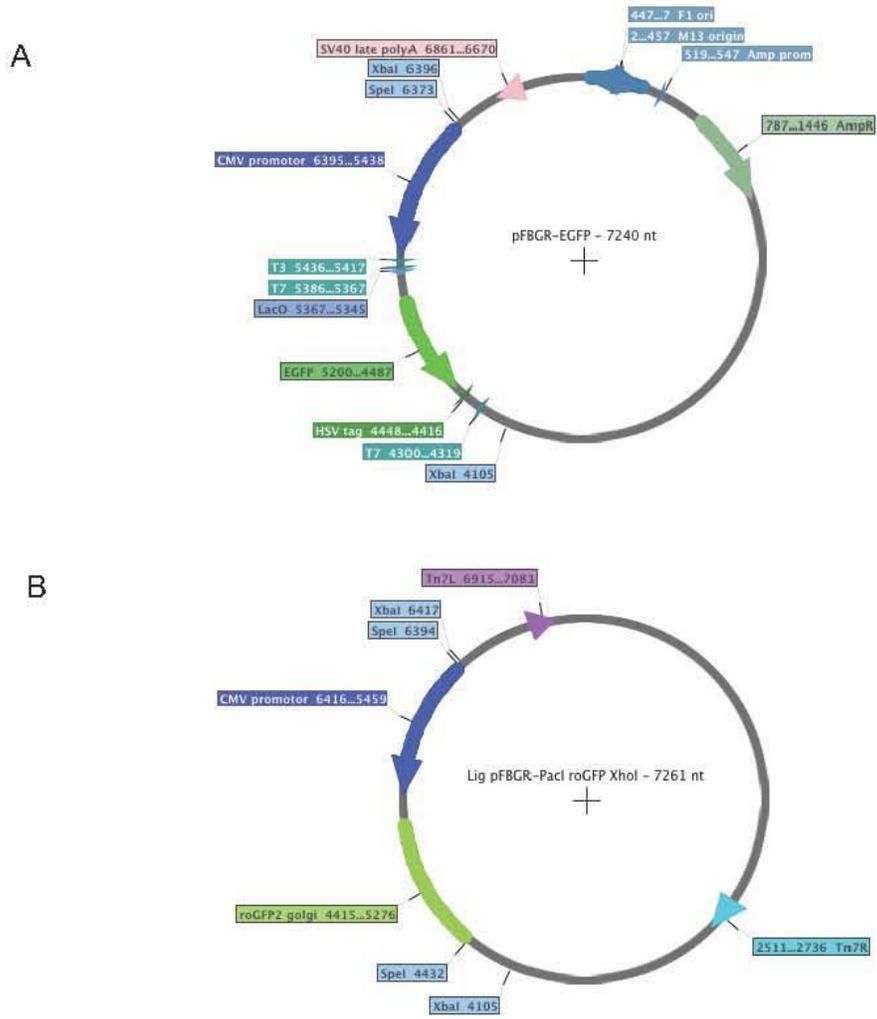


Figura 8. Simulación de restricción. A) Plásmido control pFBGR-EGFP B) pFBGR-roGFP2_{golgi} en los plásmidos se muestra la ubicación de los sitios de restricción SpeI y XbaI. Nótese que el fragmento de 23 pb es muy pequeño para la resolución de un gel de agarosa al 1%. Software Serial Cloner 2.6.1.

5.5.7. Generación del bácmido recombinante roGFP2_{golgi}

El plásmido pFBGR-roGFP2_{golgi}, se transformó en células de *E. coli* quimiocompetentes DH10BacTM. La transformación se incubó durante 4 h a 37°C 220 rpm en medio SOC. Después, se cultivaron 40, 100 y 300 µL en placas con agar LB kanamicina (50 µg/mL), gentamicina (7 µg/mL), tetraciclina (10 µg/mL), IPTG (40 µg/mL) y X-gal (100 µg/mL) y se incubaron de 24 a 48 h, tiempo en el cual se distinguieron dos fenotipos, colonias blancas y colonias azules. Ya que la

recombinación interrumpe la secuencia codificante de la enzima β -galactosidasa, la cual hidroliza X-gal produciendo galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol, que al oxidarse produce una coloración azul, las colonias que posean el b acmido recombinante ser an colonias blancas. Se seleccionaron las colonias blancas para reestriarlas y una vez confirmada la ausencia de color, se tomó una colonia única y se verificó la integración del inserto mediante tres PCR de colonia, aplicando las siguientes tres parejas de oligos:

- a) M13 Fwd/Rev (región recombinante completa). Tamaño esperado 4474 pb.
- b) M13 Fwd/PaclroGFP2 (región desde inicio del inserto hasta sitio de recombinación TnR7). Tamaño esperado 2893 pb.
- c) M13 Rv/roGFP2-Bstz171 (región desde final de inserto hasta sitio de recombinación TnL7). Tamaño esperado 2 811 pb.

Cabe señalar que al amplificar la región de recombinación utilizando los oligos M13 Fwd/Rev, el b acmido no recombinante logra un producto de PCR de 300 pb, mientras que la recombinación del plásmido pFBGR-roGFP2_{golgi} con el b acmido resulta en un fragmento de 4474 pb. Una vez confirmado que la colonia seleccionada posee el b acmido correcto, se procedió a extraer el b acmido a partir de un cultivo de 2 mL. Se centrifugó a 12,000 g, se resuspendió en 300 μ L de buffer P1 Qiagen  (sin indicador azul de lisis), se añadieron 300 μ L de buffer P2 Qiagen  incubando 5 minutos a temperatura ambiente (TA), lentamente se añadieron 300 μ L de buffer N3 Qiagen   incubando en hielo 15 minutos y se centrifugó a 12 000 g. El sobrenadante se transfirió a otro tubo que contenía 0.8 mL de isopropanol, se mezcló suavemente, se incubó a -20 C 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12,000 g durante 15 minutos, se desechó el sobrenadante y se hicieron 3 lavados al añadir 0.5 mL de etanol al 70% al pellet y se centrifugaron a 12,000 g. Finalmente se desechó el sobrenadante y se secó a vaci o alrededor de 15 minutos. El pelet se resuspendió en 40 μ L de agua estéril y se almacenó a 4  C.

5.5.8. Generación del baculovirus recombinante roGFP2_{golgi}

Una vez obtenido el b acmido, se procedió a la producción del baculovirus roGFP2_{golgi} en células de insecto Sf9.

I. Transfección en células Sf9

Se colocaron 5×10^5 células de insecto Sf9 en placas de 12 pozos Corning   y se incubaron 1 h en 1 mL de medio Sf900II para su adherencia. Mientras tanto, se resuspendieron 2 μg de b acmido en 50 μL de medio Grace's 1X (tubo A) y en un tubo de poliestireno se a nadi ron 20 μL de lípidos catiónicos a 30 μL del mismo medio (tubo B). Se incubó 10 minutos, posteriormente se añadió el contenido del tubo A al tubo B, se agitó con vortex de 1 s. Esta mezcla de lípidos con DNA se incubó 20 minutos a TA. Las células se lavaron dos veces con medio Grace's 1X, se a nadi ron 400 μL de medio, así como los 100 μL de la mezcla de lípidos con DNA por goteo y se incubó en un mezclador por gravedad durante 5 h. Para un volumen final de 1 mL en cada pozo, se les agregó 0.5 mL de medio Grace's 1X suplementado con yestolato 50X y 10 μL de antibiótico/antimicótico 100X. Se incubó 96 h a 27 C sin agitación. Finalmente, se recolectó el sobrenadante, se centrifugó a 8 624 g y se le añadió suero fetal bovino al 0.1%

II. Ensayo en placa. Aislamiento de baculovirus

En una placa de 6 pozos fueron cultivadas 1.5×10^6 células de insecto Sf9. Se dejaron adhiriendo y se lavaron con medio Grace's 1X. A partir del baculovirus proveniente de la transfección, se realizaron diluciones 1:2, 1:8 y diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) a volumen final de 900 μL en medio Grace's 1X. Se añadió una dilución a cada pozo. La placa fue incubada en un mezclador por gravedad durante 4 h a TA. Inmediatamente después se preparó una mezcla de 1 volumen de medio Grace's 2X, 0.8 volumen de agarosa al 3% y 0.2 volumen de SFB (suero fetal bovino) a un volumen final de 3 mL por pozo. Se retiró el medio

de cada pozo y se añadió la mezcla a 37°C lentamente, resbalando por las paredes del pozo.

La placa se incubó a 27°C por 96 h en humedad. A continuación, se le añadió una capa de 1 volumen de medio Grace's 2X, 0.98 volumen de agarosa 1.2% y 0.02 volumen de rojo neutro al 1%. Se incubó 4 h más (o hasta que el color difunda totalmente en la primer capa de agarosa). Finalmente se identificaron unidades formadoras de placa dispersas (pequeños círculos incoloros de células muertas). Se recolectaron succionando con una pipeta de 200 µL y se resuspendieron en 800 µL de medio Grace's para la inoculación en otra placa de 6 pozos con 2×10^6 células/pozo Sf9, añadiendo medio Sf900II a volumen final de 3 mL. Esta última placa se incubó 96 h a 27°C sin agitación, después de este plazo se recolectó el sobrenadante y células de todos los pozos y se centrifugó a 3×10^5 g por 10 minutos.

III. Selección de baculovirus roGFP2_{golgi}

Se realizó una transducción de células CHO infectadas con el baculovirus de las placas recolectadas en el paso anterior. Se colocaron 5×10^5 células CHO en una caja de 12 pozos Corning® y se incubaron 1 h en 1 mL de medio Cellvento 6 mM de glutamina. En seguida, se retiró el medio y se añadieron 450 µL de medio Cellvento 6 mM glutamina, además de 50 µL del sobrenadante del virus correspondiente a cada pozo. Se incubó 6 h a 28°C 5% CO₂ con un mezclador por gravedad. Posteriormente se retiró el medio y se añadió 1 mL de medio Cellvento 6 mM glutamina, 1 mM butirato y se incubó 24 h a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Finalmente, el cultivo en cada pozo, se observó a través de un microscopio de fluorescencia con un microscopio invertido Nikon Eclipse TE300 con un objetivo 10X, la proteína fluorescente roGFP2 fue excitada a 488 nm, la luz emitida fue colectada con el filtro DM505-Nikon Ex 455/35 BA 520 nm. Se detectó la diferencia en la cantidad de células fluorescentes entre pozos, seleccionando así los virus más eficientes.

5.6. Cultivo de línea celular CHO

Se trabajó con la línea de células de mamífero CHO (*Chinese hamster ovary*, por sus siglas en inglés) productoras de un AcM IgG1, mismo que es utilizado para las pruebas *in vitro*. Se cultivaron en medio Cellvento 200 ® suplementado con 6 mM glutamina y se incubaron en suspensión a 37°C, 5% CO₂. El subcultivo de las células se realizó cuando la densidad celular alcanzó los 2 x10⁶ cel/mL.

5.7. Localización de la proteína roGFP2

Para visualizar la localización intracelular de la proteína roGFP2, las células CHO, fueron cultivadas en cajas petri Fluorodish (35.5 mm diámetro externo, fondo plano de vidrio 0.17 mm de grosor), pretratadas con poli-L-lisina 0.01% (No. Cat. p4707 Sigma) para mejorar la adherencia celular y transducidas con el baculovirus roGFP2golgi MDI 100 UFP/cel. Las células fueron lavadas con la solución HBSS/HEPES (Buffer Hank's, 10 mM HEPES pH 7.4) 36 h después de la transducción, incubadas 30 minutos 4°C con 5 µM del complejo ceramida-BSA Bodipy® TR Ceramide de Thermofisher, se enjuagaron con medio frío, se incubaron en medio Cellvento 200® 6 mM glutamina fresco 37°C por 2 h y se lavaron una vez más.

Durante la adquisición de imágenes, las células se mantuvieron dentro de la cámara LiveCell™ a 37°C 5% CO₂ en medio Cellvento 6 mM glutamina. Las imágenes se realizaron en un microscopio confocal Olympus FV1000 Multifotónico tipo IX81 Invertido, equipado con el objetivo UPLSAPO 60X S NA: 1.3 software Confocal Olympus. roGFP2 fue excitada con la línea 488nm del módulo de diodo láser de la marca Voltran Technology Inc y un filtro de emisión BP 505-525. Por otro lado, el fluoróforo Bodipy® TR Ceramide se excitó a 543nm usando el láser HeNe(G) seleccionado mediante el sistema AOTF (Tipo Fibra-Dual). Su emisión fue colectada con el filtro BP 610/50 y detectada a través de un sistema de fotomultiplicadores. Se tomaron 23 stacks a 1 µm de espesor. La adquisición

de estas imágenes se realizó en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA).

Para el análisis de imágenes y colocalización, se utilizó el programa FIJI (Schindelin *et al.*, 2012), se aplicó segmentación mediante el método de Otsu (Otsu, 1979) ajustado al canal verde para definir los píxeles de interés. La colocalización del objeto de interés se comparó aplicando los métodos de Pearson, Manders (Manders *et al.* 1993) y Li (Li *et al.* 2004).

5.8. Medición de potencial redox mediante roGFP2 en Golgi

Se transdujeron 0.5×10^6 células CHO por pozo con el baculovirus roGFP2_{golgi} MDI 100 UFP/cel, crecidas en cajas petri Fluorodish de (35.5 mm diámetro externo, fondo plano de vidrio 0.17 mm de grosor), previamente tratadas con poli-L-lisina 0.01% (No. Cat. p4707 Sigma) para mejorar la adherencia celular. Se incubaron a 37°C 5% CO₂ en medio Cellvento 6 mM glutamina, durante 24 h para obtener una expresión de roGFP2 en Golgi, por lo menos en 50% de las células.

Las cajas se montaron en un microscopio confocal de disco giratorio 3I Marianas, dentro de una cámara a 37°C con una atmósfera de 5% CO₂. Todas las imágenes fueron colectadas con un microscopio confocal invertido Zeiss Observer Z.1 de disco giratorio Yokogawa CSU-X1, con un objetivo PIn Apo 63X/1.4 Oil DICIII. La proteína fluorescente roGFP2 fue excitada con los láseres 405 y 488 nm durante un tiempo de exposición de 750 y 30 ms, respectivamente. La luz emitida por ambas líneas fue colectada con el filtro de emisión FF01-525/30. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara EMCCD Andor Ixon 512x512 píxeles, controlada con el software SlideBook 6, con un lapso de tiempo de 30 s entre imágenes. La adquisición de estas imágenes se realizó en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada.

Para encontrar la respuesta a la máxima reducción de roGFP2 en Golgi, se captó su emisión en condiciones basales, con 1 mL cultivo durante 20 minutos.

Posteriormente, se pausó la adquisición para añadir cuidadosamente 500 μL del agente reductor DTT 30 mM para una concentración final de 10 mM, se reanudó la adquisición de las imágenes durante 20 minutos más. Finalmente, se realizó otra adición de 500 μL de DTT 170 mM para una concentración final de 50 mM y se continuó adquiriendo 20 minutos. De igual manera se procedió para conocer la respuesta a la máxima oxidación de roGFP2 en Golgi, con H_2O_2 . Obteniendo una serie de tiempo de 1 h y 120 imágenes para cada condición.

Las series de imágenes adquiridas mostraron grupos de células con fluorescencia en Golgi. Para el análisis de estas imágenes existieron dos puntos a considerar:

- La eliminación de los píxeles de fondo.
- La observación de las células que aparecen en foco.

Para separar el brillo correspondiente a Golgi, de los píxeles de fondo, se aplicó una umbralización usando el método de Otsu (Otsu, 1979). Este método permite encontrar el nivel de gris, que separa un conjunto de píxeles de una imagen en dos clases, con la mínima varianza interna y la máxima varianza entre ellas, en otras palabras, cada clase debe tener la mínima dispersión posible, lo que permite la máxima varianza entre los segmentos que separan las clases. El nivel de gris que cumple este criterio, se llama "valor umbral" (en inglés *threshold*). Para la series de tiempo adquiridas, se optó por aplicar este proceso a la imagen completa en el canal verde, y no en el azul, ya que la fluorescencia es mayor excitando a 488 nm, por lo que el histograma que presenta los píxeles de interés y de fondo en el canal verde, permite diferenciar las dos distribuciones de píxeles y encontrar el nivel de gris óptimo (Figura 10, paso 3).

A partir de la segmentación por Otsu se registró la posición de los píxeles con niveles de grises mayores que el valor umbral, es decir los píxeles pertenecientes a la fluorescencia de roGFP2 en Golgi. Luego, se registró el nivel de gris de estos píxeles en el canal azul y verde, es decir, la intensidad de fluorescencia de roGFP2 captada al excitar a 405 y 488 nm, respectivamente. Estas intensidades se compararon utilizando el cociente R resultante de la Ec. 2.

(2)

$$R = \frac{I_{405}}{I_{488}} : \frac{\text{Oxidación}}{\text{Reducción}}$$

Como resultado, se obtuvo una lista de pixeles de interés con un valor del “R” por cada pixel. Además, se generó una matriz numérica que presenta el valor R en la posición de cada pixel de interés multiplicado por la profundidad de pixel de la imagen de 8 bits. Como se ilustra en la Figura 9, al visualizar la imagen con un gradiente de colores similar al de un mapa de calor, donde 0 es máximo reductor y amarillo es oxidante, es posible observar el cambio de R, con respecto al tiempo y el espacio.

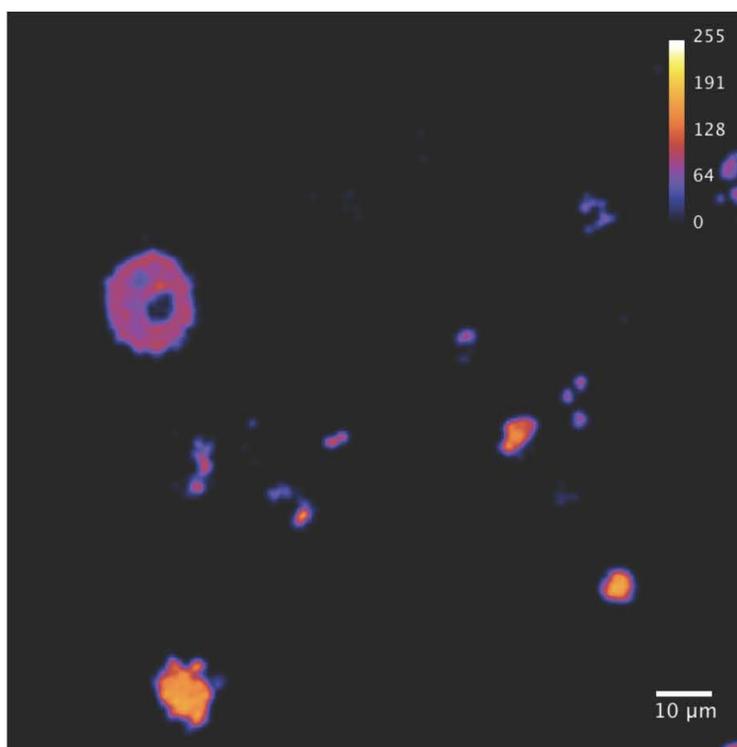


Figura 9. Ejemplo de representación de potencial redox en Golgi. Gradiente de colores azul menor R (reductor) y amarillo mayor R (oxidante).

Para representar del valor numérico de R, se aplicó una gráfica de cajas por imagen. Esto permitió visualizar el cambio de la dispersión los valores de R a lo largo del tiempo, información que no habría sido visualizada al colapsar la representación de los datos al valor del promedio de los cocientes R por imagen.

Para realizar el análisis de estas imágenes se diseñó un algoritmo, desarrollado por el Dr. Arturo Pimentel en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada. El algoritmo recibe como elemento de entrada la serie de tiempo separada en el canal verde y el azul, y como resultado entrega una lista con los valores de R de la población de pixeles correspondientes a Golgi por imagen, y como se mencionó antes, una nueva serie de tiempo con imágenes cuya matriz de niveles de grises es proporcional a R. Este procedimiento se ilustra en la Figura 10.

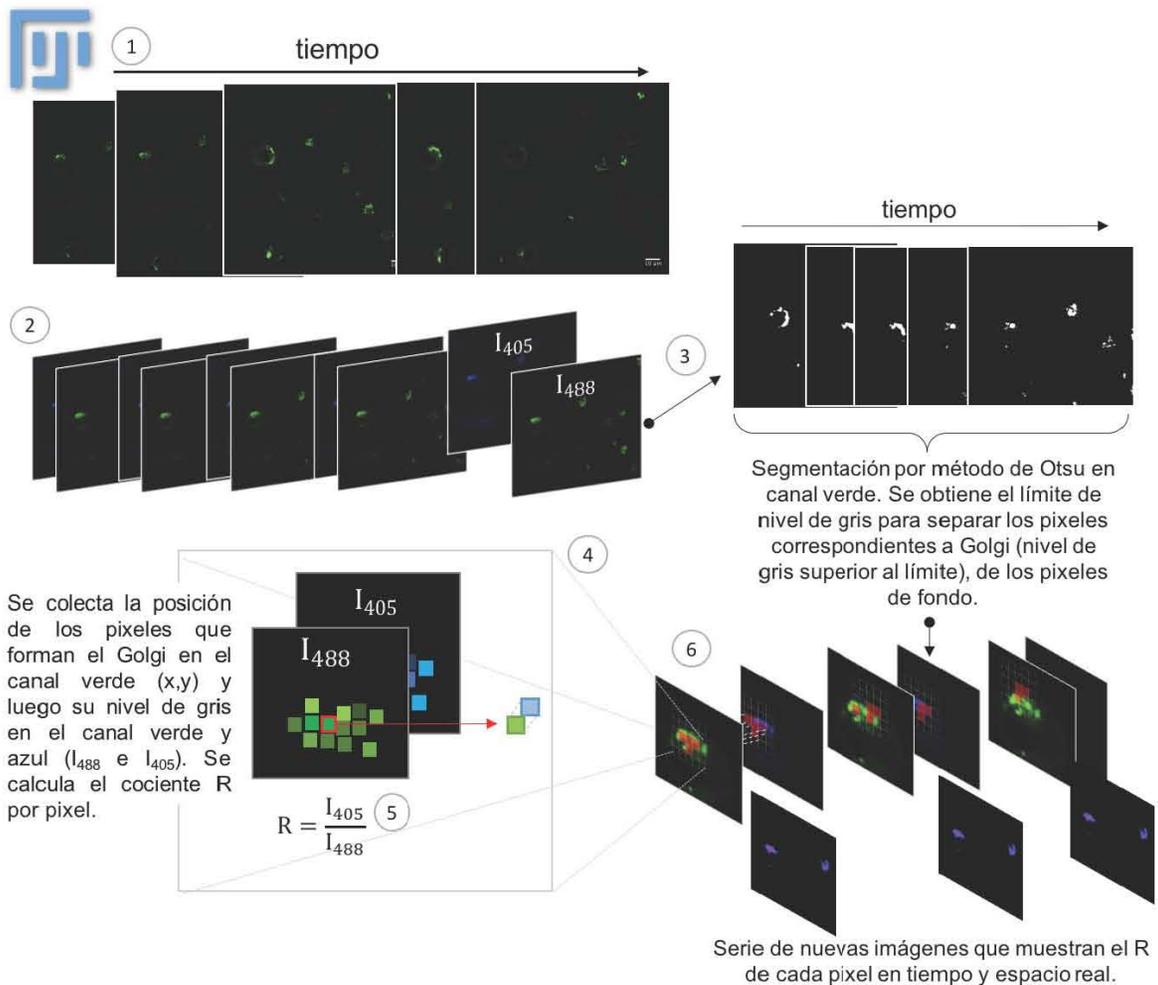


Figura 10. Etapas del algoritmo diseñado para el análisis de las imágenes.

6. RESULTADOS Y DISCUSION.

6.1. Producción de roGFP2 y purificación por cromatografía de afinidad a níquel

Como resultado del cultivo de 750 mL de la cepa *Escherichia coli* BL21(DE3) roGFP2, se obtuvieron 7.2 g de biomasa, logrando un rendimiento final de 0.071 g de roGFP2 por litro de cultivo, como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Rendimientos logrados a partir de la purificación de roGFP2.

Etapas	Proteína total (mg)	Concentración de proteína total mg/mL^a	Rendimiento por paso %	Rendimiento global %
Extracto crudo	174.5	17.45	-	100%
Sonicado	39.69	4.41	23%	23%
Cromatografía de afinidad	7.98	1.14	20%	5%
Diálisis	5.32	0.76	67%	3%

^a Concentración de proteína total por paso.

El peso reportado para roGFP2 según su estructura cristalográfica fue de 26.8 kDa (PDB: 1JC0/1JC1 estructura en forma reducida y oxidada, respectivamente) realizada por Hanson *et al.* (2004). La secuencia de roGFP2 expresada en *E. coli* contiene 37 aminoácidos adicionales en el extremo amino, que incluye 6 histidinas y un sitio de corte de enteropeptidasa bovina, lo que aumenta el peso de la proteína recombinante a 31 kDa (Expasy). En el gel SDS-PAGE de la Figura 11-B, los carriles que contienen las muestras de roGFP2 purificada y dializada, muestran dos bandas probablemente resultado de degradación por proteólisis. No obstante, se verificó que hubiese proteína funcional al determinar su fluorescencia. La Figura 11-B muestra que se realizó un barrido del espectro de excitación desde 300 a 500 nm, recibiendo a una λ_{em} de 510 nm para distintas condiciones redox, obteniendo el espectro de excitación típico de roGFP2, el cual, presenta distintos

niveles de intensidad de fluorescencia a las longitudes de onda 405 y 488 nm, según el grado de oxidación de roGFP2.

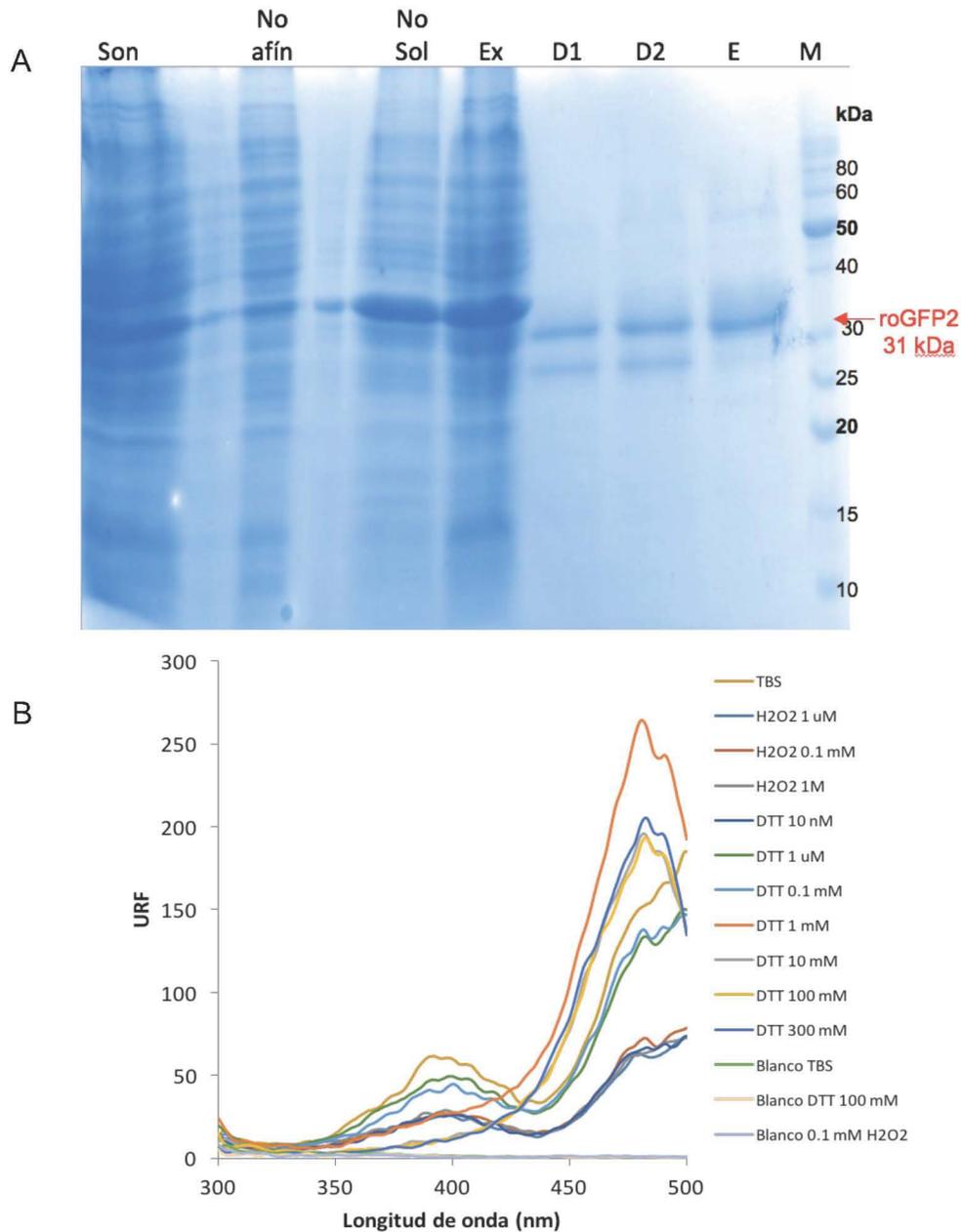


Figura 11. Purificación de roGFP2 y verificación de funcionalidad. A) Gel SDS-PAGE de las fracciones recolectadas durante la purificación de la proteína roGFP2. Son: Muestra del cultivo sonicado. No afin: Muestra de la fracción no afin a la columna de cromatografía. No Sol: Fracción no soluble del sonicado. Ex: Extracto total. D1: Dializado prueba. D2: Repetición diálisis E: Fracción eluída en la cromatografía. M: Marcador BenchMark Life Technologies® B) Comparación del espectro de emisión de roGFP2 a distintas concentraciones de DTT y H₂O₂.

6.2. Determinación del grado de oxidación de roGFP2 en TBS.

La determinación del grado de oxidación de roGFP2 (OxD_{roGFP2}) se efectuó a partir de la relación entre los picos de las longitudes de onda 405 y 488 nm del espectro de excitación una vez que se observó que la relación entre ellos era constante a través del tiempo, es decir, cuando llegó al equilibrio, utilizando Ec. 3.

(3)

$$OxD_{roGFP2} = \frac{R - R_{red}}{\frac{I_{488ox}}{I_{488red}} (R_{ox} - R) + (R - R_{red})}$$

Donde R se refiere al resultado de la división entre la intensidad de fluorescencia a las longitudes de onda 405 y 488 nm para cada condición del experimento, I_{488ox}/I_{488red} . R_{red} y R_{ox} corresponde a la razón entre la intensidad de los picos de la proteína totalmente reducida y totalmente oxidada, en este caso usando 0.3 M DTT y 1 M H_2O_2 , respectivamente. Los valores de las variables se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros para el cálculo de OxD_{roGFP2} .

	Reducida (0.3 M DTT)	Oxidada (1M H_2O_2)
Intensidad 405 nm	13.641	33.443
Intensidad 488 nm	195.411	86.542
R= I_{405}/I_{488}	0.070	0.386
I_{488ox}/I_{488red}	0.443	

Tabla 10. Valores de las constantes en la ecuación de Nernst para las condiciones del experimento

E°roGFP2 (mV)	-280
T (°K)	310.15
R (Cal/K.mol)	1.987
F (cal/mV.mol)	23.06

A partir del cálculo del OxD_{roGFP2} , se realizó el cálculo del potencial redox usando los datos mostrados en la Tabla 9 y Tabla 10, para ser sustituidos en la ecuación de Nernst (Ec. 4) descrita en función del grado de oxidación del sensor.

(4)

$$E_{roGFP2} = E_{roGFP2}^{o'} - \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{1 - OxD_{roGFP2_{ox}}}{OxD_{roGFP2_{ox}}} \right)$$

El valor -280mV representa el promedio de los valores de potencial redox estándar de roGFP2, reportados por varias calibraciones del sensor *in vitro*, que coinciden con la medición de -272 mV y -287 mV (Hanson et al, 2004; Dooley et al, 2004). Cada concentración de los agentes oxido reductores permitieron calcular el grado de oxidación de roGFP2 en relación a su potencial redox, como se muestra en la Figura 12.

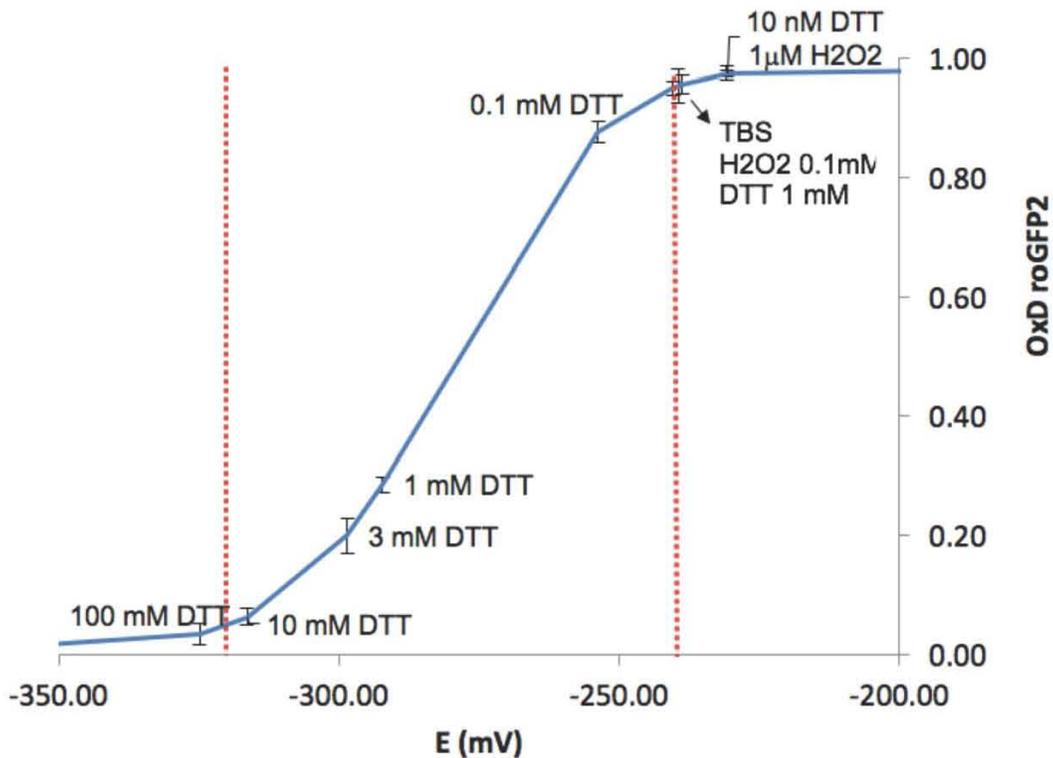


Figura 12. Relación entre potencial redox (E) y el grado de oxidación del sensor (OxDroGFP2). Las líneas rojas representan los límites de medición de roGFP2 (Meyer y Dick, 2010).

Se encontró que concentraciones de 0.1 a 10 mM DTT generan potenciales redox dentro de la ventana de medición del sensor, y pueden ser aplicadas para evaluar su efecto en la estructura terciaria y sialidación del AcM. Es importante recalcar que cambios del grado de oxidación menores al 5% o mayores al 95% del máximo no caen dentro de la escala de medición del sensor, por lo que no es posible precisar el potencial redox de las soluciones que provocan grados de oxidación cercanos a los límites -320 y -240 mV (líneas rojas en Figura 12).

Como se ilustra en la Figura 13, existe una reducción y oxidación de los puentes disulfuro de $\text{roGFP2}_{\text{ox}}/\text{roGFP2}_{\text{red}}$ en el buffer TBS con el paso del tiempo. Esto sugiere que la molécula reductora DTT, también podría estar modificando su equilibrio $\text{DTT}_{\text{ox}}/\text{DTT}_{\text{red}}$ con el paso del tiempo.

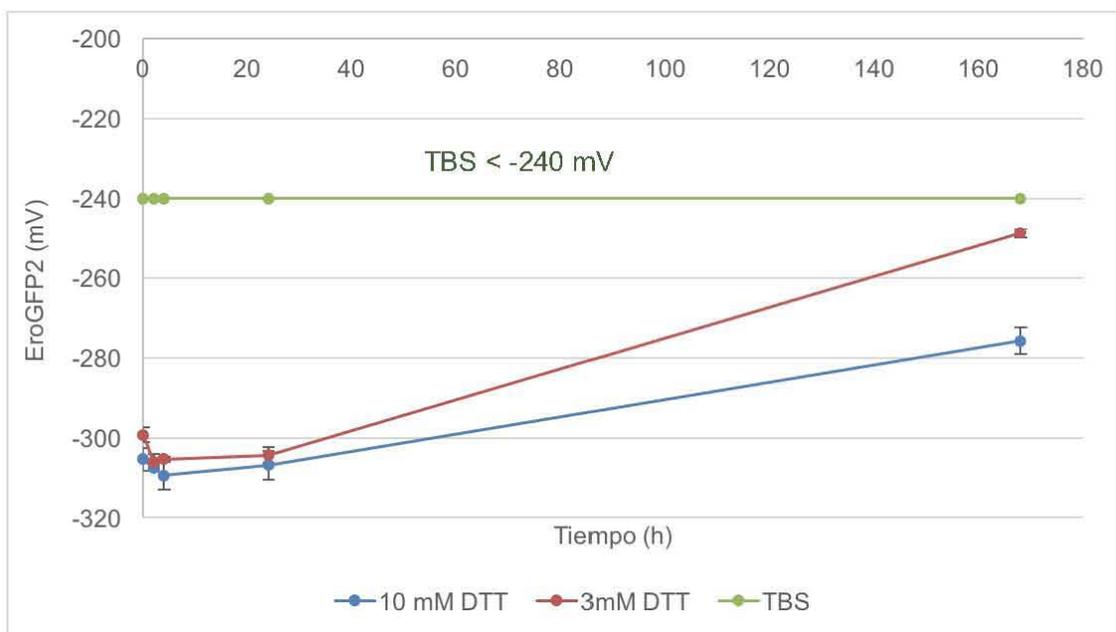


Figura 13. Cambio de potencial redox de roGFP2 a distintas concentraciones de DTT con respecto al tiempo. La medición de TBS se encuentra en el límite de oxidación de la proteína sensora por lo que en este trabajo su potencial redox se describe como >-240 mV.

6.3. Evaluación del efecto del potencial redox en la estructura terciaria de un AcM.

La fluorescencia intrínseca del IgG1 humano puede incluir alrededor de 42 tirosinas, 38 fenilalaninas y 20 triptófanos, distribuidos a lo largo de sus dominios constantes. Como se observa en la Figura 14, en la región Fc se encuentran 8 triptófanos, 4 de ellos cerca de cisteínas que forman puentes disulfuro intracatenarios. La fluorescencia de estos aminoácidos es una herramienta esencial para el estudio de proteínas, dado que responde a cambios en el ambiente hidrofóbico o hidrofílico que lo rodea. Por ejemplo, Yang *et al.* (2015) reportaron que a través de la fluorescencia intrínseca del BSA, es posible monitorear la formación de agregados amorfos, inducidos al aplicar 10 mM DTT en condiciones cercanas a las fisiológicas, pH 7.2 y 37°C. La repetición del experimento de Yang *et al.* sirvió como referencia procedimental del comportamiento de la fluorescencia intrínseca. Los resultados pueden consultarse en la sección anexos 10.2 y 10.3. Por otra parte, la evaluación del efecto de distintas condiciones redox en la estructura terciaria del AcM requirió cinéticas de 10 minutos, 7 y 15 días, para observar cambios en la estructura terciaria del AcM.

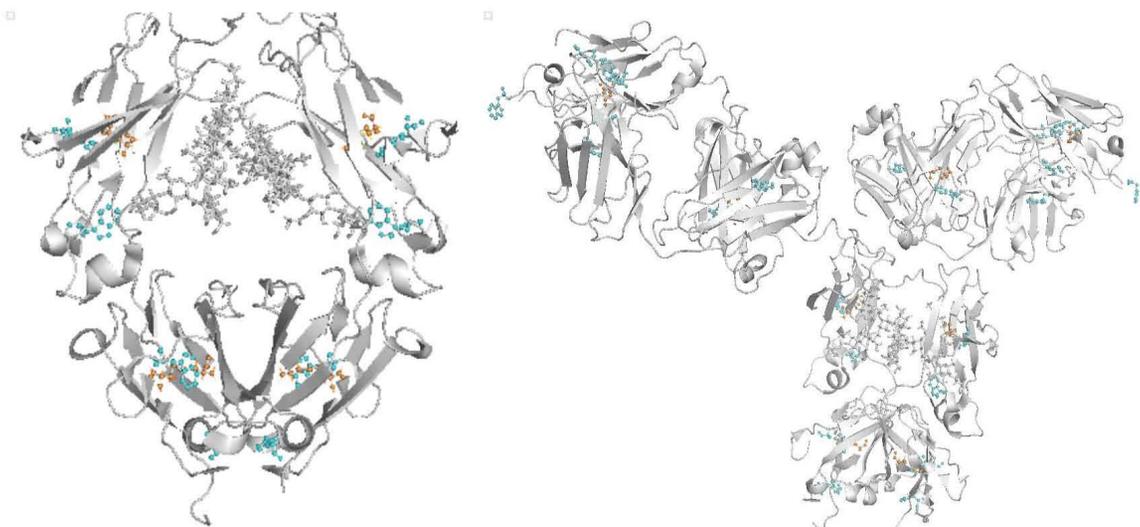


Figura 14. Estructura de IgG1. Cristalografía de IgG1 humano expresado en *Cricetulus griseus* tomado de PDB 1HZH (Saphire *et al.* 2001). Esferas con enlaces naranja corresponden a puentes disulfuro, Esferas con enlaces azul celeste ilustran triptófanos.

La relación entre el potencial redox y la concentración de DTT en el buffer TBS, ilustrada en la Figura 12, muestra que las concentraciones de 1, 3 y 10 mM generan potenciales redox de -292.3, -298.6 y -316.3 mV, respectivamente. Aplicando estas condiciones al IgG1 y monitoreando su fluorescencia intrínseca durante 10 minutos y luego a lo largo de una semana, se obtuvieron las cinéticas mostradas en las Figura 15 y 16. Nótese que la línea roja en cada gráfica corresponde al valor del CME de un IgG1 desnaturalizado, exponiendo sus triptófanos en un ambiente hidrofílico. Por el contrario, la línea negra indica el estado nativo de los triptófanos de la proteína (IgG1 sin tratamiento). Como se observa en la Figura 15, durante los primeros 10 minutos no hay desplegamiento de la estructura terciaria en ninguno de los tratamientos con DTT, incluso a la concentración de 100 mM DTT (potencial redox altamente reductor).

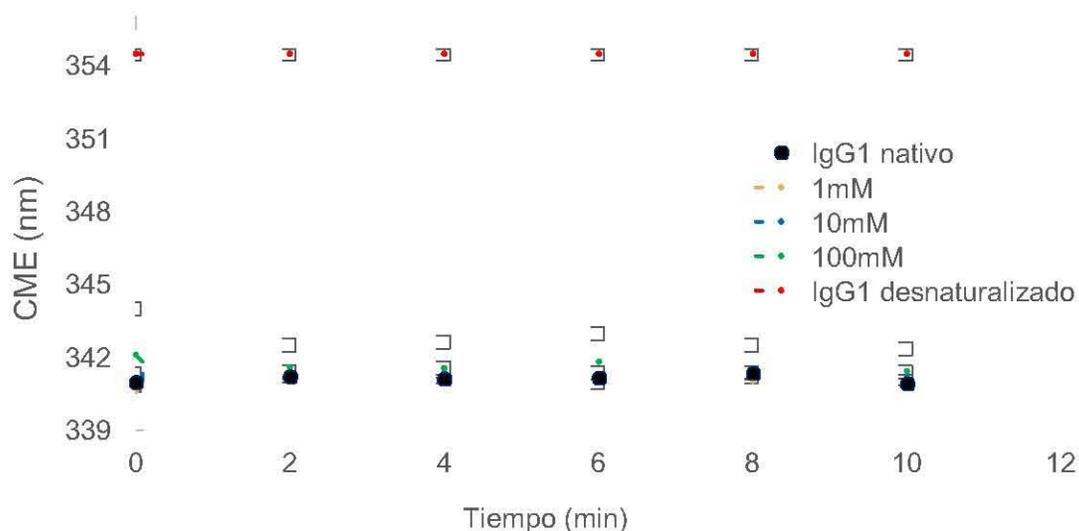


Figura 15. Efecto de DTT en los primeros 10 minutos de incubación a 37°C. Las concentraciones mencionadas corresponden a DTT.

Posteriormente, la cinética de una semana, ilustrada en la Figura 16, señala que el tratamiento de IgG1 a -316.3 mV (10 mM de DTT) induce la exposición de los

aminoácidos aromáticos a un ambiente más hidrofílico que el inicial, lo cual sugiere un relajamiento de la estructura terciaria del IgG1. La comparación entre el desplegamiento a del IgG1, sometido a potenciales redox de -298.6 y -316.3 mV (3 y 10 mM DTT) se observa en la Tabla 11, con el análisis del corrimiento total del CME entre tiempos de interés. La Figura 40 en la sección anexos 10.3 ilustra los espectros de emisión de los triptófanos en el IgG1 que generaron los CME de la cinética de 7 días.

Tabla 11. Comparación de diferencias en el desplegamiento de IgG1 a distintas condiciones redox.

Parámetro	Condiciones redox mV		
	> -240	-298.6	-316.3
$\Delta\text{CME nm (CME}_0\text{-CME}_{24})$	0.55 ± 0.27	1.56 ± 0.7	2.85 ± 0.07^a
$\Delta\text{CME nm (CME}_0\text{-CME}_{48})$	0.67 ± 0.16	1.91 ± 0.04	3.56 ± 0.33^b
$\Delta\text{CME total nm (CME}_0\text{-CME}_{168})$	1.05 ± 1.05	2.50 ± 0.10	4.83 ± 0.40^c

Aplicando una prueba t-student, se encontró que existe diferencia significativa al 95%, entre las medias de los tratamientos sometidos a un potencial redox de >-240 mV y -316.3 mV:

^a p= 0.00298 -2.932 < IC < -1.674

^b p= 0.00092 -3.571 < IC < -2.212

^c p= 0.01526 -6.060 < IC < -1.509

Además, se propuso probar 2-mercaptoetanol (BME) como otra especie reductora capaz de lograr la reducción total de puentes disulfuro. Se realizó un ensayo de oxidación de roGFP2 con BME 0.1 y 0.5 M (-316.3 mV y condiciones altamente reductoras, respectivamente). La cinética en función de la fluorescencia de todos los aminoácidos aromáticos observada en la Figura 16-B, enfatiza las tendencias obtenidas por efecto de las condiciones redox presentadas al IgG1. Particularmente las cinéticas correspondientes a los tratamientos con BME muestran que el CME del IgG1 se desplaza a valores menores que el inicial y con respecto al IgG1 nativo, indicando que los aminoácidos aromáticos se encuentran en un ambiente más hidrofóbico, probablemente provocado por la agregación de las moléculas.

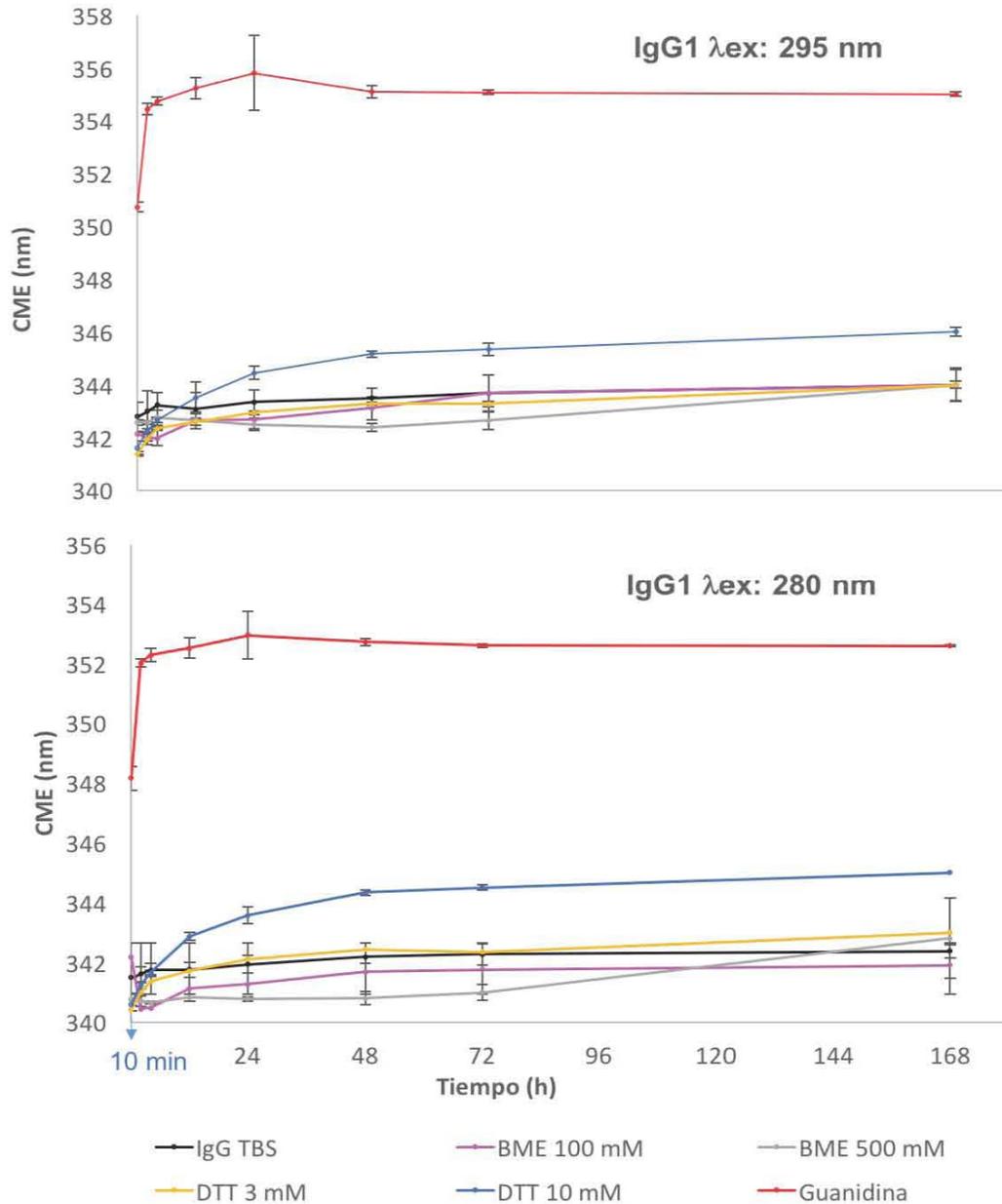


Figura 16. Efecto de 2-mercaptoetanol y DTT en CME de IgG1. Cinética de cambio de CME de fluorescencia intrínseca de un IgG1 sometido a condiciones reductoras cuando A) la longitud de onda de excitación es 295 nm y B) la longitud de onda de excitación fue 280 nm.

Al observar el desplegamiento del IgG1 en presencia de 10 mM de DTT surge una cuestión importante; qué tan grande es la diferencia entre el cambio conformacional de la estructura terciaria del IgG1 sometido a 10 mM de DTT comparada con el IgG1 sin tratamiento. Los impactos de estos cambios

conformacionales en el IgG1 no se pueden precisar, sino hasta evaluar la capacidad de transferencia de ácido siálico por la enzima $\alpha(2,6)$ -sialiltransferasa, la cual interviene justo en el dominio C_H2 del IgG1. De manera que, únicamente se sugiere que el relajamiento de la estructura terciaria en el dominio C_H2 podría aumentar la sialidación. En relación a esto, en un estudio realizado por Hongcheng y colaboradores (2010) en el que se desnaturalizó IgG1 mediante un gradiente de GnCl, se encontró que el dominio más vulnerable al desplegamiento, es el C_H2. Esto propone que el cambio de fluorescencia intrínseca observado en la Figura 16, podría estar iniciando con el relajamiento de la estructura terciaria del dominio C_H2, como efecto de las condiciones redox aplicadas.

Al explorar el diámetro hidrodinámico del IgG1 después de 10 minutos de incubación (Figura 17), se observó que ninguno de los tratamientos con DTT (1, 10 y 100 mM) tuvo diferencias significativas con respecto al IgG1 nativo. La visualización detallada de estos tratamientos se encuentra en Anexos 10.1. De manera consistente al resultado anterior, el seguimiento del diámetro promedio del IgG1 incubado con 3 y 10 mM de DTT por tres días (Figura 18), indica que el tamaño de las partículas se mantiene estable o con una variación mínima con respecto al IgG1 incubado en ausencia de DTT. Esto sugiere que la relajación de la estructura terciaria en el AcM, al ser incubado a -316.3 mV, no generó un cambio apreciable en el diámetro de la partícula. Por el contrario, la incubación del IgG1 en presencia de 0.1 y 0.5 M de BME produce partículas con un diámetro hidrodinámico promedio desde 500 a 5000 nm. Al comparar esto con el comportamiento del CME de las cinéticas de la Figura 16, en la que se observa que el CME tiende a moverse a longitudes de onda de mayor energía que el punto inicial, se sugiere que en este caso el IgG1 forma agregados del orden de micrómetros de diámetro que sumergen a los triptófanos en cavidades hidrofóbicas, por ende, los aminoácidos aromáticos emiten a longitudes de onda de mayor energía.

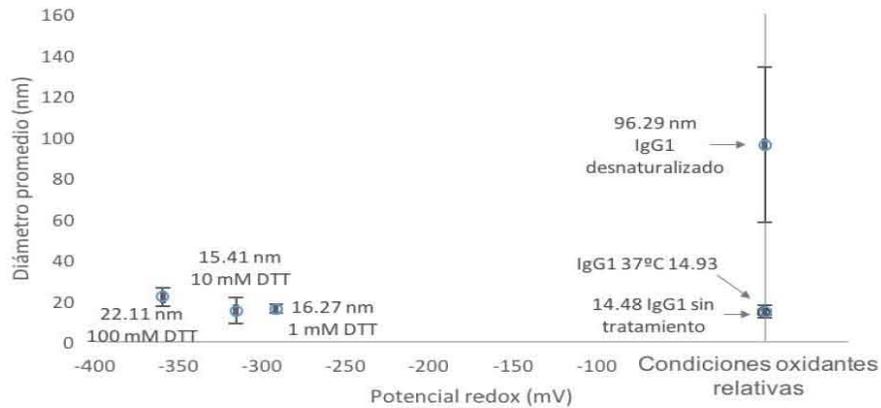


Figura 17. Efecto del DTT en el tamaño del AcM a los 10 minutos. Diámetro hidrodinámico de IgG1 analizado por dispersión dinámica de luz. IgG1 incubado 10 minutos a 37°C. IgG1 37°C: control sin DTT. IgG1 sin tratamiento: sin incubación a 37°C. IgG1 desnaturalizado con 4.5 M Guanidina. Condiciones oxidantes relativas a las mediciones realizadas con roGFP2 (Figura 7).

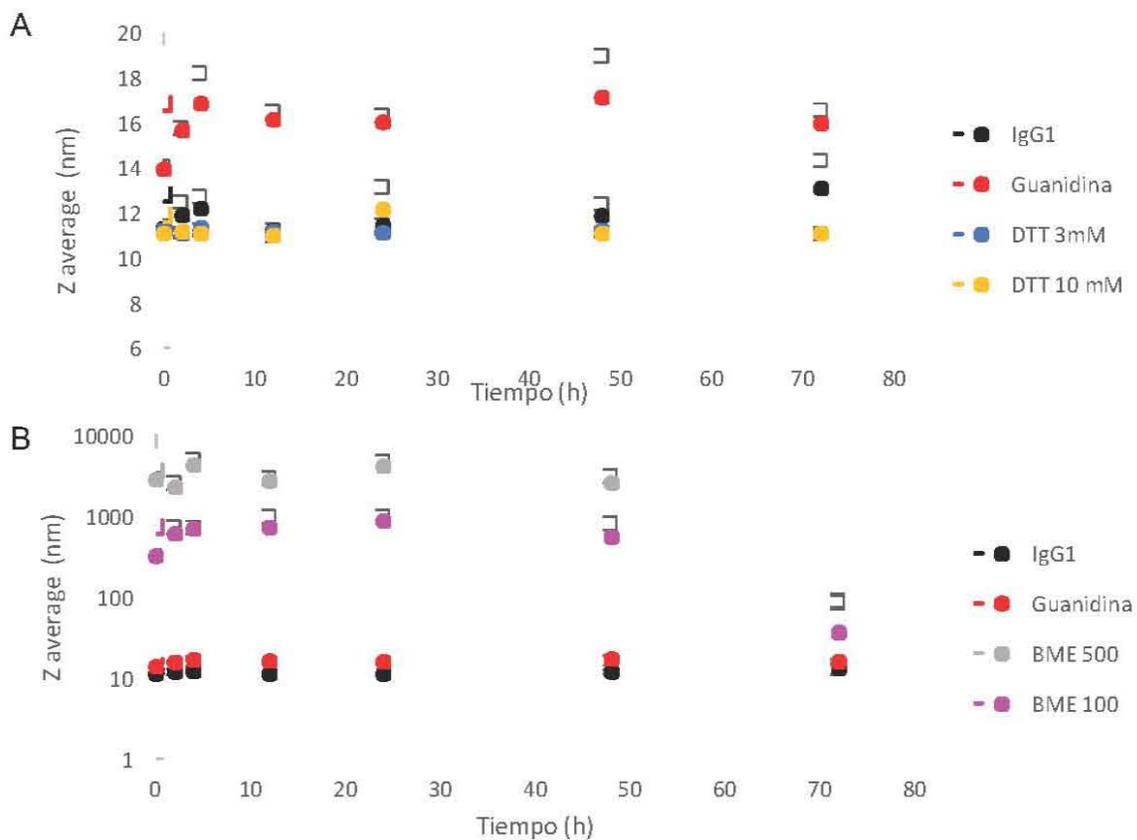


Figura 18. Efecto del DTT y BME en el tamaño de un AcM a lo largo de 3 días. Diámetro promedio según intensidad, la línea roja muestra el control positivo de máximo desplegamiento de la molécula y la línea negra el IgG1 nativo. A) Comparación entre controles y muestras tratadas con DTT. B) Comparación entre controles y muestras tratadas con BME.

Se realizó una electroforesis en gel de gradiente de acrilamida prefabricados marca Bio-Rad ® (Núm. Catálogo 456-1093), en el cual se cargaron 6 µg de IgG1 inmediatamente después de incubar 10 minutos a 37°C en buffer TBS con un rango de 0 a 100 mM DTT, y se corrió a 120 mV durante 2.5 h. Además, se realizó un SDS-PAGE, 24 h después de la incubación IgG1 a -316.3 mV a 37°C (Figura 20). El resultado de ambos geles muestra que la reducción del IgG1 es parcial desde los primeros 10 minutos y se conserva por 24 h, lo cual concuerda con el mantenimiento del estado reducido de la proteína roGFP2 (Figura 13).

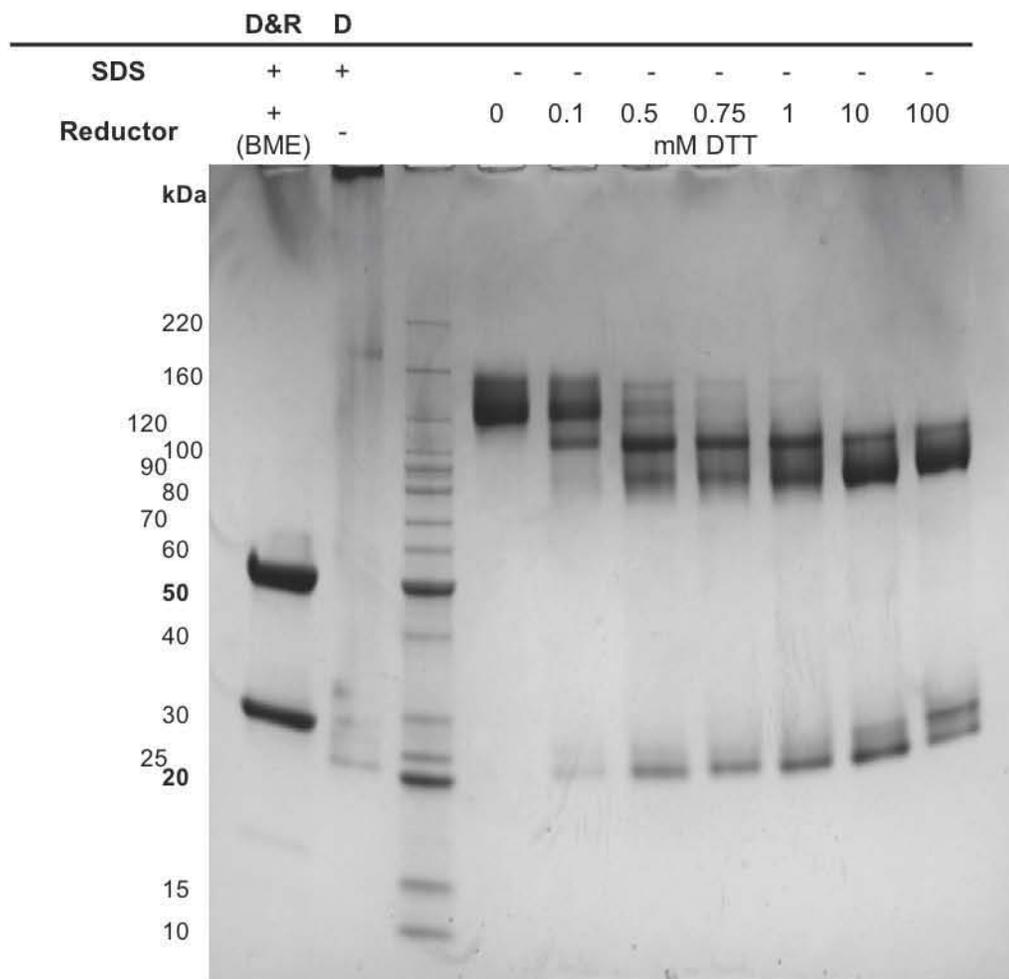


Figura 19. Grado de reducción de IgG1 a los 10 minutos a distintas concentraciones de DTT. IgG1 en condiciones no desnaturizantes, incubado a 37°C en presencia de DTT. D&R: Control de IgG1 completamente desnaturizado y reducido. D: Control de IgG1 en buffer desnaturizante no reductor.

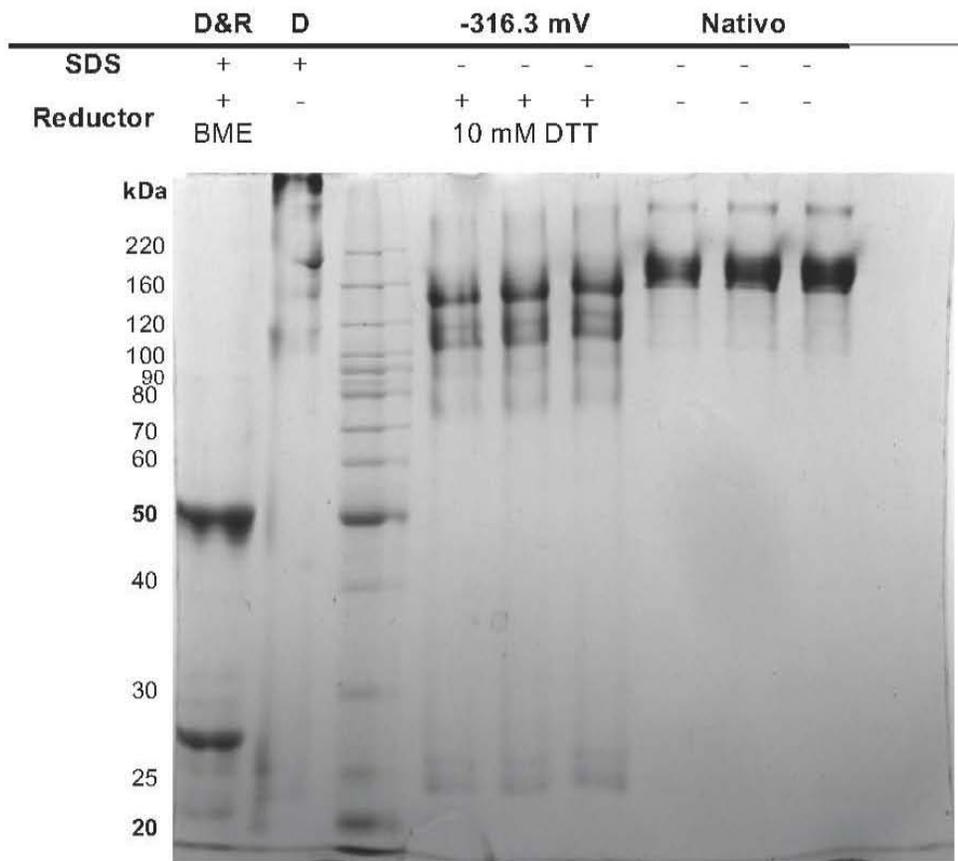


Figura 20. Grado de reducción de IgG1 a las 24 h a 10 mM DTT (-316.3mV). IgG1 en condiciones no desnaturizantes tratado con DTT durante 24 h a 37°C. D&R: Control de IgG1 desnaturizado y reducido durante calentamiento. D: Control de IgG1 en buffer desnaturizante no reductor. Reacciones por triplicado.

En el gel de acrilamida de la Figura 19, se observa el IgG1 totalmente reducido en el primer carril, mostrando dos bandas correspondientes a la cadena pesada (50 kDa) y a la ligera (25 kDa), el siguiente carril muestra que el SDS sin previa incubación con un agente reductor, no es capaz de liberar sus cadenas y forma compuestos de gran tamaño que no son capaces de migrar a través del gel. El gradiente de concentraciones de DTT, revela la separación gradual de las cadenas ligeras. Sin embargo, no muestra liberación de la cadena pesada, ni siquiera con una concentración de 100 mM DTT.

Después de 24 h de incubación a -316.3 mV, se observa una banda tenue de entre 75-80 kDa, posiblemente resultado de la separación entre las dos cadenas pesadas aún unidas a su cadena ligera. Se propone que los eventos de reducción de los puentes disulfuro que unen a las cadenas pesadas son mucho menos probables que los de reducción de las cadenas ligeras, dado que el DTT no es capaz actuar dentro de cavidades hidrofóbicas (Cline *et al.* 2004). Comparando estos hallazgos con los resultados de CME, se sugiere que el efecto del potencial redox reductor induce la reducción de algunos puentes disulfuro desde los primeros 10 minutos, sorprendentemente, estos eventos no provocan un efecto inmediato en cambio en el ambiente hidrofílico/hidrofóbico de los triptófanos del IgG1. Se ha documentado que existe gran abundancia de prolinas en la secuencia de la cadena constante del IgG1. Sabiendo que una de las características principales de este aminoácido es su limitada libertad de rotación (Schimmel y Flory 1967), podría suponerse que la resistencia al cambio se deba a su presencia en las asas, manteniendo una rígida conformación β -sandwich. Además, se sabe que el plegamiento nativo del IgG1 inicia por una isomerización de Pro35 a la configuración *cis* en el dominio C_H3 (Thies *et al.* 1999) dentro de la célula. Esta reacción se lleva a cabo por la enzima peptidil prolil isomerasa (PPI) y de una manera más lenta, esta reacción puede llevarse a cabo por cambios de pH o fuerza iónica (Zhang *et al.* 2002). Cabe mencionar que la estabilidad del IgG1 en el buffer TBS a lo largo de la cinética demuestra que las características fisicoquímicas del mismo no inducen un cambio conformacional Figura 16, por lo que se descarta que el cambio en el ambiente hidrofílico de los triptófanos en el IgG1 sometido a 10 mM de DTT, surja de un fenómeno provocado por la isomerización de prolinas, de manera independiente a la presencia del DTT. Se propone que el potencial redox reductor (-316.3 mV) en el IgG1 provoca su reducción parcial, con la pérdida de la estructura cuaternaria, seguido de la relajación lenta y moderada de su estructura terciaria hasta alcanzar un 40% de desplegamiento, con respecto al desplegamiento máximo observado para el IgG1 en Guanidina.

6.4. Evaluación del potencial redox en la sialidación del AcM.

Según la literatura, a pesar de la diversidad entre sialiltransferasas, las posiciones del sustrato donador y el aceptor coinciden dentro del sitio catalítico (Meng *et al*, 2013; Kakuta *et al*, 2008). Como se observa en la Figura 21-A, el mecanismo propuesto para ST6Gal1 de humano, describe que la formación de un puente de hidrógeno entre Pro320 y His370 favorece que el átomo N^{ε2} de His370 actúe como base catalítica, que desprotona el hidroxilo-6 de la galactosa terminal, produciendo un O6 altamente nucleofílico, la Ser323 forma dos enlaces de hidrógeno con los oxígenos del grupo carboxílico del CMP-ácido siálico, y lo posiciona para que reaccione con la galactosa activada (desprotonada); posiblemente, la formación de estos dos puentes de hidrógeno favorecen transferencia de carga (electrones) lejos del C2 del ácido siálico, aumentando su carácter electrofílico, y favoreciendo el ataque nucleofílico del O6, lo que resulta en el enlace glicosídico $\alpha(2-6)$ entre el ácido siálico y la galactosa (Kuhn *et al*, 2013). En base a lo anterior, primeramente, se consideró cuantificar la transferencia de ácido siálico bajo la condición redox que indujo mayores cambios en la estructura terciaria del IgG1 10 mM DTT (-316.3 mV). Se empleó el método descrito por Wu *et al*. (2011), el cual consiste en cuantificar, por medio de verde malaquita, el fosfato liberado por una 5'nucleotidasa (CD73) a partir de CMP, que a su vez se libera después de la transferencia de ácido siálico a la galactosa aceptor, como se muestra en la Figura 21-B. La estequiometría de la reacción acoplada es 1 mol galactosa: 1 mol ácido siálico: 1 mol CMP: 1 mol P_i.

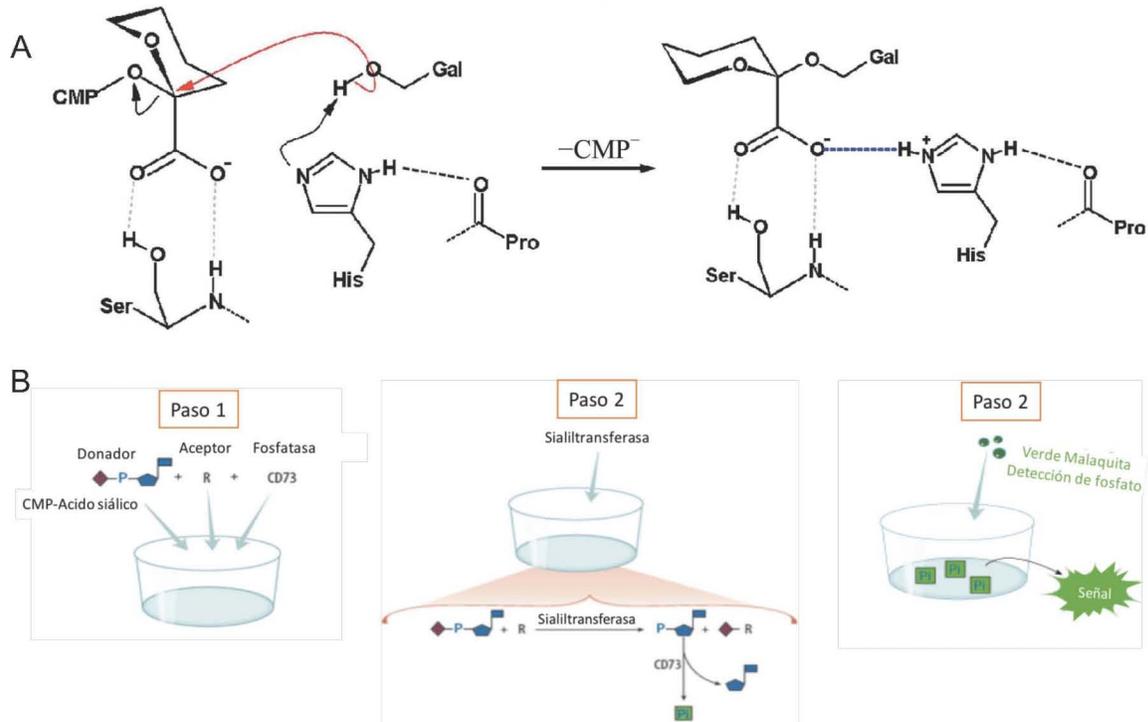


Figura 21. Descripción de reacción de sialidación. A) Mecanismo de reacción de ST6Gal-1. Kuhn et al, 2013. B) Principio de ensayo de actividad de sialiltransferasa. Kit R&D Systems®. (1) Se coloca el donador CMP-Ác. siálico con la proteína aceptora y la fosfatasa en determinado volumen. (2) Se añade la sialiltransferasa. (3) La fosfatasa libera el fosfato proveniente del CMP, producido por la transferencia de cada siálico a la proteína, el Pi reacciona con verde malaquita modificando su absorbancia a 620 nm.

Para realizar este ensayo se adquirió el paquete “Sialyltransferase activity” de R&D Systems®, pero después de obtener resultados incongruentes, el uso de este sistema se descartó. Los resultados y discusión de este análisis se encuentran en la sección de anexos 10.5. Debido a lo anterior, la cuantificación de ácido siálico transferido se basó únicamente en el análisis del perfil de glicosilación del IgG1 después de cada tratamiento. Se diseñaron tres conjuntos de tratamientos nombrados como “Experimentos A, B y C” y descritos en la Tabla 12.

Tabla 12. Reacciones de sialidación conjunto de experimentos "A, B y C".

Descripción de reacción (4 h de tiempo de reacción)	Código	IgG1 (nmol)	DTT (mM)	Pre-incubación (h)
Sialiltransferasa acoplada a fosfatasa $\text{CMP-ácido siálico} + \text{IgG1} \xrightarrow{\text{SiaT}} \text{IgG1-ácido siálico} + \text{CMP}$ $\downarrow \text{CD73}$ Citidin + Pi	A1**	4	0	24
	A2**	4	3	24
	A3*	4	10	24
	B1	4	0	24
	B2	4	10	24
	B3	0.8	0	24
Sialidación $\text{CMP-ácido siálico} + \text{IgG1} \xrightarrow{\text{SiaT}} \text{IgG1-ácido siálico} + \text{CMP}$	B4	0.8	10	24
	B5	0.8	0	48
	B6	0.8	3	48
	B7	0.8	10	48
Descripción de reacción (24 h de pre-incubación)	Código	IgG2 (nmol)	DTT (mM)	Tiempo reacción (h)
Sialidación $\text{CMP-ácido siálico} + \text{IgG1} \xrightarrow{\text{SiaT}} \text{IgG1-ácido siálico} + \text{CMP}$	C1*	4	0	4
	C2*	4	10	4
	C3*	0.8	0	4
	C4*	0.8	10	4
	C5*	0.8	0	1
	C6*	0.8	10	1

Tratamientos con (*) reacción única y (**) reacción por duplicado. El resto de las reacciones se hicieron por triplicado.

En la Tabla 12 se pueden observar cuatro variables: concentración de DTT, tiempo de pre-incubación, tiempo de reacción y concentración de AcM. La cantidad de AcM añadida se sujetó a dos valores 0.8 y 4 nmoles. El primer valor corresponde a la mínima cantidad de AcM procesable para análisis del perfil de N-glicosilación por HPLC (100µg), mientras que 4 nmoles de AcM ofrece mayor cantidad de sustrato aceptor (galactosas) en la reacción. Como se observa en la Tabla 13, de acuerdo con el perfil de glicosilación de este AcM, teóricamente en los tratamientos se añaden 229.6 o 1 148 pmoles de galactosas.

Tabla 13. Cálculo de picomoles de galactosa equivalentes a un nanomol de AcM añadido a la reacción con base en el patrón de glicosilación del anticuerpo utilizado.

AcM añadido (nmol)	Galactosa en G1 (pmol)	Galactosa en G2 (pmol)	Galactosa total (pmol)
1	240	47	287

Estudios previos han descrito el perfil de N-glicosilación presente en un anticuerpo y el orden de elución de cada molécula por HPLC (Serrato *et al.* 2004). La proporción de estos N-glicanos puede variar entre anticuerpos, línea celular y cultivo, para el anticuerpo IgG1 usado en este estudio, el perfil de glicosilación se describe en la Tabla 18 y Figura 48 de la sección de Anexos 10.6. En base a esta información el análisis de las reacciones de sialidación en cada tratamiento siguió el siguiente orden:

1. Identificación de los picos nuevos según el perfil de N-glicosilación del AcM.
2. Cuantificación de la abundancia relativa de cada N-glicano.
3. Comparación del rendimiento de N-glicanos sialidados obtenido en cada tratamiento.

El “experimento A” corresponde al diseño experimental establecido para el uso del paquete “Sialyltransferase activity”, este conjunto de tratamientos se describe a detalle en la sección de anexos Tabla 17. Cabe mencionar que las reacciones B1 y B2 son un triplicado de las reacciones A1 y A3. Primeramente, Los N-glicanos provenientes de los tratamientos A1, A2 y A3 se purificaron para la derivatización fluorescente. Como se ilustra en la Figura 22, los cromatogramas de cada tratamiento se compararon, encontrando así picos que sobresalen de la referencia, es decir, del IgG1 no tratado (línea negra).

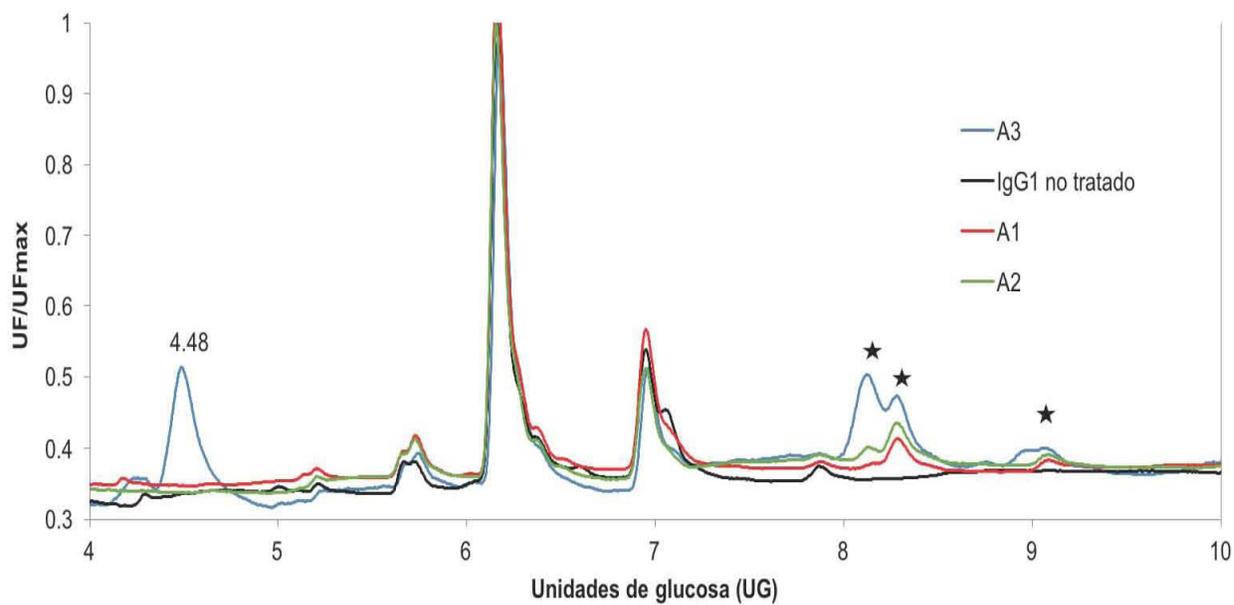


Figura 22. Perfiles de glicosilación después de sialidación acoplada a fosfatasa obtenidos por HPLC fase normal (experimento "A"). La estrella señala los nuevos picos posiblemente correspondientes a N-glicanos sialidados.

Se ha reportado la elución de N-glicanos sialidados a unidades de glucosa (UG) mayores a 7.5 (Royle *et al.* 2006). Además, considerando que la separación de compuestos polares se basa en la formación de puentes de hidrógeno entre un carbamoil no iónico y los grupos hidroxilos de los azúcares de la muestra, se espera que los N-glicanos más complejos, como los sialidados, tengan mayor tiempo de retención. En este contexto, los picos señalados con estrella en la Figura 22, podrían corresponder a N-glicanos sialidados. Nótese el caso de la muestra A3, que presenta una estructura eluída a 4.48 UG, la cual, podría corresponder a N-glicanos paucimanosa, según su tiempo de retención y con respecto a la Tabla 18 (sección de Anexos).

Para confirmar la identidad de estos nuevos picos, se procedió a realizar una reacción con sialidasa (*C. perfringens* recombinante) y α -manosidasa (Jack bean). La primera cataliza la hidrólisis de enlaces $\alpha(2-3,6,8)$ entre una galactosa un ácido siálico terminal del N-glicano, la segunda enzima cataliza la hidrólisis de enlaces $\alpha(1-2,3,6)$ de la manosa terminal unida al N-glicano. Posteriormente, las muestras se analizaron y se compararon como se ilustra en la Figura 23.

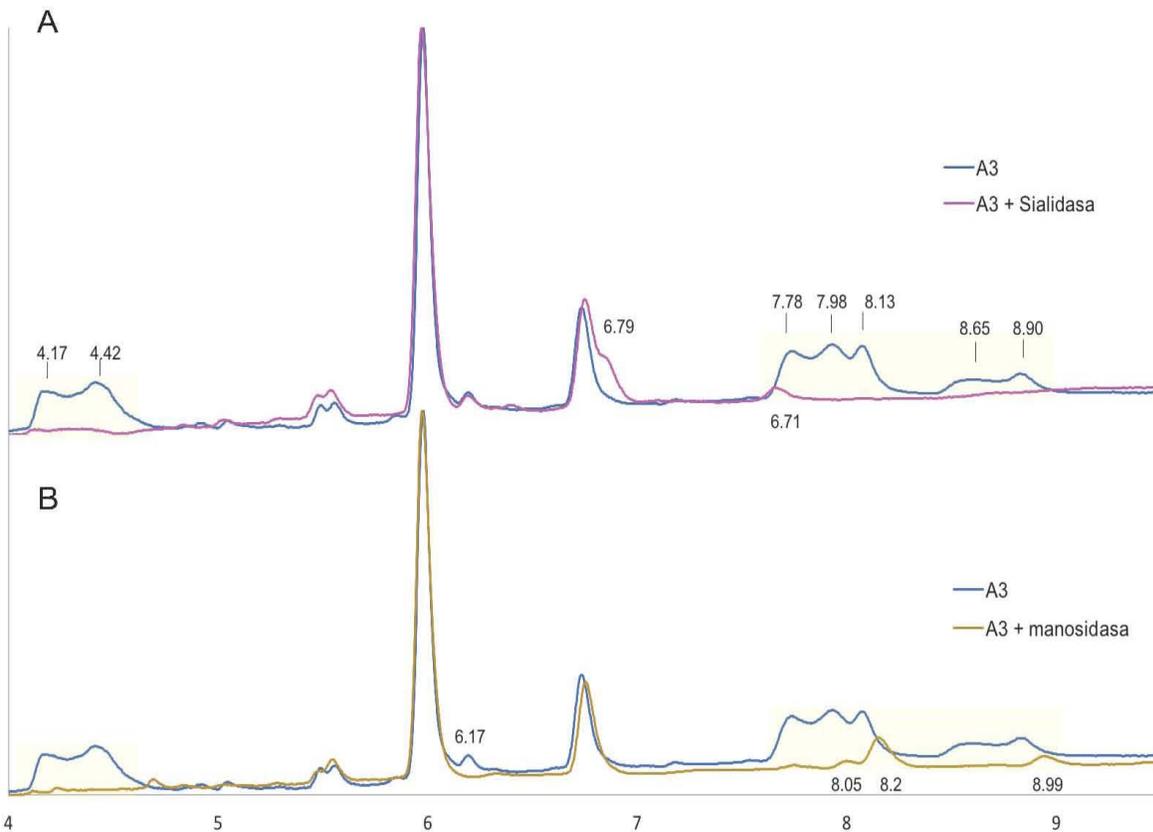


Figura 23. Cromatograma HPLC. Perfiles de glicosilación después de sialidación *in vitro* y desialidación. La línea azul muestra el IgG1 sialidado con 10 mM DTT mientras que la línea rosa corresponde a la misma muestra después del tratamiento con sialidasa y la línea amarilla describe el perfil después de haberla tratado con manosidasa. Los números mostrados sobre los picos señalan estructuras susceptibles a la acción de la exoglicosidasa en particular.

En la Figura 23 se observa que la nueva inyección de A3 no reprodujo los picos observados en la Figura 22, éste cambio en la resolución de los picos podría sugerir la degradación de un compuesto desconocido. Por otra parte, después del tratamiento con exoglicosidasas se observan dos situaciones: la sialidasa, además de actuar sobre las especies eluídas después de 7.78 UG, aparentemente también actuó sobre las especies eluídas a 4.17 y 4.42 UG; de manera similar la manosidasa, no solo actuó sobre los posibles picos con manosas terminales (4.17 y 4.42) sino también sobre las especies eluídas después de 7.78 UG. Esta última muestra (A3+manosidasa) presentó nuevos picos, de menor abundancia relativa,

eluidos a 8.05, 8.2 y 8.99 UG. Considerando que las enzimas mantienen especificidad por un sólo residuo terminal, manosa o ácido siálico, es probable que la eliminación de los picos señalados dentro de las regiones amarillas en la Figura 23, se deba en parte al efecto del procesamiento de precipitación con etanol para purificar los N-glicanos después de la digestión con exoglicosidasas.

Existe la posibilidad de que las especies correspondientes a los nuevos picos, representen N-glicanos de interés vulnerables al proceso de purificación, por ello es fundamental aplicar otra prueba de identificación de N-glicanos sialidados. La literatura menciona que es posible separar oligosacáridos ácidos y neutros a través de distintos gradientes de solventes. Se presume que en glicanos de IgG, la alta concentración de sales (ACS, 250 mM formato de amonio) permite retardar la elución de las especies sialidadas, a diferencia del sistema a baja concentración de sales (BCS, 25 mM formato de amonio) en el cual eluyen a valores menores de UG (Guile *et al.* 1996). Considerando que las inyecciones anteriores se han realizado aplicando una fase móvil de ACS, sería posible diferenciar N-glicanos sialidados al comparar los cromatogramas de las muestras A3 inyectadas a BCS, como se observa en la Figura 24. Además, se procesó la muestra A3-f (Tabla 18), resultante de una reacción control que mantiene el mismo tratamiento que A3 pero sin la adición de sialiltransferasa a la mezcla de reacción, por lo que no hay posibilidad de obtener N-glicanos sialidados. La muestra A3-f servirá para comprobar que los picos nuevos observados surgen de una interferencia derivada de factores ajenos a la sialidación.

Los picos eluidos a 8 y 8.2 UG en la muestra A3+manosidasa de la Figura 23 también se observan en la muestra A3*ACS de la Figura 24. Por practicidad, estos picos se denominarán picos de interés. La muestra A3*ACS proviene de la muestra A3 después de la purificación por precipitación con etanol, inyectada a ACS, tal como se realizó en la inyección de A3. En la Figura 24, la flecha punteada señala el desplazamiento de los picos de interés entre una corrida a BCS y ACS de la muestra A3, como se espera para los N-glicanos sialidados. La comparación de la reacción A3 y A3-f inyectadas a BSC demuestra que los picos señalados con

estrella son productos no asociados a la sialidación. Sabiendo que, la muestra A3-F fue un control de reacción sin sialiltransferasa (Tabla 17), lo más probable es que los picos con estrella sean resultado de contaminantes producidos en la reacción en presencia de 10 mM DTT.

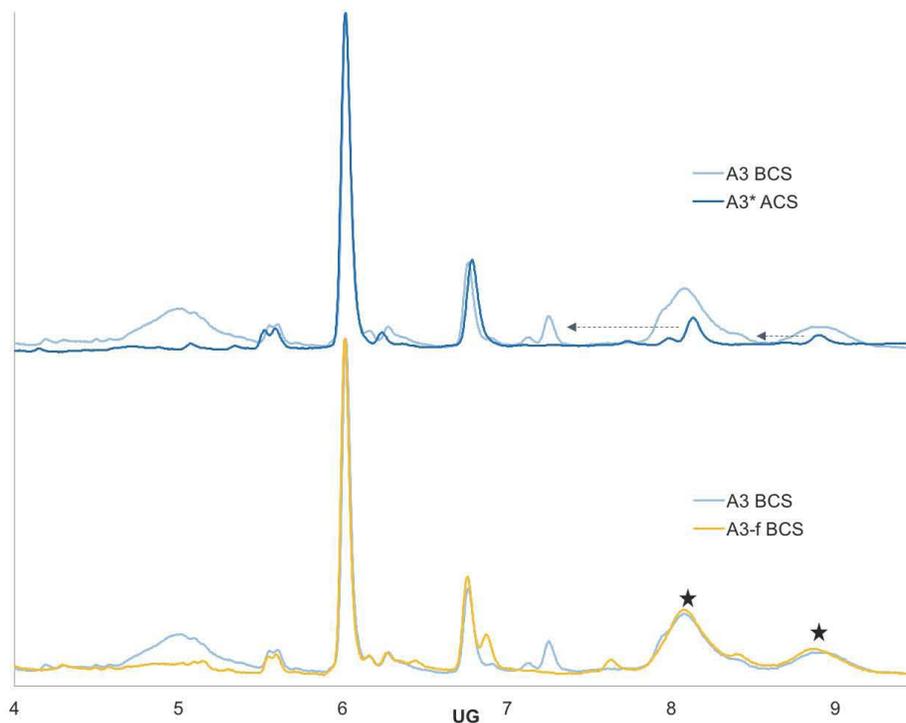


Figura 24. Cromatograma de muestra IgG1 -316.3 mV sialidado (A3) en fase móvil de 250 mM y 25 mM formato de amonio. La muestra A3* ACS representa la misma muestra A3 después de una precipitación con etanol inyectada en una fase móvil de 250 mM de formato de amonio. A3 BCS y A3-f BCS (A3-f corresponde a A3 sin $\alpha(2-6)$ SiaT), fueron inyectadas en una fase móvil de 25 mM de formato de amonio. La flecha indica el desplazamiento de los picos de interés. La estrella señala los picos de contaminantes.

A continuación, los glicanos del experimento B se derivatizaron, se purificaron mediante precipitación con etanol y fueron separados por HPLC. Como se indica en la Tabla 12, en este experimento se incluyen tres factores de interés: Tiempo de pre-incubación con DTT, concentración de AcM y concentración de DTT. La aparición de los picos correspondientes a N-glicanos sialidados, debería ser equivalente a la desaparición de los picos correspondientes a N-glicanos galactosilados. Por ello, es de interés comparar la abundancia relativa de ambos

grupos de N-glicanos, como se ilustra en la Figura 25. Los valores numéricos se muestran en anexos (Tabla 19).

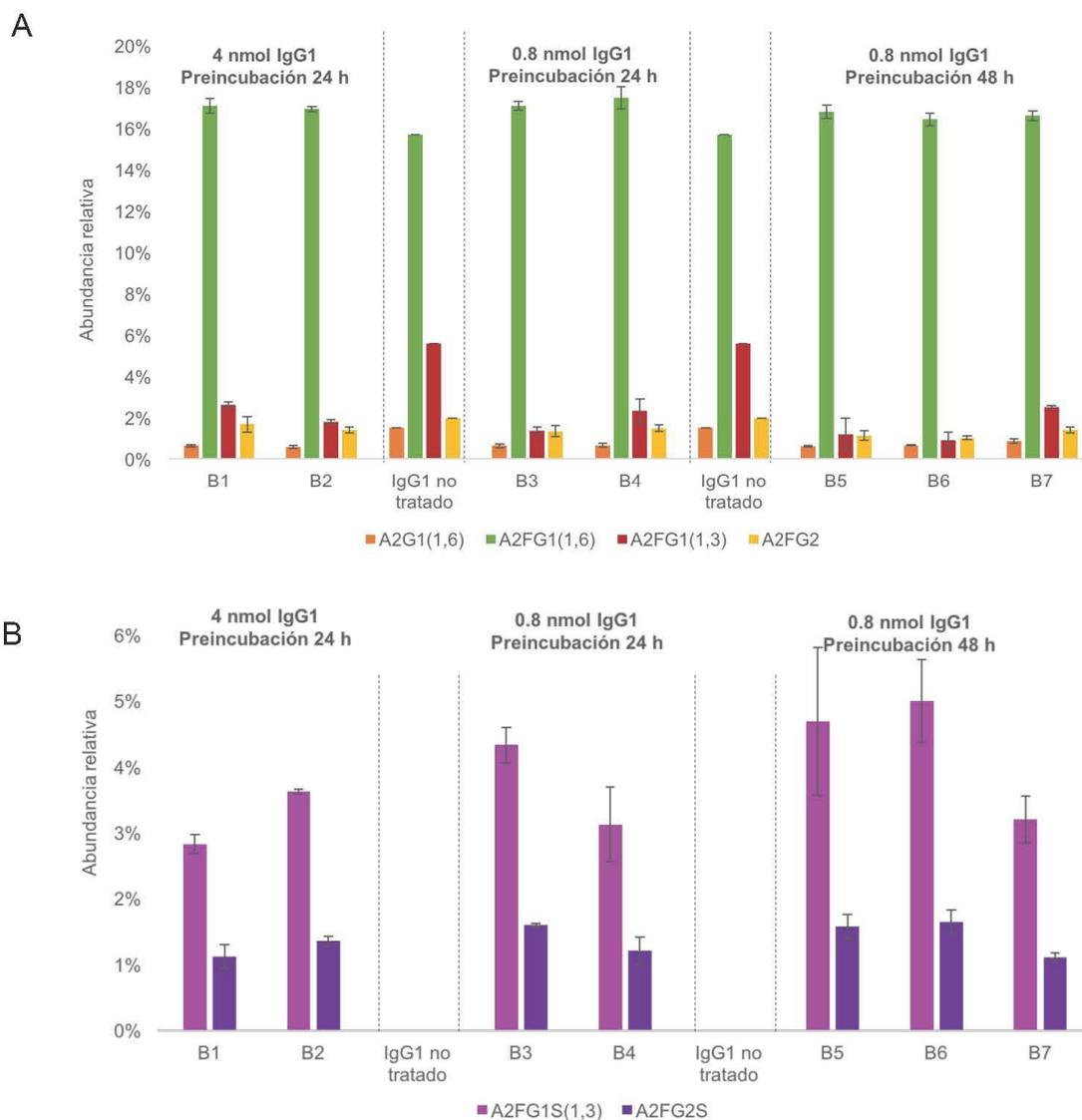


Figura 25. Abundancia relativa de glicanos después de las reacciones de sialidación experimento "B". A) Estructuras galactosiladas. B) Estructuras sialidadas. Los patrones de glicosilación mencionados se describen en la Tabla 18. IgG1 no tratado control de comparación.

La identidad de las nuevas estructuras sialidadas, se propuso sabiendo que la aparición de picos correspondientes a N-glicanos sialidados (Figura 25-B) debería ser equivalente a la desaparición de los picos correspondientes a N-glicanos

galactosilados, Figura 25-A (sustrato aceptor de $\alpha(2-6)$ SiaT). En este supuesto, podría plantearse que el pico A2FG1(1,3) dio lugar a una estructura sialidada A2FG1S1(1,3), eluída a 8.2 UG (Figura 23) y que la disminución de la estructura A2FG2 podría haber dado lugar a la aparición de (A2FG2S2) eluído a 8.9 UG. No obstante, confirmar la identidad de las nuevas estructuras exige análisis experimentales adicionales que no se abordaron en este proyecto.

Con la finalidad de investigar el efecto del potencial redox en relación entre el cambio en la estructura terciaria del AcM y su sialidación, es importante comparar el rendimiento de N-glicanos sialidados de la Figura 25, con los resultados de la cinética de fluorescencia intrínseca, DLS y SDS-PAGE de la sección 6.3. Considerando cada variable involucrada en los tratamientos de sialidación, tenemos lo siguiente:

- Tiempo de pre-incubación con DTT. La cinética de fluorescencia intrínseca del AcM a -316.3 mV (Figura 16), muestra que el centro de masa espectral del AcM se desplazó hacia el desplegamiento, entre las 24 y 48 h de incubación. Sin embargo, el rendimiento de sialidación no fue mayor en la reacción B7 que en la B4 (Figura 25), como se esperaba después del cambio estructural, sino que no hay diferencia entre la producción de N-glicanos sialidados debido al tiempo de pre-incubación.
- Concentración de AcM. Al comparar las reacciones B3-B4 y B5-B7, se aprecia que la concentración de AcM determinó dos tendencias contrarias en la producción de N-glicanos sialidados. Al añadir 4 nmoles de AcM ($12 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), el AcM en TBS muestra menor sialidación que el tratamiento en presencia de 10 mM DTT (-316.3 mV), sucediendo de manera contraria cuando se añaden 0.8 nmol de AcM ($2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). Se sugiere que, en el caso de alta concentración de AcM en TBS ($12 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), se propició un aumento en la asociación intermolecular entre monómeros de anticuerpos, bloqueando el reconocimiento de las galactosas por la $\alpha(2-6)$ SiaT y modificando la velocidad de difusión de los elementos que participan en la sialidación de las galactosas.

- Concentración de DTT (Potencial redox). Al consultar las cinéticas de desplegamiento del AcM en presencia de 10 mM DTT (-316.3 mV) y sin tratamiento (Figura 16), se observa que, a las 24 y 48 h, el CME del AcM incubado con 10 mM DTT se desplaza hacia el desplegamiento, a diferencia del AcM sin tratamiento. Contrario a lo esperado, la sialidación es menor en el AcM en presencia de 10 mM DTT (-316.3 mV) que para el AcM tratado en ausencia de DTT (-240 mV). Por otro lado, el rendimiento es similar entre las reacciones B5 y B6 (IgG1 tratado con 3 mM DTT y sin DTT, respectivamente). Al comparar el desplegamiento del IgG1 en estas reacciones a las 48 h (Tabla 12), se observa que si hay mayor desplegamiento en presencia de 3 mM DTT que en el IgG1 sin tratamiento, (Figura 16 y Figura 18) lo cual no correlaciona con el resultado de la sialidación en ambas reacciones.

Para investigar el efecto de la concentración de DTT en la $\alpha(2-6)$ SiaT se realizaron tres reacciones en las que el buffer con 10 mM de DTT se preincubó 24 y 48 h a 37°C, además de un control del buffer TBS preincubado 24h en las mismas condiciones. Finalizado el tiempo se añadió N-glicano marcado con el colorante 2-AB (equivalente a 90 pmol maltosa/reacción) y el resto de los componentes de la reacción en la misma proporción que todas las reacciones previamente realizadas. Se tomó una muestra de cada reacción a las 1, 2 y 3 h. Considerando el perfil de N-glicosilación de la mezcla de N-glicanos alimentada, se obtuvo la cinética mostrada en la Figura 26. La cinética muestra cómo el porcentaje de N-glicanos sialidados es menor en presencia de DTT que en ausencia del mismo, ya que en la reacción sin DTT se alcanza un 16% mientras que en las condiciones con DTT preincubado se obtiene un 12%, los rendimientos detallados pueden consultarse en la Figura 49 de la sección de anexos 10.6, en estas gráficas se observa que la sialidación de la antena (1,6) solo se lleva a cabo en la reacción en ausencia de DTT. Sugiriendo que el DTT, en estas condiciones, afecta la actividad de la $\alpha(2-6)$ SiaT.

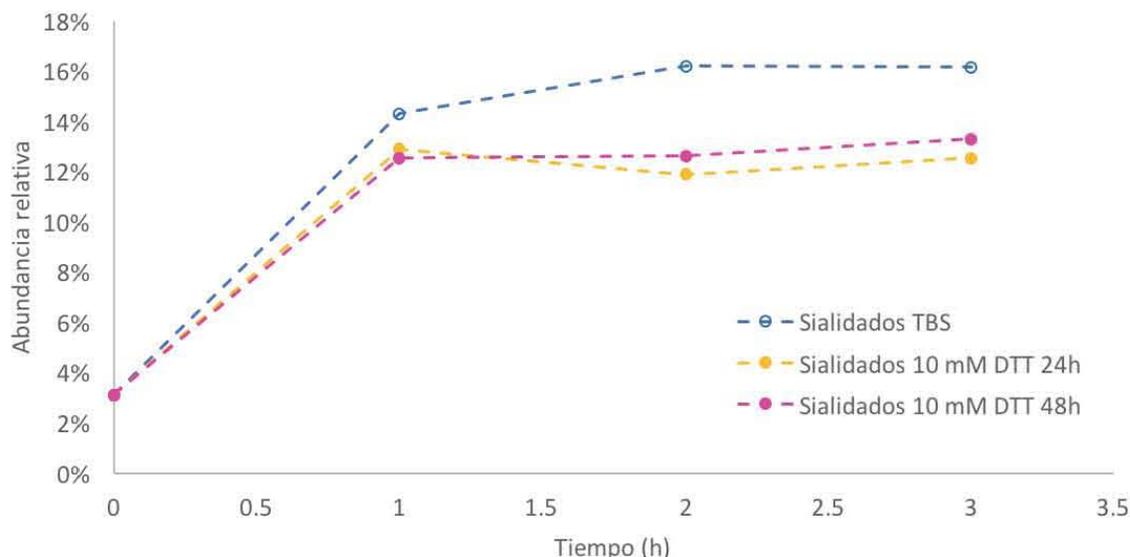


Figura 26. Cinética de sialidación de N-glicanos 2-AB sialidados a distintas concentraciones de DTT.

Al considerar los resultados de las variables anteriores y su relación con los elementos que participan en la reacción de sialidación, se proponen varios escenarios:

- El DTT a una concentración de 10 mM afecta la estructura de la α (2-6) SiaT, por lo cual, la diferencia en el desplegamiento del IgG1 no contrarresta el efecto de la presencia de DTT 10 mM sobre la enzima. Existe un puente disulfuro imprescindible en la actividad catalítica de sialiltransferasa, formado por las C350 y C361, el cual podría estar siendo afectado por el DTT, causando la reducción de la afinidad de la enzima por el sustrato donador y aceptor (Hirano *et al.* 2012; Quian *et al.* 2001).
- La sialidación no se favorece ya que la diferencia en el desplegamiento del IgG1 no es significativa o no corresponde a un relajamiento en el dominio C_H2, donde se posiciona el N-glicano, aunado al efecto negativo del DTT sobre la actividad de la enzima.

Por otro lado, es interesante observar que existen N-glicanos galactosilados no consumidos en ninguna de las reacciones de sialidación. Ante el rendimiento de

N-glicanos sialidados (Figura 25-B), se observa un consumo predominante de los N-glicanos A2FG1(1,3). Esto se atribuye a la alta regioselectividad del sitio catalítico de la sialiltransferasa por hacer un enlace $\alpha(2-6)$ en la antena 1-3 del N-glicano. Según la IUPAC (2006), regioselectividad se define como la preferencia de cierta reacción por formar o romper un enlace en determinada posición por encima de todas las posibles. La naturaleza de esta enzima se explica más claramente en la Figura 27 que muestra la estructura cristalográfica de ST6Gal1 de humano en complejo con CMP (PDB 4js2; Kuhn *et al*, 2013).

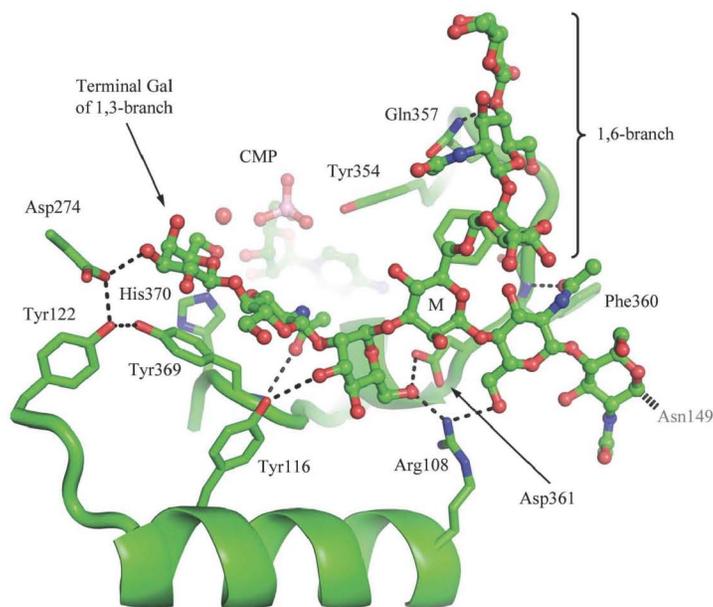


Figura 27. Estructura cristalográfica de ST6Gal1 de humano en complejo con CMP. (PDB 4js2). Kuhn *et al*. 2013.

El N-glicano esquematizado en forma esfera y línea corresponde a la Asn149 de la propia enzima, donde es en la manosa etiquetada como “M” donde emergen las antenas 1-3 y 1-6. El sitio catalítico forma cinco puentes de hidrógeno con la antena 1-3, entre los que destacan las interacciones con His370 y Tyr369, que propician una distancia favorable (3.3 Å) para el ataque nucleofílico sobre el C2 del ácido siálico (Kuhn *et al*. 2013), como se describe en el mecanismo de reacción esquematizado en la Figura 21-A. En cambio, la galactosa de la antena 1-6 tiene una menor interacción pues forma solamente un puente de hidrógeno

con Gln357. La sialidación de la antena 1-6 del N-glicano unido al IgG ocurre, aunque con menor proporción y extensos tiempos de incubación (Washburn *et al.* 2015).

Finalmente, para mejorar la diferenciación entre el rendimiento de sialidación de los tratamientos, se propuso observar la sialidación de un IgG2 que presenta mayor abundancia, que el IgG1, del N-glicano A2FG1(1,3). El IgG2 fue sometido a los tratamientos descritos para el experimento C (Tabla 12), verificando el tiempo de reacción como variable de interés. Los resultados se ilustran en la Figura 28. Los valores numéricos se muestran en anexos (Tabla 20).

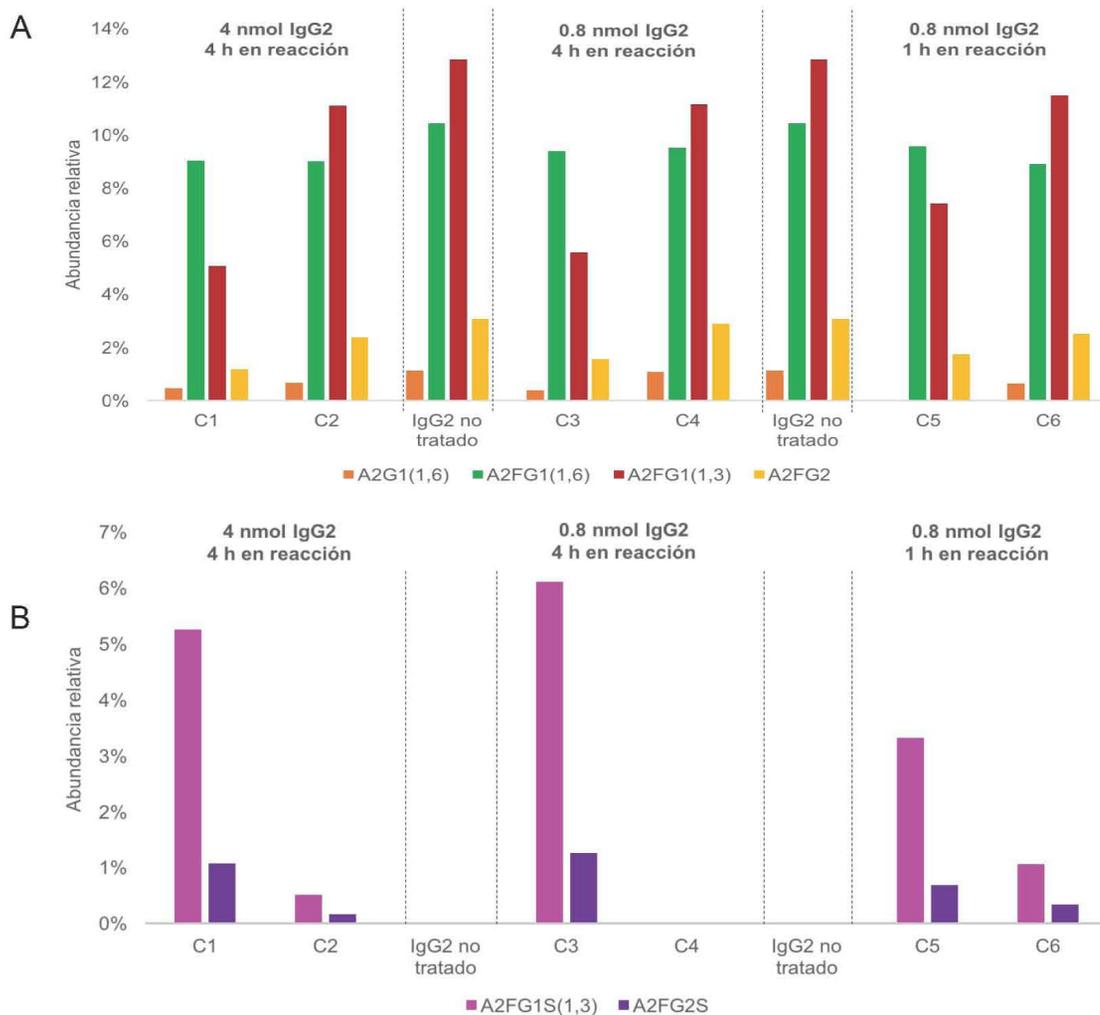


Figura 28. Abundancia relativa de glicanos después de reacciones de sialidación experimento “C”. A) Estructuras galactosiladas. B) Estructuras sializadas. Cada tratamiento comprende una sola reacción.

En la Figura 28 se observa que la sialidación del IgG2 disminuye dramáticamente para el tratamiento con 10 mM DTT. Se sugiere que esto podría deberse a que, a diferencia del IgG1, el IgG2 tiene mayor susceptibilidad a la reducción de los puentes disulfuro que unen las cadenas pesadas (Hutterer *et al.* 2013). La reducción de estos puentes disulfuro podría favorecer la inestabilidad de la molécula, la exposición de cavidades hidrofóbicas y en consecuencia la formación de agregados, ocultando el N-glicano y haciéndolo inaccesible a la sialiltransferasa. Por otro lado, la presencia de N-glicanos sialidados en la reacción C6 y su ausencia en C4, sugieren que la $\alpha(2-6)$ SiaT podría estar presentando actividad sialidasa (Kuhn *et al.* 2013). Obsérvese que, con 1 h de reacción, el tratamiento C6 muestra alrededor de 1% de N-glicanos sialidados, sin embargo, después de 3 h más, los N-glicanos sialidados desaparecen (tratamiento C4). Esto pudo haber afectado la abundancia relativa de las estructuras sialidadas encontradas en los experimentos “A” y “B”.

6.5. Cinética de CHO en cultivos en matraz agitado.

Se realizó un cultivo de células CHO productoras de un AcM en matraz por 180 h, en la que se mantuvo una viabilidad >95% hasta las 144 h, logrando los rendimientos mostrados en la Tabla 14. La cinética, mostrada en la Figura 29, se detuvo cuando se alcanzó una viabilidad cercana al 30% en ambos matraces. Las barras verticales en cada punto muestran la diferencia entre las mediciones de dos matraces de cultivo.

Tabla 14. Datos del consumo de sustratos durante el crecimiento de CHO.

$Y_{x/Gln}$	3.56×10^9 cel/mmol
$Y_{x/glc}$	0.86×10^9 cel/mmol
$Y_{lac/glc}$	1.07 mol/mol
q_{Gln}	-10.4×10^{-12} mmol/h-cel
q_{glc}	-43.3×10^{-12} mmol/h-cel
q_{Glu}	1.4×10^{-12} mmol/h-cel
q_{lac}	40.6×10^{-12} mmol/h-cel

μ	0.037 h ⁻¹
t_d	18.73 h
X_{max}	14.58 X10 ⁶ cel/mL

$Y_{x/Gln}$: Rendimiento celular por mmol de glutamina.

$Y_{x/glc}$: Rendimiento celular por mmol de glucosa.

$Y_{lac/glc}$: Rendimiento de lactato a partir de glucosa.

q_{glc} : Velocidad de consumo de glucosa por célula.

q_{Gln} : Velocidad de consumo de glutamina por célula.

q_{lac} : Velocidad de producción de lactato por célula.

q_{Glu} : Velocidad de producción de glutamato por célula

μ : Velocidad específica de crecimiento celular.

t_d : Tiempo de duplicación.

X_{max} : Concentración máxima celular alcanzada en el cultivo.

En la cinética de crecimiento se observa, que el cultivo dejó de crecer justo cuando la concentración de glutamina llegó a cero, es decir, este es un substrato limitante (Wahrheit *et al.* 2013), tiempo en el cual se alcanzó la máxima concentración de lactato. Amand *et al.* (2014) publicaron cinéticas de crecimiento de la línea celular CHO-K1 en cultivo de 60 mL, productora de un IgG1, en cultivos suplementados con glutamina 4 mM donde de manera similar, registran un consumo total de la glutamina a las 96 h, así mismo muestran que la concentración de glutamato se mantuvo entre 1 y 1.5 mM hasta las 96 h. Como se observa en la Figura 29-A, la concentración de glutamina aumentó sin haber sido suplementada, lo que sugiere que la célula podría estar sintetizando glutamina para disminuir el efecto del amonio intracelular (Wahrheit *et al.* 2013), posiblemente gracias a que el gen de la glutamino sintetasa haya sido utilizado como marcador de amplificación de genes de expresión en esta línea celular (Crockett *et al.* 1990), sin embargo hacen falta más estudios para explicar este resultado. La concentración celular máxima alcanzada fue 14.6 x10⁶ cel/mL, la cual es mayor a las concentraciones alcanzadas por López-Meza *et al.* (2016) con CHO-S productora de AcM en cultivo en lote de 30 mL (7x10⁶ cel/mL) y por Amand *et al.* (2014) que fue de 8x10⁶ cel/mL. Considerando que según el modelo de Luedeking–Piret para la producción de un AcM en células CHO, es no solo dependiente de la tasa de crecimiento sino también de la concentración celular

(López-Meza *et al.* 2016), alcanzar una alta cantidad de células es favorable para la línea celular CHO manejada en éste estudio.

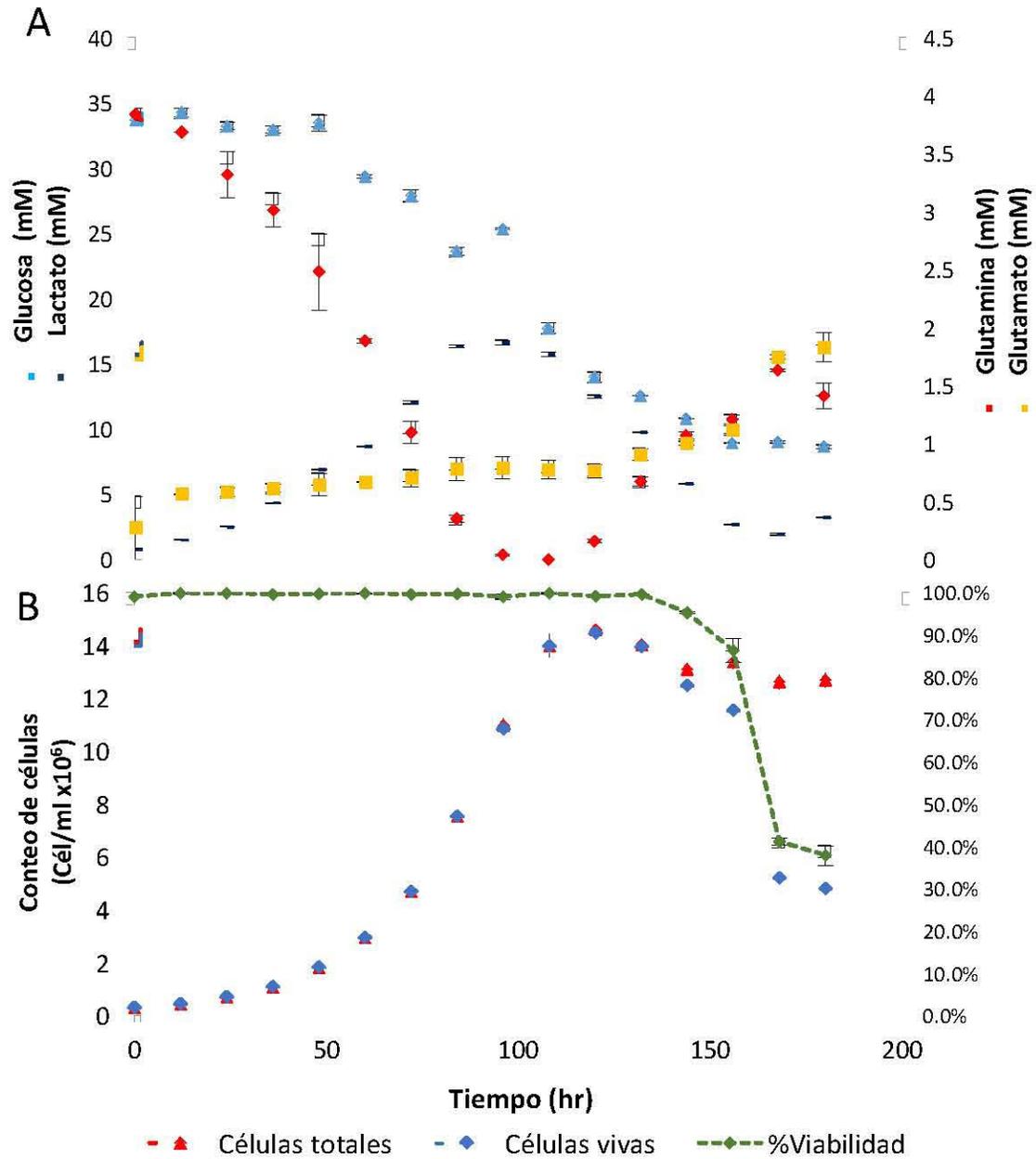


Figura 29. Cinética de crecimiento y metabolitos. A) Cinética de consumo y producción de metabolitos. B) Cinética de crecimiento de CHO y viabilidad.

La velocidad de consumo de glucosa a partir de datos reportados por López-Meza *et al.* (2016), es de 45.7×10^{-12} mmol/cel-h en células *naïve* y de 130×10^{-12} mmol/cel-h en células productoras. En contraste, la línea en estudio, también productora de AcM, muestra un valor de 43.3×10^{-12} mmol/cel-h; esto es relevante pues indica que, a pesar de mantener la producción de una proteína recombinante, su gasto energético de mantenimiento es cercano al basal. Por otro lado, resulta interesante evaluar el rendimiento de lactato a partir de glucosa ($Y_{lac/glc}$), ya que indica el aprovechamiento de energía, según el análisis de Xing *et al.* (2010) en un cultivo en biorreactor de 5 000 L $Y_{lac/glc}$ es de 1.23 ± 0.06 mol/mol, mientras que el obtenido en esta cinética fue de 1.07 mol/mol, lo cual señala que esta línea celular logra mayor eficiencia en el aprovechamiento de energía.

6.6. Expresión de roGFP2 en células CHO y análisis de colocalización en el Golgi

Se construyó el plásmido pFBGR-roGFP2_{golgi} a partir del plásmido pFBGR-EGFP utilizando los sitios de restricción Pacl y XhoI para eliminar el gen *EGFP* e introducir el gen *roGFP2_{golgi}* y se utilizaron técnicas moleculares para corroborar su correcta inserción, como se describe en los Anexos. Para la generación del báculo recombinante, se recombinó el plásmido pFBGR-roGFP2_{golgi} con el báculo vacío, al transformar el plásmido en las células de *E. coli* DH10Bac[®]. Se comprobó la correcta recombinación por medio de dos PCR:

- PCR oligos Pacl roGFP2 fw y M13 fw. Producto de PCR de 2893 pb.
- PCR oligos roGFP2-Bstz171 y M13 Rv. Producto 2811 pb.

El resultado de ambas PCR se muestra el gel de la Figura 30. Sólo en el carril 1 se observó la presencia de un amplicón con tamaño esperado en ambos casos. Fue a partir de éste que se procedió a generar el baculovirus.

Se aislaron 6 placas virales, se propagó el virus, y para encontrar los virus más eficientes, se realizó un ensayo de transducción en células CHO aplicando una MDI entre 100 a 150 UFP/cel. Mediante la observación de estos ensayos por microscopía de fluorescencia, se seleccionaron los pozos 1, 5 y 6, ya que presentaron expresión de roGFP2 en células CHO. Se amplificó el pozo 6, que tuvo un título viral de 4.62×10^8 UFP/mL.

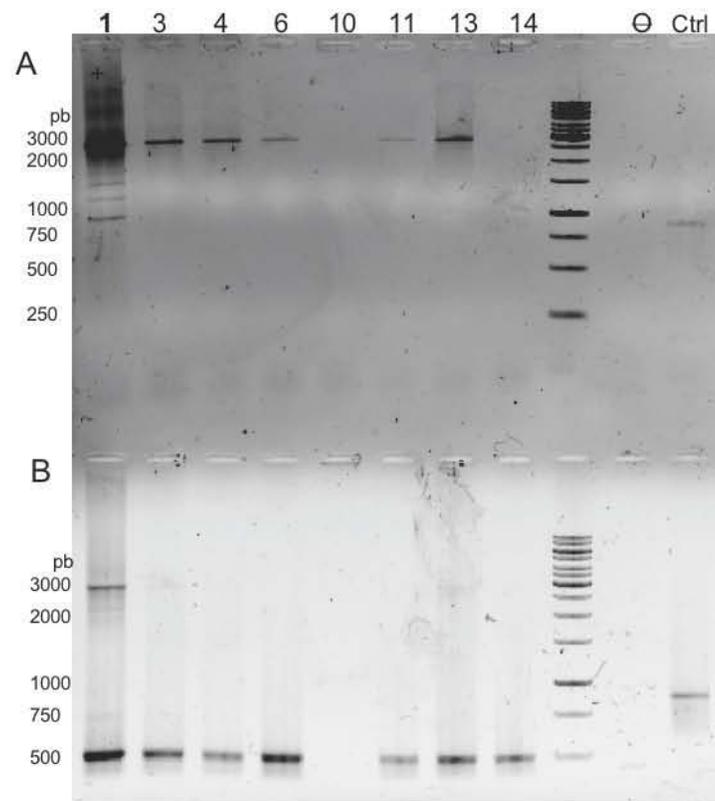


Figura 30. PCR de b acmido. A) PCR con oligos Pacl roGFP2 fw y M13 fw. B) PCR con oligos roGFP2-Bstz171 y M13 Rv. Ctrl: Control positivo de reacción de PCR. Ø: PCR con oligos sin templado.

6.6.1. Análisis de colocalización de roGFP2 en el complejo de Golgi.

Para asegurar la visualización de la estructura del Golgi en 3D, se adquirieron aproximadamente 20 imágenes en el eje Z con incremento de 1 μm , en tres campos para cada uno de los dos cultivos de células CHO, ambos con el marcador rojo fluorescente de Golgi Bodipy TR ceramide, en el primero se expresó roGFP2 con el baculovirus roGFP2_{golgi}, mientras que el segundo permaneció solamente con el marcador como control (Figura 31).

En las imágenes del cultivo expresando roGFP2 se eligieron 10 células únicas, y se aplicó una segmentación con el método de Otsu en el canal verde para seleccionar el área correspondiente a la distribución de roGFP2_{golgi}. Se utilizó el plugin "Colocalization" de Fiji (Schindelin *et al*, 2012) para obtener los coeficientes de colocalización presentados en la Tabla 15.

Los coeficientes de Manders M1 y M2 muestran la fracción de un fluoróforo sobrelapado con respecto a otro en determinada área. La primera columna indica la proporción del fluoróforo rojo (Bodipy TR Ceramida) que coincide con el verde (roGFP2), que fue alrededor del 90%, mientras que roGFP2, que visiblemente muestra áreas más definidas y pequeñas, muestra una ocupación del 99% en el Golgi marcado por Bodipy TR Ceramida.

Adicionalmente, se sabe que el coeficiente de Pearson expresa la relación entre aumento y decremento de las intensidades de los píxeles entre ambos canales con respecto a la varianza de ambas poblaciones, entregando 1 si la colocalización es perfecta, 0 si es aleatoria y -1 si es excluyente. Este análisis en 10 células indica una colocalización de 0.7, ya que a pesar de que el traslape de píxeles de ambos canales es satisfactorio, existe un desequilibrio entre sus intensidades, posiblemente debido a diferencias de expresión de roGFP2 entre células.

Finalmente, el coeficiente de correlación por intensidad (ICQ, por sus siglas en inglés), similar al de Pearson, muestra únicamente el grado de dependencia positiva entre la intensidad de píxeles de ambos canales, o bien la cantidad de píxeles que muestran la misma tendencia en el cambio de intensidad de fluorescencia, en relación al número total de píxeles. Los límites de colocación son -0.5 a +0.5, donde un marcaje azaroso corresponde a $ICQ = 0$, marcaje dependiente a $0 < ICQ \leq +0.5$ y marcaje independiente a valores de $-0.5 \leq ICQ < 0$. Para el caso mostrado en las imágenes analizadas, el valor promedio de 0.228 indica que existe una relación dependiente entre los píxeles de ambos canales. Considerando todo lo anterior, se concluye que roGFP2 si se encuentra en Golgi.

Tabla 15. Análisis de colocación de roGFP2 en Golgi.

	R^P	ICQ	M1	M2
Promedio	0.697	0.228	0.905	0.986
DE.	0.062	0.037	0.144	0.022

R^P: Coeficiente de Pearson

ICQ: Coeficiente de correlación por intensidad.

M1: Coeficiente de Manders canal rojo en verde.

M2: Coeficiente de Manders canal verde en rojo.

DE: Desviación estándar.

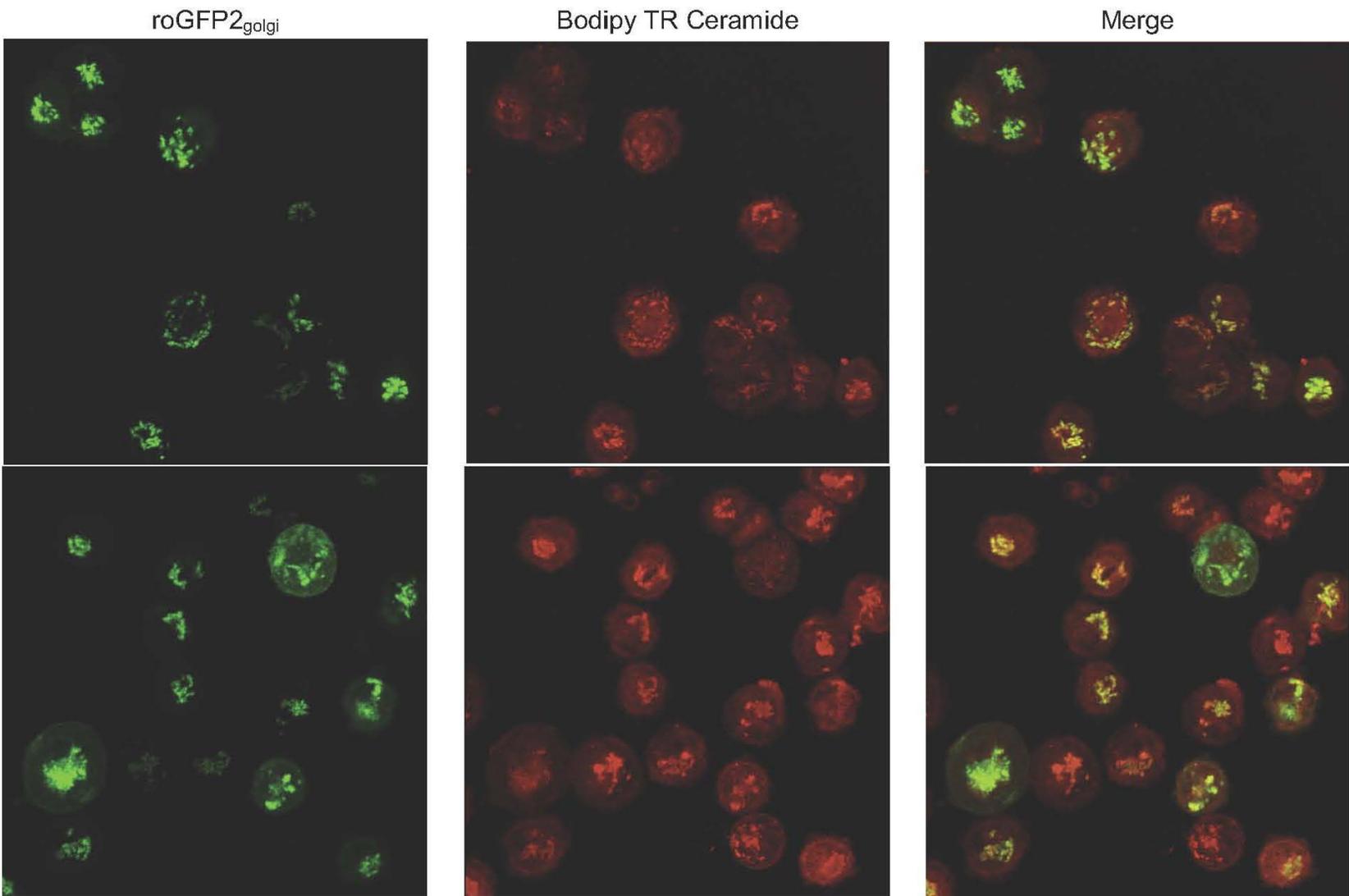


Figura 31. Ensayo de colocalización roGFP2_{golgi} con el marcador de Golgi Bodipy TR ceramide en células CHO. Dos conjuntos de células, la imagen tridimensional se colapsó en una imagen según su máxima proyección en Z para efectos de apreciación. Magnificación 60X.

6.7. Evaluación del potencial redox en Golgi de células CHO.

A continuación, se determinó el cambio en el potencial redox en el Golgi monitoreando la emisión de la fluorescencia de la proteína roGFP2 después de excitar a 405 o 488 nm, tal como se describió en la metodología (Sección 5.8) mediante la proporción R resultante de la Ec 2. Tanto para el sistema titulado con DTT como para el titulado con H_2O_2 , el conjunto de imágenes adquiridas se dividió en tres etapas. La primer etapa, corresponde al cultivo celular en estado basal, la segunda, a la adición del agente redox a 10 mM y la tercera, a otra adición para llegar a 50 mM. Cada experimento se realizó por duplicado.

Las gráficas de caja (Figura 32) representan el conjunto de valores de R para los pixeles de cada etapa. Después de someter el sistema al agente reductor DTT, los valores de R disminuyeron con respecto al estado basal, con tendencia hacia el estado de mínima oxidación de roGFP2 (Figura 32 A), como se esperaría para la proteína reducida (al aumento de la emisión a 488nm, Meyer y Dick, 2010). De la misma manera, al agregar el agente oxidante H_2O_2 , se encontró una tendencia hacia el estado de máxima oxidación de roGFP2 (Figura 32 B). Aunque la adición de 10 mM H_2O_2 amplió la distancia entre los extremos del 2do. y 3er. cuantil, no hubo una diferencia con respecto al estado basal, indicando que, las adiciones de H_2O_2 , no provocan un estado de oxidación de roGFP2 superior al basal en este compartimento. El resultado de este experimento puede observarse a detalle en la cinética de la Figura 50 ubicada en la sección de anexos, los valores numéricos también se encuentran en anexos (Tabla 21).

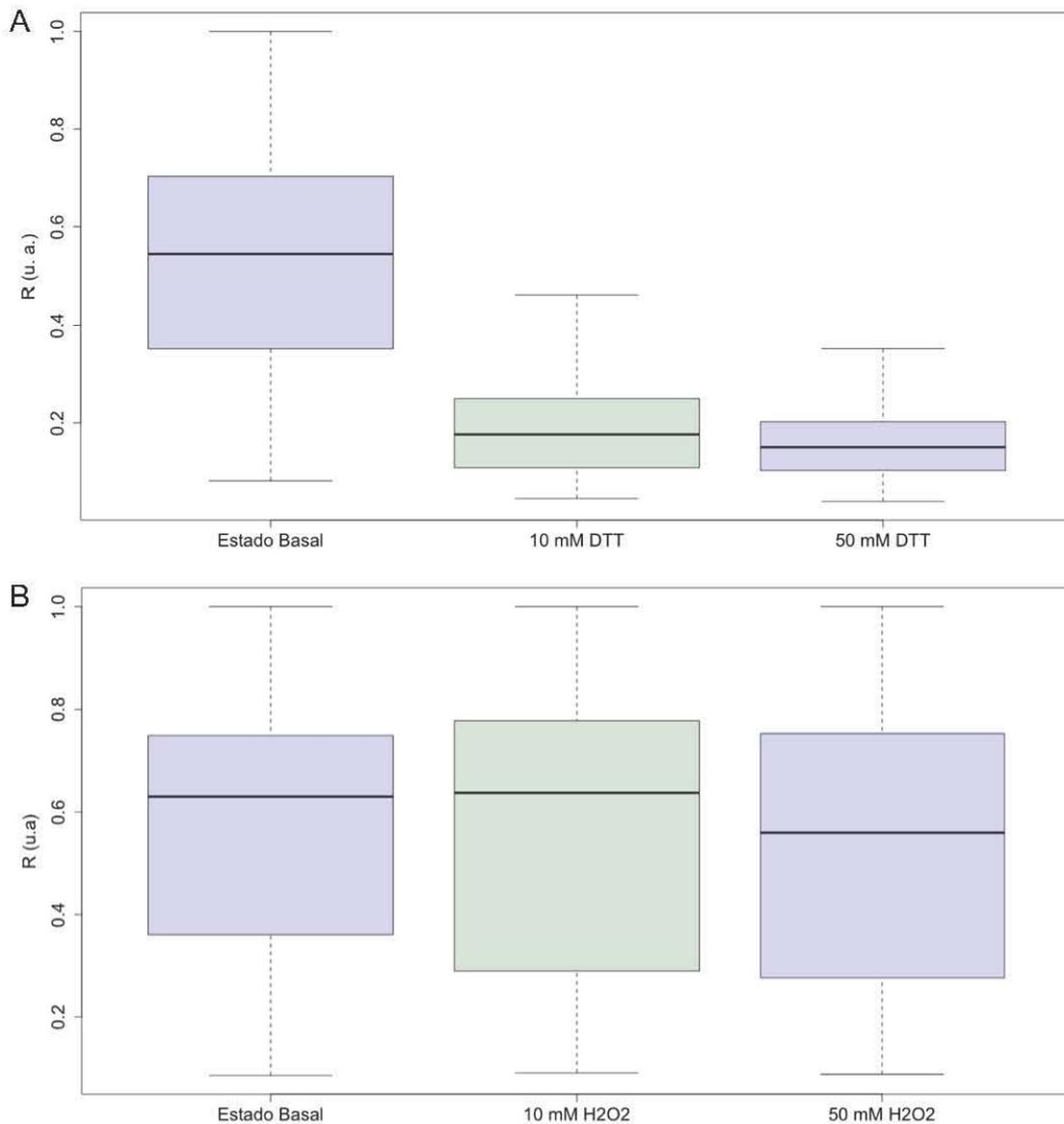


Figura 32. Límites de mínima y máxima reducción de Golgi. A) Máxima reducción añadiendo DTT (Potencial redox < -320 mV). B) Máxima oxidación añadiendo H₂O₂ (Potencial redox > -240 mV).

Adicionalmente, se realizó una relación de los valores de R por pixel de cada imagen de la serie de tiempo, con el objetivo de visualizar la respuesta del sistema a los cambios redox en el tiempo y el espacio. En la Figura 33 se muestra un instante del campo en el estado basal y, a su derecha, imágenes después de haber añadido DTT o H₂O₂. Resulta interesante apreciar a detalle la heterogeneidad celular en el estado basal en las series de tiempo generados a partir de este estudio. El material digital se adjunta a este documento.

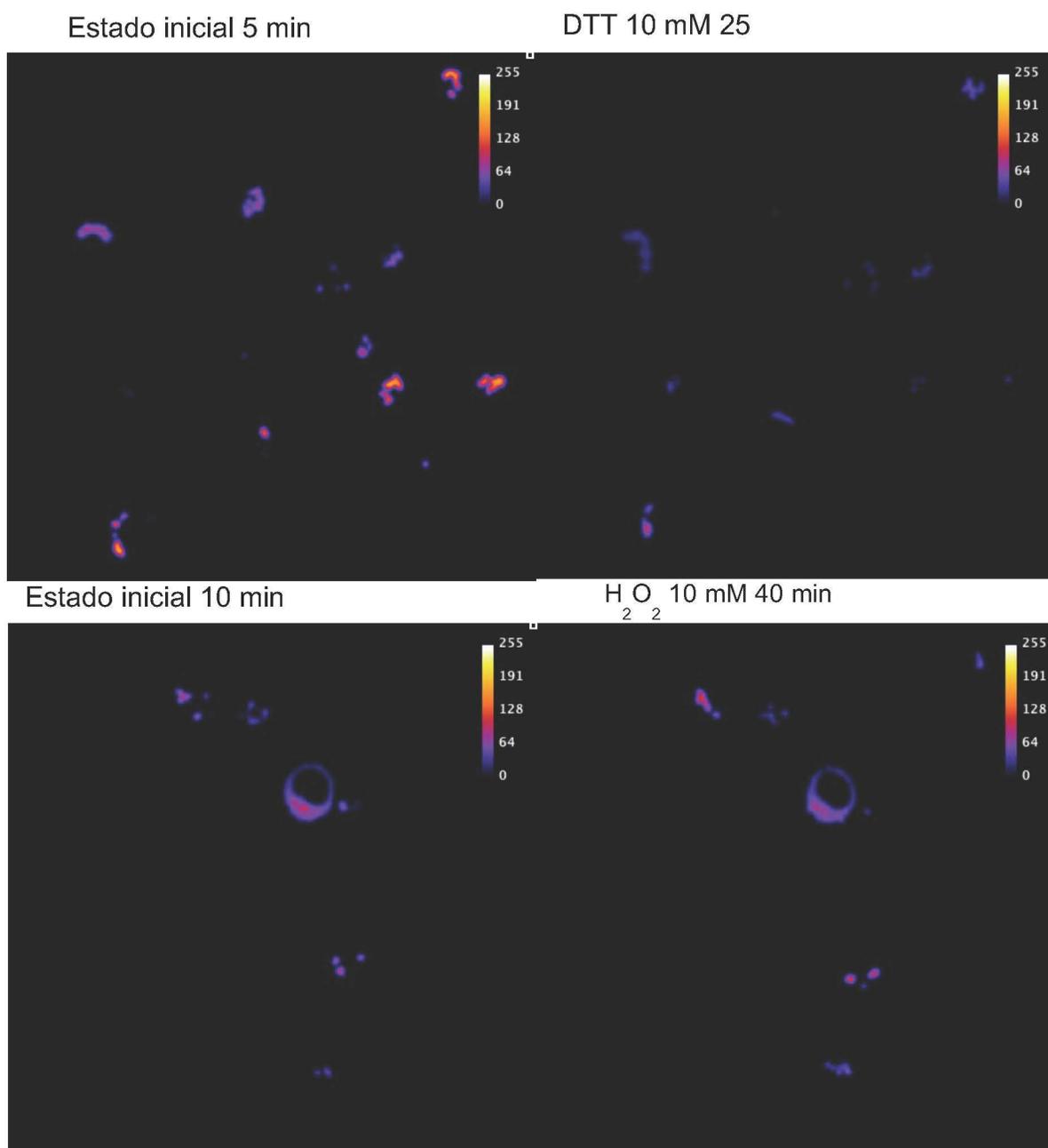


Figura 33. Profundidad de pixel multiplicada por el cociente R resultante en las regiones seleccionadas a partir de la segmentación. La escala en la esquina superior de cada imagen señala el valor más reducido roGFP2 en azul (0) y el valor más oxidado en amarillo (255).

Con el objetivo de interpretar los respectivos cambios de manera eficiente, el valor medio de cada conjunto en las gráficas de cajas de la Figura 32 se dividió entre el estado basal correspondiente, dando como resultado la relación R/R_0 en la Figura

34. Esto sugiere que el complejo de Golgi de células CHO tiene un estado redox basal oxidante, cercano a -240 mV, que podría estar implicado en mantener los puentes disulfuro de las proteínas, que para el caso del IgG es sumamente importante (Dionne *et al.* 2017).

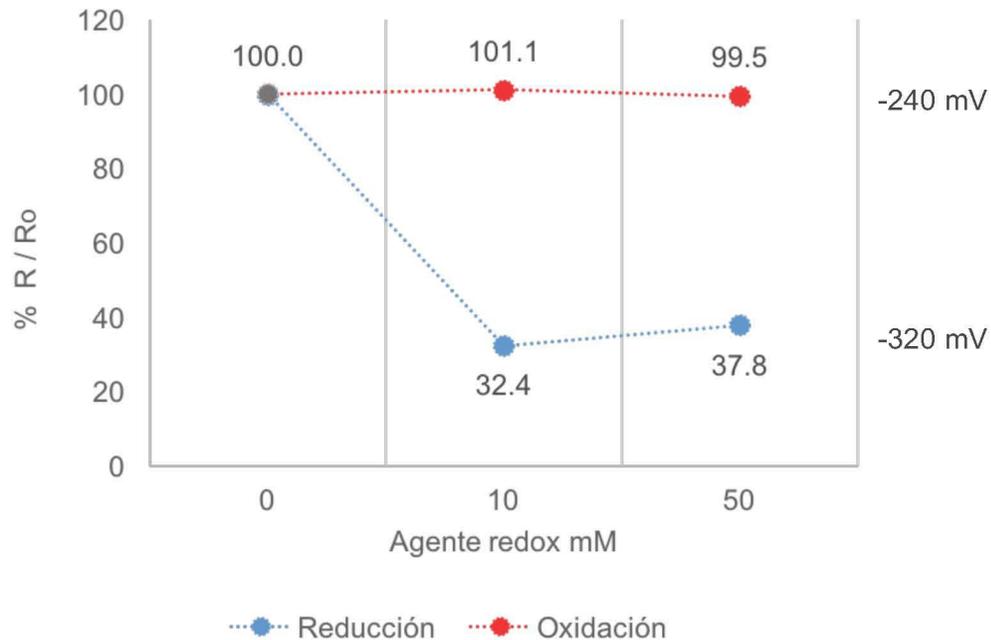


Figura 34. Cambio en R media con respecto al estado basal.

Particularmente, se ha documentado que durante la diferenciación de células B para la producción de IgG, la generación de ERO se incrementa por diferentes mecanismos (Enyedi *et al.* 2010; Fedyk y Phipps 1994; Masciarelli *et al.* 1995; Moon *et al.* 2006; Reth *et al.* 2002; Zangar *et al.* 2004), lo que conlleva a una remodelación de la homeóstasis celular, con la producción de enzimas antioxidantes como tiorredoxina oxido reductasa y heme-oxigenasa 1 (Vené *et al.* 2010) lo cual podría propiciar el ambiente oxidante necesario para estabilizar los puentes disulfuro del IgG, necesarios para mantener su ensamblaje. Sin embargo, interesa aún más saber qué es lo que ocurre en células no especializadas productoras de una proteína recombinante. En estudios realizados por Koritzinsky *et al.* (2013), señalan que la N-glicosilación, el corte de glicanos, el transporte

entre RE y Golgi y la glicosilación compleja en Golgi, son procesos dependientes de oxígeno, ya que al producir las proteínas hemaglutinina y LDLR (por sus siglas en inglés, *low-density lipoprotein receptor*) en líneas celulares de humano bajo condiciones de anoxia, éstas muestran defectos en la formación de puentes disulfuro y glicosilación. A pesar de que el análisis de las especies que participan en el control de la respuesta redox en Golgi permanece incipiente, estudios recientes en células de hoja de tabaco, han demostrado la presencia de una enzima tipo glutatión peroxidasa (GPXL3) en la vía secretora, predominantemente localizada en Golgi (Attacha *et al.* 2017). Lo anterior sugiere que existe una o varias especies oxidantes que juega un papel importante para el mantenimiento de puentes disulfuro de las proteínas durante su tránsito por la vía secretora, y que a su vez tiene enzimas preparadas para contender el exceso de estas especies oxidantes. La metodología mostrada para determinar el potencial redox en células CHO, aporta herramientas para evaluar este escenario en vivo en células de mamífero y conocer su respuesta ante situaciones que perturben la homeóstasis celular.

7. CONCLUSIONES.

El presente estudio generó información sobre eventos de la dinámica molecular intracelular inducidos por cambios en el potencial redox, que no han sido totalmente entendidos hasta ahora. Primeramente, a partir del análisis experimental desarrollado *in vitro*, se concluye que el potencial redox reductor -316 mV (10 mM DTT), causa un relajamiento de la estructura terciaria del IgG1 y la reducción parcial de sus puentes disulfuro, manteniendo la unión de sus cadenas pesadas. Se observó menor sialidación en el IgG1 sometido al potencial redox reductor que en el IgG1 sialidado a un potencial redox no reductor (TBS >-240 mV), contrario a lo esperado. Aunque los ensayos de sialidación de un N-glicano marcado, revelaron que el potencial redox reductor afecta la actividad de la sialiltransferasa, no se puede precisar si la disminución de la sialidación del IgG1 es por el efecto negativo de las condiciones reductoras sobre la sialiltransferasa, o se suma a que estas condiciones afectaron las características del sustrato aceptor haciéndolo menos afín a la sialiltransferasa.

Finalmente, se encontró que el equilibrio redox basal del Golgi en células CHO es cercano al límite oxidante detectado por la proteína sensora roGFP2 (-240 mV), lo cual podría ser fundamental para mantener los puentes disulfuro de proteínas durante su tránsito por la vía secretora. roGFP2 fue totalmente reducida con 10 mM DTT y totalmente oxidada con 10 mM H₂O₂. Su respuesta ante estas dos condiciones redox se estudió mediante la adquisición de imágenes durante una hora, lo que permitió establecer tres etapas de equilibrio. El análisis de las imágenes adquiridas exigió el desarrollo de un algoritmo para la selección de las áreas correspondientes a la fluorescencia de roGFP2 y posteriormente, para extraer y procesar la información contenida en los pixeles seleccionados. Esto dio como resultado una nueva herramienta que permite el cálculo sistematizado del cociente R a partir del análisis de cualquier conjunto de imágenes.

8. PERSPECTIVAS

Futuros esfuerzos son necesarios para abundar en el estudio del potencial redox en la sialidación con otras especies redox naturales como H_2O_2 , glutatión y cisteínas, e incluso de especies inorgánicas reductoras que no puedan realizar el rompimiento de puentes disulfuro, tales como ferrocianuro, y analizar su efecto en la estructura del IgG1 y función de la sialiltransferasa, de manera independiente. Después de todo lo anterior, resultaría interesante explorar los cambios en la estructura del IgG a través de otras metodologías como dicroísmo circular y fluorescencia de ANS para encontrar cambios en la estructura secundaria del IgG1, así como diferencias entre exposición de parches hidrofóbicos por efecto del cambio en el potencial redox. Adicionalmente resultaría interesante, separar por HPLC los péptidos generados después de la incubación del IgG1 en condiciones reductoras y si es posible, purificar la fracción correspondiente a las cadenas pesadas unidas para evaluar el cambio de su estructura terciaria y la sialidación del N-glicano. Se propone también, determinar la sialidación del IgG1 después de retirar el DTT de la solución.

También es importante conocer la respuesta del potencial redox en Golgi ante eventos potenciales de estrés como limitación de oxígeno, cambios de pH y temperatura, presentes durante el proceso de producción en biorreactores a gran escala y entender su asociación con las características post-traduccionales de la proteína recombinante, como su N-glicosilación *in vivo*.

9. REFERENCIAS.

- Ahmed A, Giddens J, Pincetic A, Lomino J, Ravetch J, Wang L, Bjorkman P (2014) Structural characterization of anti-inflammatory immunoglobulin G Fc proteins, *J Mol Biol* 426 (18), 3166–79; doi:10.1016/j.jmb.2014.07.006.
- Amand MM, Radhakrishnan D, Robinson AS, Ogunnaike BA. (2014) Identification of Manipulated Variables for a Glycosylation Control Strategy. *Biotechnol Bioeng*, 111 (10), 1957–1970; doi:10.1002/bit.25251.
- Anken E, Braakman I (2008) Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 40 (4), 191-228.
- Anken E, Romijn E, Maggioni C, Mezghrani A, Sitia R, Braakman I, Heck A (2003) Sequential waves of functionally related proteins are expressed when b cells prepare for antibody secretion. *Immunity*, 18, 243–253.
- Attacha S, Solbach D, Bela K, Moseler A, Wagner S, Schwarzländer M, Aller I, Müller SJ, Meyer AJ. (2017) Glutathione peroxidase-like enzymes cover five distinct cell compartments and membrane surfaces in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, 40 (8), 1281-1295. doi: 10.1111/pce.12919.
- Austin C, Wen X, Gazzard L, Nelson C, Scheller R, Scales S (2005) Oxidizing potential of endosomes and lysosomes limits intracellular cleavage of disulfide-based antibody–drug conjugates. *Proc Natl Acad Sci*, 102 (50), 17987–17992.
- Biolabs N (2017) pH vs temperature for Tris buffer | NEB. [online] Neb.com. Disponible en: <https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/ph-vs-temperature-for-tris-buffer>.
- Brookes P, Yoon Y, Robotham J, Anders M, Sheu S, (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol- Cell Ph*, 287, C817–C833.
- Bujacz A (2012) Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol. Crystallogr*, 68, 1278-1289.
- Cline D, Redding S, Brohawn S, Psathas J, Schneider, Thorpe C. (2004) New water-soluble phosphines as reductants of peptide and protein disulfide bonds: reactivity and membrane permeability. *Biochem*, 43, 15195-15203.
- Crane F, Sun I, Sun E (1993) The essential functions of coenzyme Q. *Clin Investig*, 71, S55- S59.
- Crockett MI, Bebbington CR, Yarranton GT. (1990) High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese Hamster Ovary cells using glutamine synthetase gene amplification. *Nat Biotechnol*, 8 662-667; doi:10.1038/nbt0790-662
- Costa, Ana Rita, Joanne Withers, Maria Elisa Rodrigues, Niaobh McLoughlin, Mariana Henriques, Rosário Oliveira, Pauline M Rudd, Joana Azeredo. (2013) The Impact of Cell Adaptation to Serum-Free Conditions on the Glycosylation Profile of a Monoclonal Antibody Produced by Chinese Hamster Ovary Cells. *New Biotech*, 30 (5), 563–72; doi:10.1016/j.nbt.2012.12.002.
- Dionne B, Mishra N y Butler M. (2017) A low redox potential affects monoclonal antibody assembly and glycosylation in cell culture. *J Biotechnol*, 246, 71-80.
- Dooley CT, Dore TM, Hanson GT, Jackson WC, Remington SJ, Tsien RY. (2004) Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem*, 279 (21), 22284–93; doi:10.1074/jbc.M312847200.
- Durocher Y, Butler M (2009) Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol*, 20, 700–707.
- Enyedi B, Várnai P, Geiszt M. (2010) Redox state of the endoplasmic reticulum is controlled by Ero1L-alpha and intraluminal calcium. *Antioxid Redox Signal*, 13, 721–729.
- Fedyk ER, Phipps RP. (1994) Reactive oxygen species and not lipoxygenase products are required for mouse B-lymphocyte activation and differentiation. *Int J Immunopharmacol*, 16, 533–546.
- Feige M, Hendershot L, Buchner J (2010) How antibodies fold. *Trends Biochem Sci*, 35(4), 189–198.

- Fischer S, Handrick R, Otte K (2015) The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnol Adv*, 33, 1878–1896.
- Ghirlando R, Lund J, Goodall M, Jefferis R. (1999) Glycosylation of human IgG-Fc: influences on structure revealed by differential scanning micro-calorimetry. *Immunol Lett*, 68 (1), 47–52. doi:10.1016/S0165-2478(99)00029-2.
- Go YM, Jones D (2008) Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta*, 1780, 1273–1290.
- Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O (2015) Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol*, 6, 260–271.
- Grainger RK, James DC (2013) CHO cell line specific prediction and control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation. *Biotechnol Bioeng*, 110 (11), 2970-2983; doi 10.1002/bit.24959
- Guile GR, Rudd PM, Wing DR, Prime SB, Dwek RA. (1996) A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Anal Biochem*, 240, 210–226.
- Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi R, Tsien RY, Remington SR. (2004) Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem*, 279, 13044–13053.
- Hassinen A, Kellokumpu S. (2014) Organizational interplay of golgi N-glycosyltransferases involves organelle microenvironment-dependent transitions between enzyme homo- and heteromers. *J Biol Chem*, 289 (39), 26937–26948.
- Hevehan, D.L., Miller, W.M. (1999) Miller-Hipoxia Encyclopedia. *Encyclopedia of Bioprocess Technology, Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. Flickinger MC, Drew SW, editors. New York: John Wiley & Sons.
- Hirano Y, Suzuki T, Matsumoto T, Ishihara, Y, Takaki Y, Kono M, Dohmae N, y Tsuji S. (2012) Disulphide linkage in mouse ST6Gal-I: determination of linkage positions and mutant analysis. *J. Biochem*, 151, 197–203.
- Hongcheng L, Chumsae C, Gaza-Bulseco G, Goedken E. (2010) Domain-level stability of an antibody monitored by reduction, differential alkylation, and mass spectrometry analysis. *Anal Biochem*, 400, 244–250.
- Hutterer KM, Hong RW, Lull J, Zhao X, Wang T, Pei R, Le ME, Borisov O, Piper R, Liu YD, Petty K, Apostol I, Flynn GC. (2013) Monoclonal antibody disulfide reduction during manufacturing: Untangling process effects from product effects. *Mabs*, 5 (4), 608–613.
- Hyun D, Lee M, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Halliwell B, Jenner P (2002) Effect of wild-type or mutant parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome. *J. Biol. Chem*, 277, 28572–28577.
- IUPAC. (2006) Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compilado por A. D. McNaught y A. Wilkinson. *Blackwell Scientific Publications, Oxford* (1997). Versión XML on-line corregida <http://goldbook.iupac.org> (2006-) creada por M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; actualizada y compilado por A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8.
- Jassal R, Jenkins N, Charlwood J, Camilleri P, Jefferis R, Lund J. (2001) Sialylation of human IgG-Fc carbohydrate by transfected rat α 2,6-Sialyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun*, 286 (2), 243–49; doi:10.1006/bbrc.2001.5382.
- Jefferis R. (2009) Recombinant antibody therapeutics: The impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends Pharmacol Sci*, 30 (7), 356–362; doi:10.1016/j.tips.2009.04.007.
- Jiang Z, Hu Z, Zeng L, Lu W, Zhang H, Li T, Xiao H (2011) The role of the Golgi apparatus in oxidative stress: is this organelle less significant than mitochondria? *Free Rad Biol Med*, 50, 907–917.
- Kakuta Y, Okino N, Kajiwara H, Ichikawa M, Takakura Y, Ito M, Yamamoto T. (2008) Crystal structure of *Vibrionaceae Photobacterium* sp. JT-ISH-224 α 2,6-sialyltransferase in a ternary complex with donor product CMP and acceptor substrate lactose: catalytic mechanism and substrate recognition. *Glycobiol*, 18 (1), 66–73.
- Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch J (2006). Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science*, 313, 670-673.

- Kayser V, Chennamsetty N, Voynov V, Helk B, Trout BL. (2010) Tryptophan-tryptophan energy transfer and classification of tryptophan residues in proteins using a therapeutic monoclonal antibody as a model. *J Fluoresc*, 21, 275–288; doi 10.1007/s10895-010-0715-0.
- Kennard M, Goosney D, Monteith D, Roe S, Fisher D y Mott J (2009). Auditioning of CHO host cell lines using the artificial chromosome expression (ACE) technology. *Biotechnol Bioeng*, 104, 526-539.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nat*, 392, 605-608.
- Koritzinsky M, Levitin F, Beucken T, Rumantir R, Harding N, Chu K, Boutros P, Braakman I, Wouters B. (2013) Two phases of disulfide bond formation have differing requirements for oxygen. *J Cell Biol*, 203(4): 615–627; doi: 10.1083/jcb.201307185.
- Kubo S, Kitami T, Noda S, Shimura H, Uchiyama Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y y Hattori N. (2001) Parkin is associated with cellular vesicles. *J Neurochem*, 78,42-54.
- Kuhn B, Benz J, Greif M, Engel A, Sobekb H, Rudolph M. (2013) The structure of human α -2,6-sialyltransferase reveals the binding mode of complex glycans. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 69(9),1826–1838.
- Lara AR, Galindo E, Ramírez OT, Palomares LA. (2006) Living with heterogeneities in bioreactors living with heterogeneities in bioreactors. *Mol Biotechnol*, 34 (3), 355-381.
- Li Q, Lau A, Morris T, Guo L, Fordyce C Stanley E. (2004) A syntaxin 1, G α_o , and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: Analysis by quantitative Immunocolocalization. *J Neurosci*, 24(16), 4070–4081.
- Lin N., Mascarenhas J, Sealover NR, George HJ, Brooks J, Kayser K. (2015) Chinese Hamster Ovary (CHO) host cell engineering to increase sialylation of recombinant therapeutic proteins by modulating sialyltransferase expression. *Biotechnol Prog*, 31 (2), 334-346; doi 10.1002/btpr.2038
- Liu F-F, Ji L, Zhang L, Dong X-Y, Sun Y (2010). Molecular basis for polyol-induced protein stability revealed by molecular dynamics simulations. *J. of Chem Phys*, 132 (22), 225103-1:9.
- López-Meza J, Araíz-Hernández D, Carrillo-Cocom L, López-Pacheco F, Rocha-Pizaña M, Alvarez M. (2016) Using simple models to describe the kinetics of growth, glucose consumption, and monoclonal antibody formation in naive and infliximab producer CHO cells. *Cytotechnol*, 68(4), 1287-300; doi: 10.1007/s10616-015-9889-2.
- Masciarelli S, Sitia R. (1995). Building and operating an antibody factory: redox control during B to plasma cell terminal differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1783, 578–588.
- Maeda Y. (2015) pH control in golgi apparatus and congenital disorders of glycosylation. *Glycoscience: Biology and Medicine, Springer Japan*. 111, 921-925.
- Manders E, Verbeek FJ y Aten JA. (1993) Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc*. 169 (3), 375-382.
- Maroz A, Anderson R, Smith R, Murphy M (2009) Reactivity of ubiquinone and ubiquinol with superoxide and the hydroperoxyl radical: implications for in vivo antioxidant activity. *Free Rad Biol Med*, 46, 105–109.
- Meng L, Forouhar F, Thieker D, Gao Z, Ramiah A, Moniz H, Xiang Y, Seetharaman J, Milaninia S, Su M, Bridger R, Veillon L, Azadi P, Kornhaber G, Wells L, Montelione G, Woods R, Tong L, Moremen K. (2013) Enzymatic basis for N-glycan sialylation. Structure of rat α 2,6-sialyltransferase (st6gal1) reveals conserved and unique features for glycan sialylation. *J Biol Chem*, 228 (48), 34680-34698.
- Mesecke N, Spang A, Deponte M Herrmann J (2008) A novel group of glutaredoxins in the cis-golgi critical for oxidative stress resistance. *Mol Biol Cell*, 19, 2673–2680.
- Meyer AJ, Dick T. (2010) Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid Redox Signal*, 13 (5), 621–650; doi:10.1089/ars.2009.2948.
- Meyer AJ, Brach T, Marty L, Kreye S, Rouhier N, Jacquot JP, Hell R. (2007) Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J*, 52(5):973-86.
- Moon EY, Lee JH, Oh SJ, Ryu SK, Kim HM, Kwak HS, Yoon WK. (2006) Reactive oxygen species augment B-cellactivating factor expression. *Free Radic Biol Med*, 40, 2103–2111.

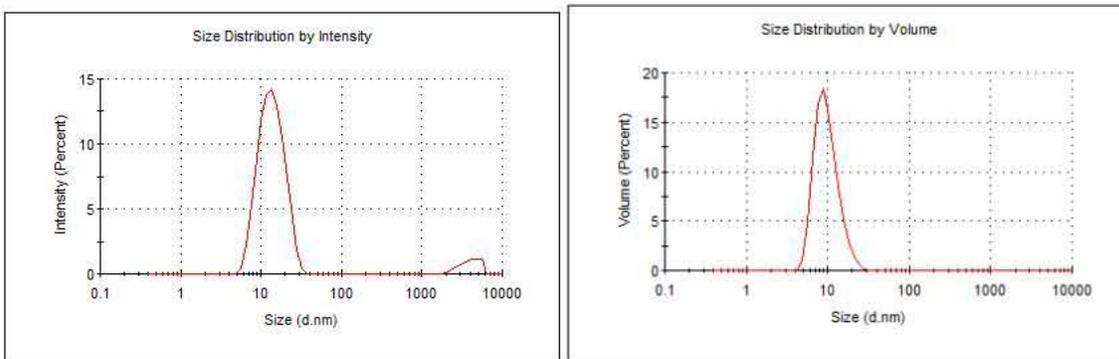
- Nyquist S, Barr R, Morré D (1970) Ubiquinone from rat liver Golgi apparatus fractions. *Biochim, Biophys Acta*, 208, 532-534.
- Otsu, N (1979) A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans Sys Man Cyber*, 9, 62-66; doi:10.1109/TSMC.1979.4310076
- Palomares LA, Ramírez OT (2007) Glicosilación de proteínas recombinantes: Importancia y relación con las condiciones de bioproceso. En: Diseño y Producción de Fármacos. E. Juaristi (ed.) *El Colegio Nacional: México*, pp. 95-123; ISBN 978-970-640-356-8.
- Palomares LA, Ramírez OT. (2010) Geometric considerations for bioreactor scale-up. En: The Encyclopedia of Industrial Biotechnology; Flickinger M (ed.), John Wiley and Sons pp. 1-15.
- Pizzo P, Lissandron V, Capitanio P, Pozzan T. (2011) Ca²⁺ signalling in the Golgi apparatus". *Cell Calcium*, 50, 184-192.
- Ponzo, TA, Fields RL, Rashid OM, Salinas YD, Lubelski D, et al. (2012) Cell-type specific expression of the vasopressin gene analyzed by AAV mediated gene delivery of promoter deletion constructs into the Rat SON in vivo. *PloS ONE* 7 (11): e48860; doi: 10.1371/journal.pone.004860
- Potelle S, Klein A y Foulquier F. (2015) Golgi post-translational modifications and associated diseases. *J Inherit Metab Dis*, 38, 741–751; doi 10.1007/s10545-015-9851-7.
- Qian, R., Chen, C., y Colley, K. J. (2001) Location and mechanism of α 2,6-sialyltransferase dimer formation. Role of cysteine residues in enzyme dimerization, localization, activity, and processing. *J. Biol. Chem*, 276, 28641–28649
- Raju, T Shantha. (2008) Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Curr Opin Immunol*, 20 (4), 471–78; doi:10.1016/j.coi.2008.06.007.
- Remington J. (2011) Green fluorescent protein: A perspective. *Protein Sci*, 20(9), 1509-1519; doi: 10.1002/pro.684.
- Reth M. 2002. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol*, 3, 1129–1134.
- Restelli V, Wang MD, Huzel N, Ethier M, Perreault H, Butler M. (2005) The effect of dissolved oxygen on the production and the glycosylation profile of recombinant human erythropoietin produced from CHO cells. *Wiley InterScience*, 94(3), 481-494. doi: 10.1002/bit.20875
- Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM. (2006) Detailed structural analysis of N-glycans released from glycoproteins in SDS-PAGE gel bands using HPLC combined with exoglycosidase array digestions. *Methods Mol Biol*, 347, 125- 143.
- Saphire EO, Parren PW, Pantophlet R, Zwick MB, Morris GM, Rudd PM, Dwek RA, Stanfield RL, Burton DR, Wilson IA (2001). Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science*, 293(5532), 1155-1159.
- Sasaki K y Yoshida H. (2015) Organelle autoregulation—stress responses in the ER, Golgi, mitochondria and lysosome, *J Biochem*, 57(4), 185–195; doi:10.1093/jb/mvv010.
- Serrato J, Palomares LA, Meneses-Acosta A, Ramírez OT (2004) Heterogeneous conditions in dissolved oxygen affect N-glycosylation but not productivity of a monoclonal antibody in hybridoma cultures. *Biotechnol Bioeng*, 88 (2), 176–88; doi:10.1002/bit.20232.
- Schimmel P y Flory P. (1967) Conformational energy and configurational statistics of poly-L-proline. *Chem*, 58, 52-59.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Albert Cardona. (2013) Fiji - an Open source platform for biological image analysis. *Nat Methods*. 9(7), 676-682. doi: 10.1038/nmeth.2019.
- Shi, Helen H, and Chetan T Goudar. (2014) Recent advances in the understanding of biological implications and modulation methodologies of monoclonal antibody N-linked high mannose glycans. *Biotechnol Bioen.*, 111 (10), 1907–1919; doi:10.1002/bit.25318.
- Siegel G, Ermilov E, Pries A, Winkler K, Schmidt A, Ringstad L, Malmsten M, Lindman B. (2014) The significance of lipid peroxidation in cardiovascular disease. *Colloid Surface A*, 442, 173–180.
- Taha M, Lee M. (2010) Interaction of TRIS [tris(hydroxymethyl)aminomethane] and related buffers whit peptide backbone: Thermodynamic characterization. *Phys Chem Chem Phys*, 12, 12840–12850.

- Thies M, Mayer J, Augustine J, Frederick C, Lillie H, Buchner J. (1999) Folding and association of the antibody domain C_H3: prolyl isomerization precedes dimerization. *J. Mol. Biol.* 293, 67-79.
- Vanoevelen J, Dode L, Baelen K, Fairclough R, Missiaen L, Raeymaekers L, Wuytack F (2005). The secretory pathway Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase 2 is a Golgi-localized pump with high affinity for Ca²⁺ ions. *J. Biol. Chem.*, 280, 22800–22808
- Vené R, Delfino L, Castellani P, Balza E, Bertolotti M, Sitia R, Rubartelli A. (2010) Redox remodelling allows and controls B-cell activation and differentiation. *Antioxid Redox Signal*, 13 (8), 1145-1153.
- Vizcaino-Caston I, Wyre C, Overton TW. (2012) Fluorescent Proteins in Microbial Biotechnology: New Proteins and New Applications. *Biotechnol Lett*, 34 (2), 175–86. doi:10.1007/s10529-011-0767-5.
- Wahrheit J., Nicolae A., Heinzle E. (2013) Dynamics of growth and metabolism controlled by glutamine availability in Chinese hamster ovary cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 1771–1783; doi 10.1007/s00253-013-5452-2
- Walsh, Gary. (2014) Biopharmaceutical Benchmarks 2014. *Nat Biotechnol*, 32 (10), 992–1000. doi:10.1038/nbt.3040.
- Washburn N, Schwab I, Ortiz D, Bhatnagar N, Lansing J, Medeiros A, Tyler S, Mekala S, Cochran E, Sarvaiya H, Garofalo K, Meccariello R, Meador JW, Rutitzky L, Schultes BC, Ling L, Avery W, Nimmerjahn F, Manning A, Kaundinya G, Bosques CJ. (2015) Controlled tetra-Fc sialylation of IVIg results in a drug candidate with consistent enhanced anti-inflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(11), E1297–E1306; doi: 10.1073/pnas.1422481112
- Wu Z, Ethen C, Prather B, Machacek M, Jiang W. (2011) Universal phosphatase-coupled glycosyltransferase assay. *Glycobiol*, 21 (6), 727–733.
- Wurm F (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat biotechnol*, 22(11), 1393-1398
- Wright A, Morrison SL. (1997) Effect of glycosylation on antibody function: Implications for genetic engineering. *Trends Biotechnol*, 15 (1), 26–32; doi:10.1016/S0167-7799(96)10062-7.
- Xing Z, Bishop N, Leister K, Li Z. (2010) Modeling kinetics of a large-scale fed-batch CHO cell culture by Markov chain Monte Carlo method. *Biotechnol Prog*, 26(1), 208-19. doi: 10.1002/btpr.284.
- Xu X, Nagarajan H, Lewis NE, Pan S, Cai Z, Liu X, Chen W, Xie M, Wang W, Hammond S, Andersen MR, Neff N, Passarelli B, Koh W, Fan HC, Wang J, Gui Y, Lee KH, Betenbaugh MJ, Quake SR, Famili I, Palsson BO, Wang J. (2011) The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)- K1 cell line. *Nat biotechnol*, 29 (8), 735- 741; doi: 10.1038/ntb.1932.
- Yang M., Dutta C., Tiwari A. (2015) Disulfide-bond scrambling promotes amorphous aggregates in lysozyme and bovine serum albumin. *J Physic Chem*, 119, 3969–3981. doi:10.1021/acs.jpcc.5b00144
- Young, Jamey D. (2013) Metabolic flux rewiring in mammalian cell cultures. *Curr Opin Biotechnol*, 24 (6), 1108–1115; doi:10.1016/j.copbio.2013.04.016.
- Zangar RC, Davydov DR, Verma S. (2004) Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol*, 199, 316–331.
- Zhang Y, Füssel S, Reimer U, Schutkowski M, Fischer G. (2002) Substrate-Based Design of Reversible Pin1 Inhibitors. *Biochem*, 41, 11868-11877.
- Zúñiga FJ, Palomares LA. (2016). El potencial redox intracelular y su importancia en biotecnología. *BioTecnología*, 20 (2), 11-25.

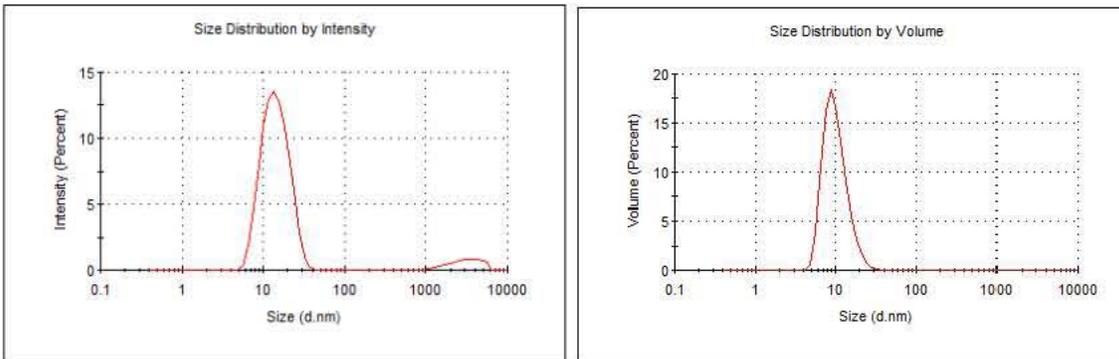
10. ANEXOS.

10.1. Distribución del tamaño de las partículas por tratamiento de IgG1 a distintos potenciales redox.

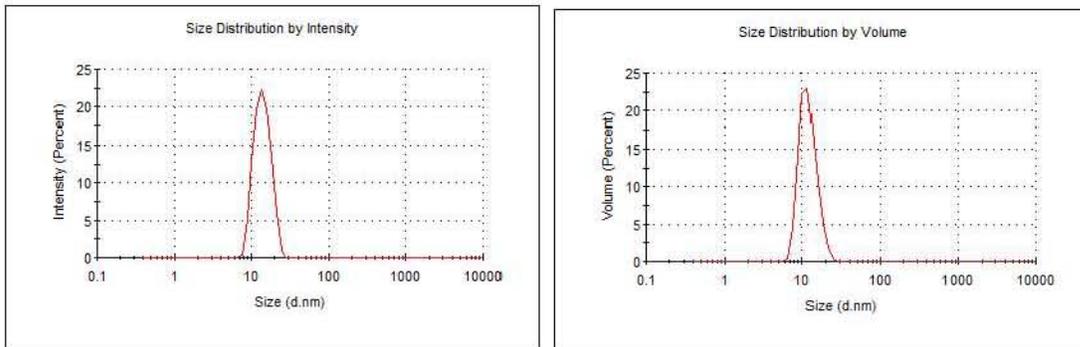
IgG1 antes del tratamiento.



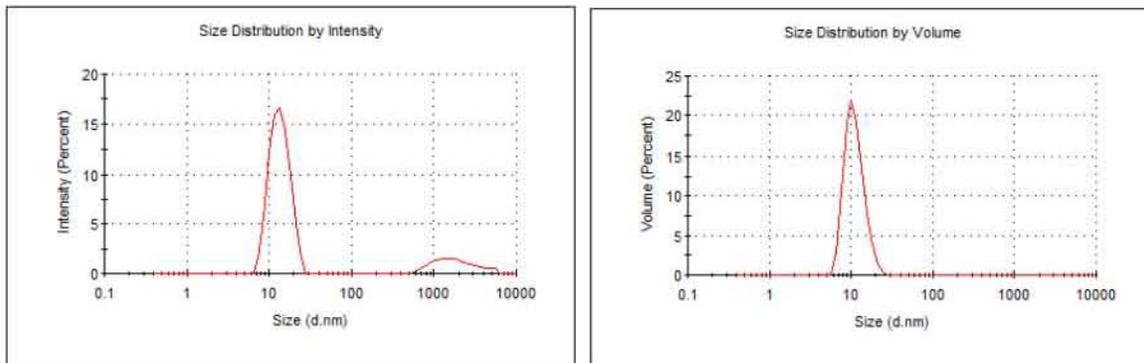
IgG1 después del tratamiento sin DTT, (> -240 mV) 37°C, pH 7.2.



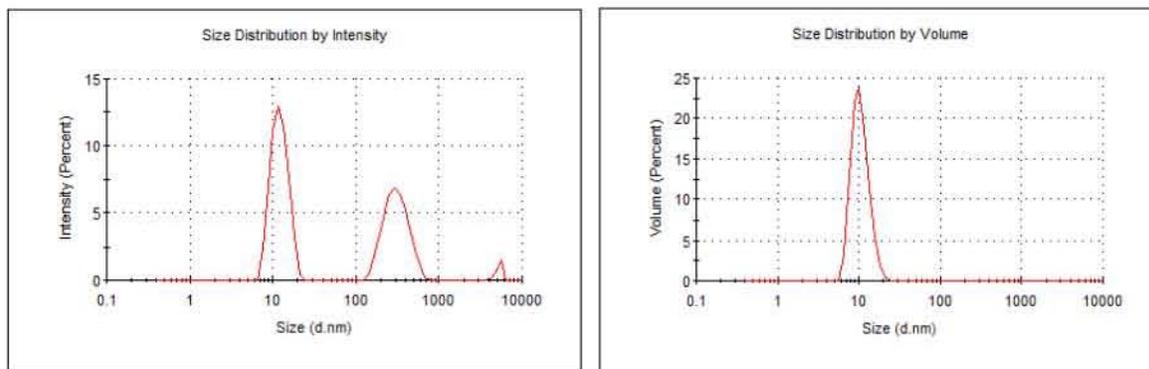
IgG1 después del tratamiento con 1 mM DTT (-292.3 mV), 37°C, pH 7.2.



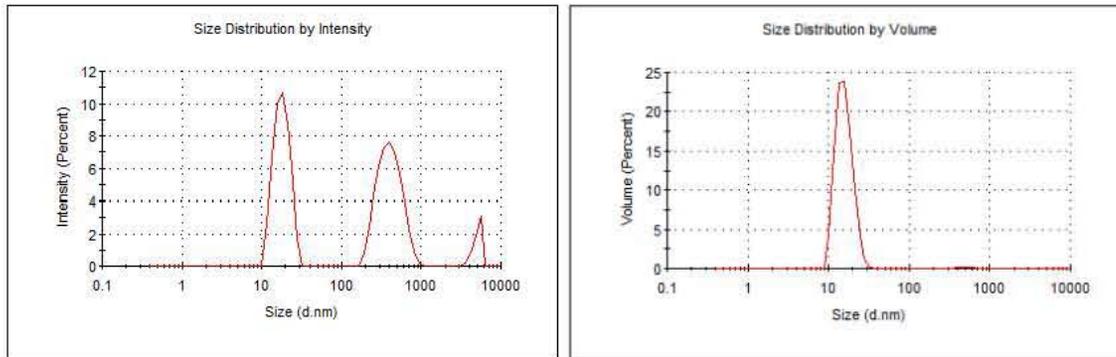
IgG1 después del tratamiento con 10 mM DTT (-316.3 mV), 37°C, pH 7.2.



IgG1 después del tratamiento con 100 mM DTT (< -320 mV), 37°C, pH 7.2.



IgG1 después del tratamiento con 4.5 mM de tiocianato de guanidina, 37°C, pH 7.2.



10.2. Efecto de potencial redox en BSA. Experimento de referencia

Yang *et al.* (2015), describen la formación de agregados amorfos, producto de la desestabilización parcial de puentes disulfuro en proteínas globulares, tales como lisozima y BSA. Ellos observaron a través de microscopía de barrido y fluorescencia intrínseca y extrínseca, que añadiendo diferentes concentraciones de DTT (0 a 100 mM) e incubando a 37°C PBS pH 7.2 por dos semanas, no solo se obtienen partículas de 400 nm \pm 200 nm (agregados amorfos) sino que la cinética de formación de agregados es distinta entre lisozima y BSA. Esto resalta la importancia de la estructura proteica en la respuesta al cambio en el ambiente oxido-reductor y el tiempo necesario para observar un cambio. Como se observa en la Figura 35, a pesar de que el BSA contiene 17 puentes disulfuro y está predominantemente conformado por α -hélices, mientras que el IgG1 tiene 16 puentes disulfuro y está formado por hebras β (Bujacz A. 2012; Feige *et al.* 2009) por ello, se decidió repetir el experimento descrito por Yang *et al* no solo con el buffer PBS pH 7.2, sino también TBS pH 7.2 (25°C) para comparar el efecto del buffer en el diseño experimental.

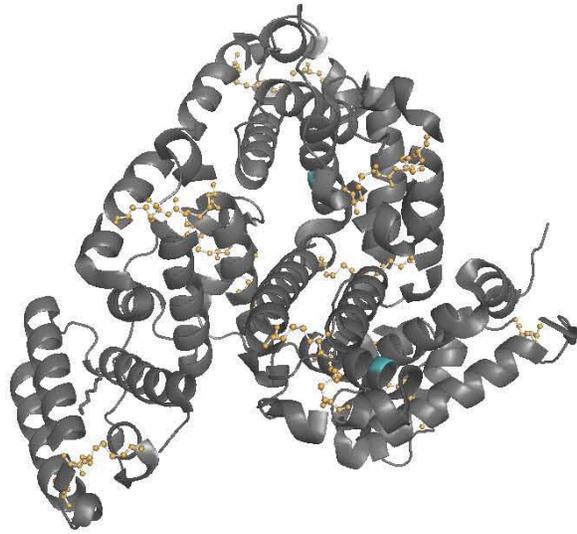


Figura 35. Estructura de BSA. Puentes disulfuro en naranja (esferas con enlaces). Azul celeste triptófanos y rosa intenso tirosinas.

Como resultado del monitoreo del espectro de emisión de triptófanos del BSA, en la Figura 36 se ejemplifica el comportamiento de dos tratamientos. El primero corresponde al BSA en buffer TBS sin DTT (Figura 36-A), los espectros colectados se sobrelapan debido a que la estructura terciaria permanece estable y, por ende, la posición de los aminoácidos aromáticos se mantiene constante. Por el contrario, en la Figura 36-B, los espectros se trasladan a la derecha o izquierda debido a que el ambiente hidrofílico de los fluoróforo disminuye por efecto de la alteración conformacional de la estructura terciaria del BSA. Es difícil comparar la magnitud de los cambios al sobrelapar los espectros de emisión, por ello, se empleó el CME como indicador del cambio o desplegamiento de la estructura proteica. Como resultado, las cinéticas se describen en la Figura 37.

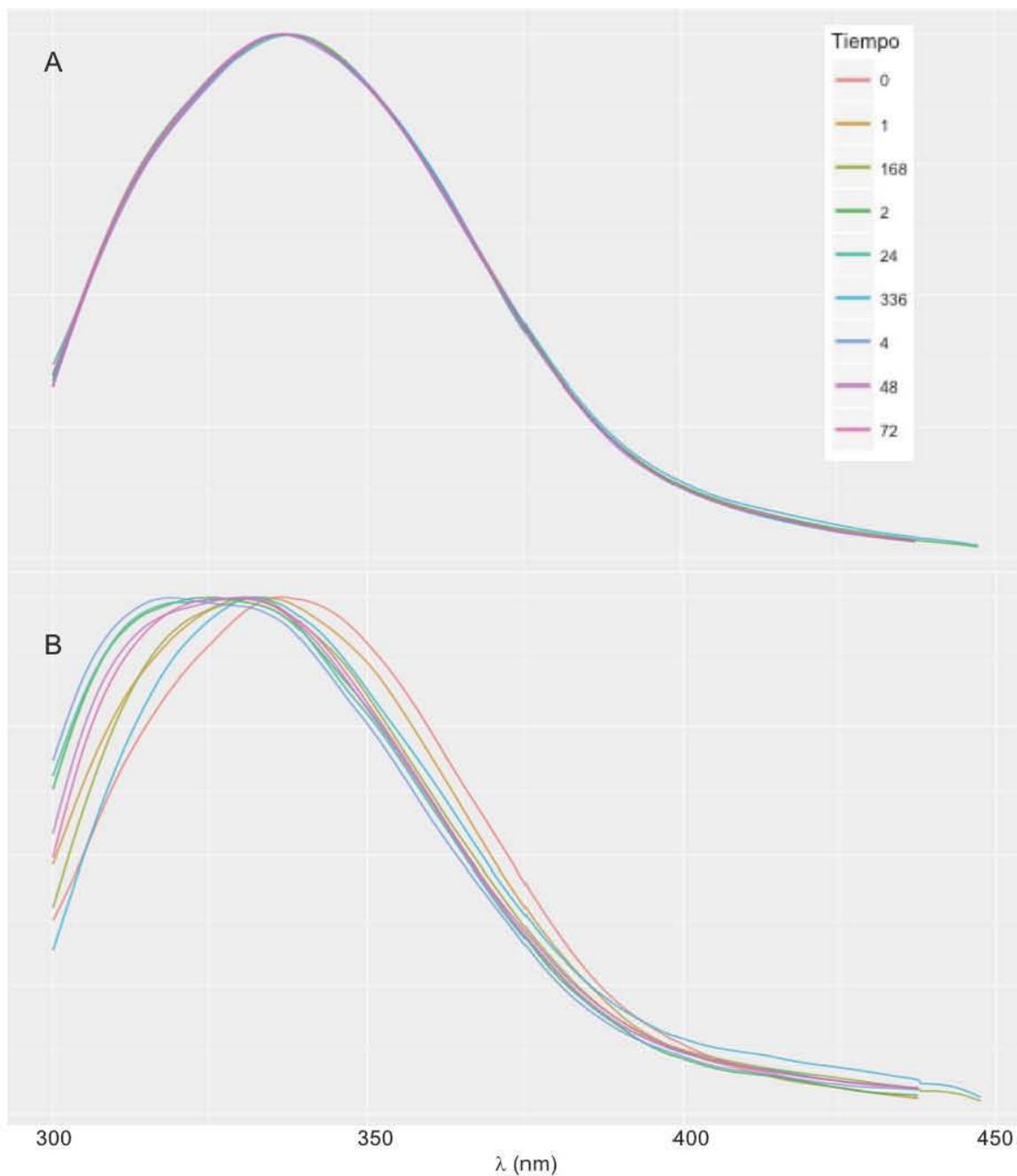


Figura 36. Espectros de emisión de triptófanos de la proteína BSA colectados a lo largo del tiempo. A) BSA en buffer TBS. B) BSA en buffer TBS con DTT 10 mM. En el eje de las ordenadas se muestra la intensidad de fluorescencia normalizada, en el eje de las abscisas la longitud de onda (nm).

Tal como reportó Yang *et al.* (2015) y como se observa en la Figura 37, la distribución de la emisión de los triptófanos del BSA se dirige a longitudes de onda

menores, un comportamiento característico de los triptófanos ubicados en ambientes hidrofóbicos (Kayser y Chennamsetty, 2011), lo cual es comúnmente denominado como una cinética de agregación. Las estructuras resultantes fueron caracterizadas por Yang *et al* como agregados amorfos. Se propone que este fenómeno se originó al reducir los puentes disulfuro fundamentales para mantener el plegamiento del BSA, al exponer las cavidades hidrofóbicas de la proteína, se propicia la formación de enlaces intramoleculares e intermoleculares, para disminuir la entropía generada.

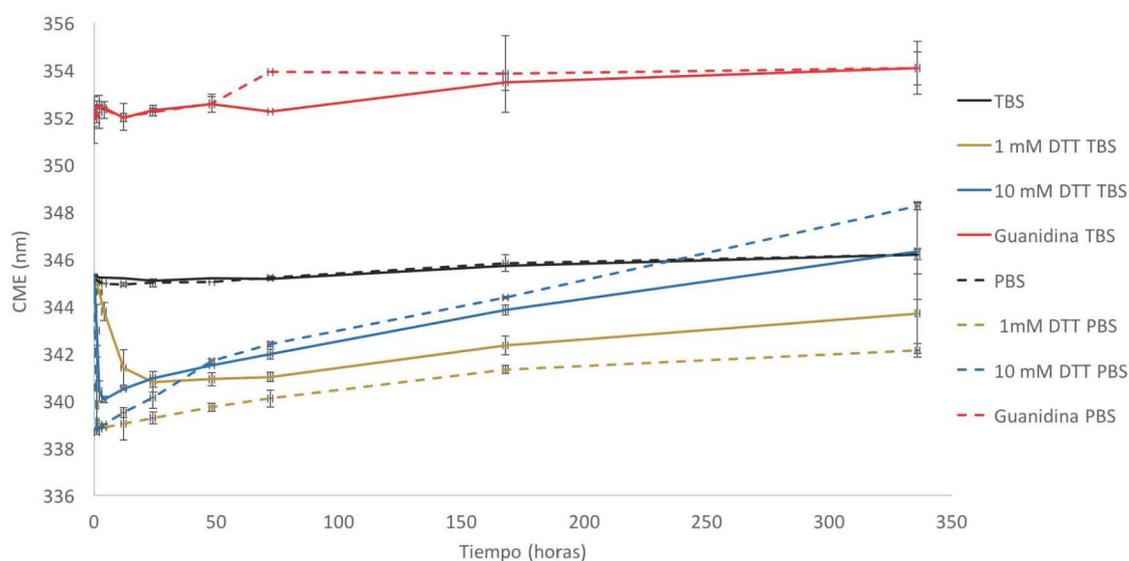


Figura 37. Efecto de DTT en el CME de BSA. Cinética de emisión máxima de triptófanos de BSA. Comparación de cambio de CME usando dos buffers (PBS pH 7.2 y TBS pH 6.91 a 37°C) con distintas concentraciones de DTT. Como control positivo de desdoblamiento se aplicó Guanidina 3.5 M. La línea negra indica BSA en los buffers en ausencia de DTT.

10.3. Cinética de desdoblamiento de IgG en PBS y TBS

Con la finalidad de estandarizar la metodología del monitoreo de fluorescencia intrínseca en el IgG1, se repitió la metodología propuesta por Yang *et al.* con PBS y en TBS (TBS fue el buffer definido para todas las metodologías en este trabajo). Como se muestra en la Figura 38, donde el control totalmente desnaturado se muestra en rojo y el IgG1 en ausencia de DTT en negro, todas las curvas tienden

hacia el control totalmente desnaturalizado, es decir hacia el relajamiento de la estructura terciaria del IgG1. Se observa que el desplegamiento a -316.3 mV es mayor en el buffer PBS que en buffer TBS. Esto puede deberse a que cuando el Tris interacciona con aminoácidos de superficie del IgG1, al igual que otros polioles, ordena las moléculas de la capa de agua que rodea al IgG1, lo cual protege y estabiliza la estructura del IgG1 (Taha y Lee, 2010; Liu *et al.* 2010).

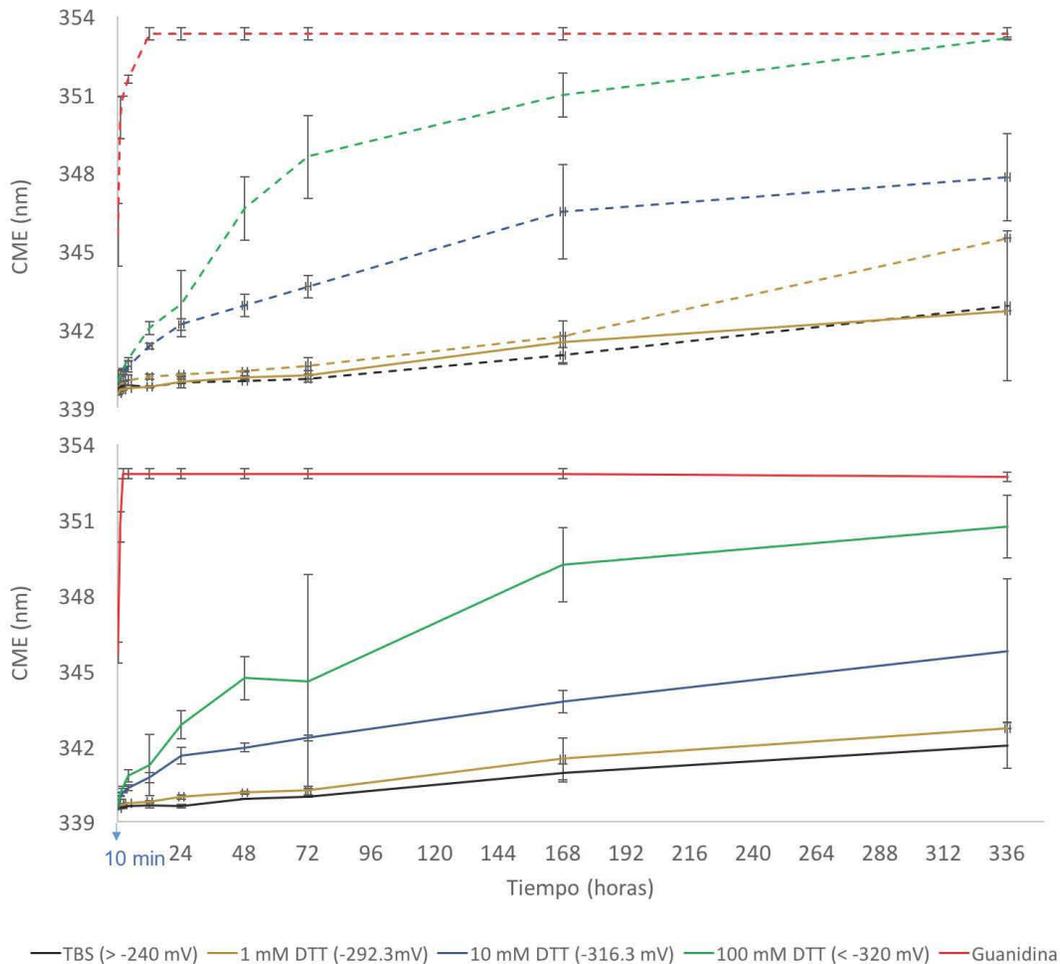


Figura 38. Efecto de DTT en el CME de IgG1. Cinética de emisión máxima de triptófanos en IgG1. Comparación de cambio de CME usando dos buffers de trabajo (PBS pH 7.2 y TBS pH 6.91 a 37°C) con distintas concentraciones de DTT. Como control positivo de desplegamiento se aplicó Guanidina 3.5 M. La línea punteada indica tratamiento en buffer PBS y la línea continua, en TBS.

Como se ilustra en la Figura 39 debe considerarse que el pKa del buffer Tris depende de la temperatura (Biolabs, 2017), al mantener una temperatura de 37°C se midió un pH de 6.84 y no pH 7.2 como se midió a 25°C. Se repitió la cinética de desplegamiento ajustando el pH del buffer TBS a 7.2 a 37°C (Figura 18), encontrando que esta diferencia de pH no contribuyó significativamente en el desplegamiento del IgG1. Los espectros de fluorescencia intrínseca del IgG1 de la cinética realizada a pH 7.2 a 37°C, se muestran en la Figura 40 y pueden compararse con el CME calculado e ilustrado en la cinética de la Figura 16.

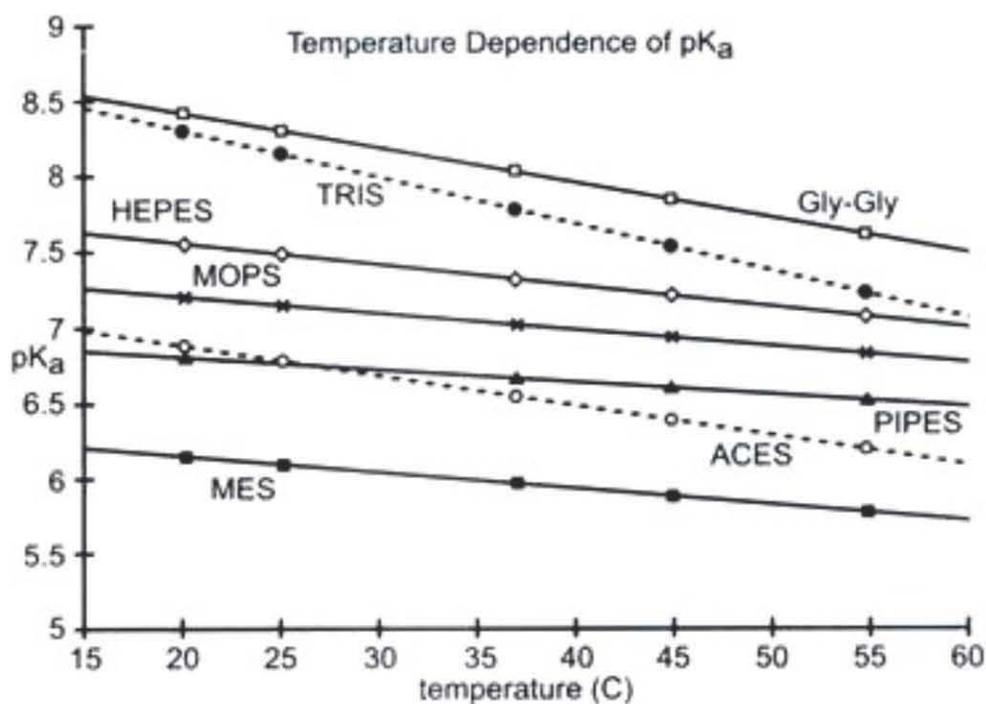


Figura 39. Dependencia de la temperatura del pKa.

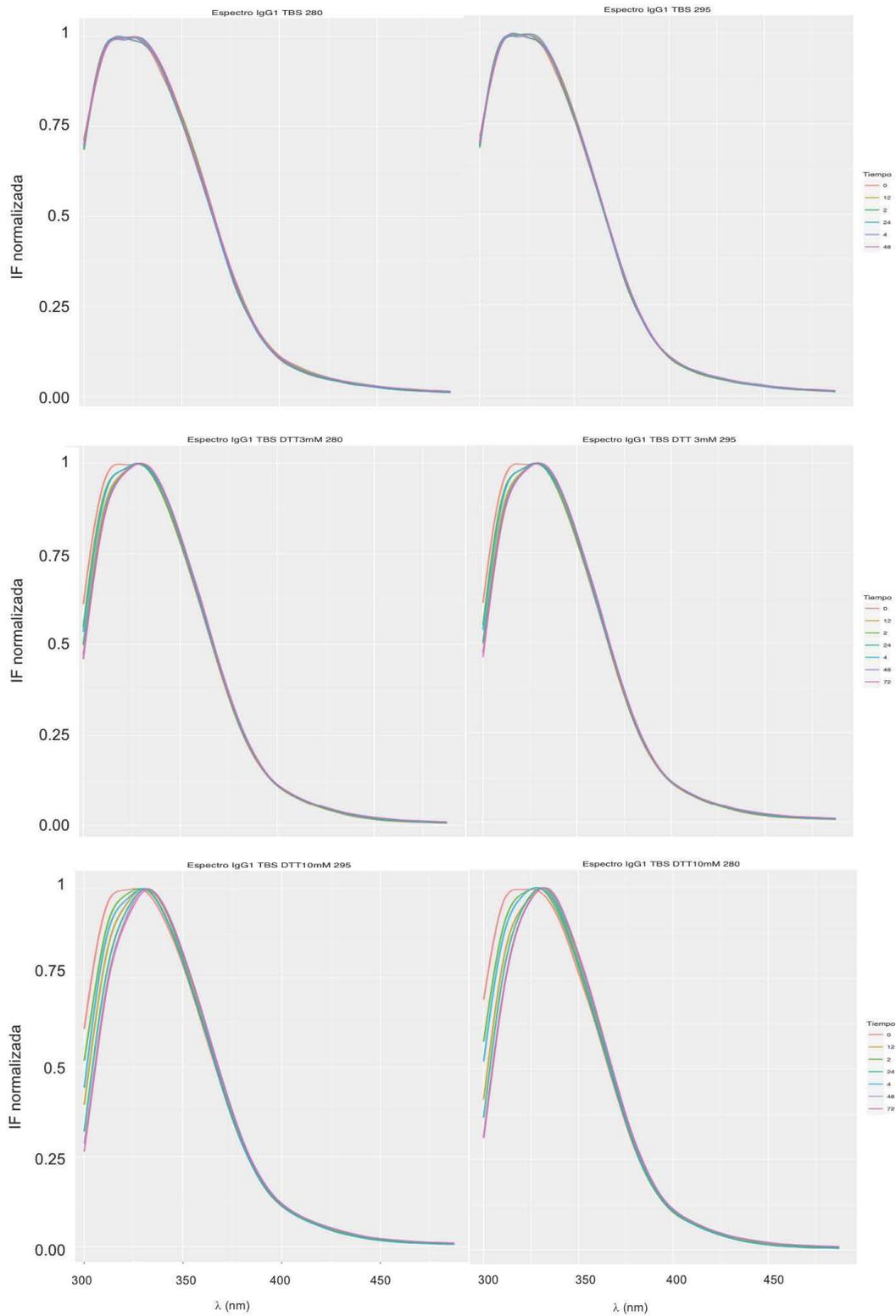


Figura 40. Espectro de emisión de la fluorescencia intrínseca del triptofano bajo condiciones reductoras.

10.4. Construcción del gen *roGFP2_{golgi}*

Partiendo de una PCR de alta fidelidad con los oligos AvrII-NTD y NTD-roGFP2 se obtuvo una secuencia de aproximadamente 130 pb que se denominó "Mega-foward" (MF). En la Figura 41 se observa una banda intensa entre 200 y 100 pb correspondiente a la formación del megaoligo. Se procedió a probar una PCR de alta fidelidad con rampa de T_m (60 a 68°C) para la unión del Mega-foward (codificante del péptido señal) al extremo 5' del gen *roGFP2* y se corrió en un gel de electroforesis de DNA. No se encontró diferencia importante entre estas temperaturas. Como resultado, se observó una banda intensa entre 800 a 900 pb y bandas muy tenues en la parte inferior de la banda principal. Luego se reunió el producto de PCR y se purificó por banda de gel. Este fragmento se ligó al vector pJET1.2 para ampliar el número de copias y obtener más sitios de restricción.

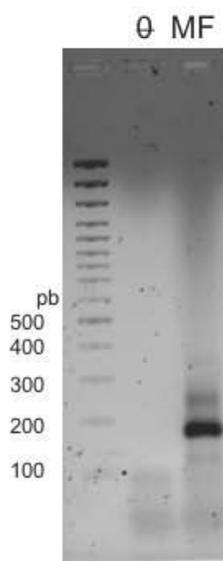


Figura 41. Amplificación de la secuencia del péptido señal a Golgi. Marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb DNA Ladder Thermo Fisher © en primer carril. θ mezcla de reacción de PCR. MF resultado de PCR.

Se confirmó la correcta ligación del inserto en pJET 1.2 en las dos colonias crecidas, como lo demuestra el gel de agarosa de la Figura 42, pues se obtuvo un

producto de PCR abundante amplificando con los oligos Foward pJET y Mini AvrII Fwd del inserto. También se comprobó que la secuencia insertada fuera la correcta al amplificar con los oligos específicos para el inserto (Mini AvrII (fwd) y roGFP2-Bstz17 (rev)) y obtener una banda intensa del peso molecular esperado, logrando así conservar la construcción en un vector seguro y de fácil amplificación, como intermediario para la transferencia al vector destino.

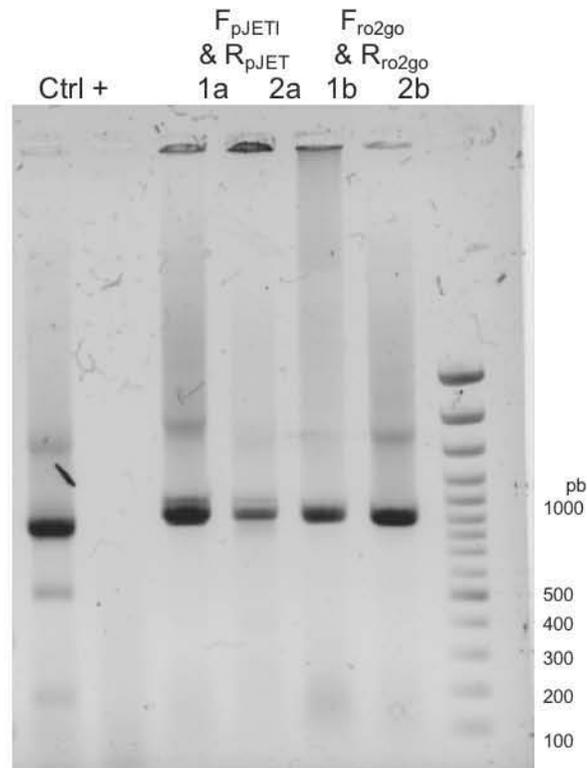


Figura 42. PCR de células de *Escherichia coli* XL1-Blue transformadas con la ligación pJET1.2 (roGFP2golgi). En café se indica la PCR con oligos que comprueban su orientación; Fwd pJET y Fwd Mini AvrII. Y en negro con oligos del inserto.

Clonación de roGFP2_{golgi} en vector para la recombinación en b́acmido.

Se empleó el vector pFBGR-EGFP, que cuenta con el promotor de CMV. Se amplificó el gen roGFP2_{golgi} a partir del plásmido recombinante pJET 1.2-roGFP2_{golgi}, añadiendo los sitios de restricción Pacl en el extremo 5' y copiando el sitio XhoI del vector en el lado 3'. Luego de purificar y cuantificar el producto de PCR, tanto el inserto como el vector (pFBGR-EGFP) se digirieron con las enzimas

XhoI y PacI. Cabe mencionar que la restricción con PacI escinde el gen *EGFP* desde el promotor p10, promotor necesario para la expresión de la proteína en células de insecto, no obstante, se consideró que esto no afectaría nuestro objetivo, pues se requiere la expresión de roGFP2 en células CHO. Posteriormente, se ligaron y transformaron en la cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue. El mapa de restricción teórico del plásmido se observa en la Figura 43.

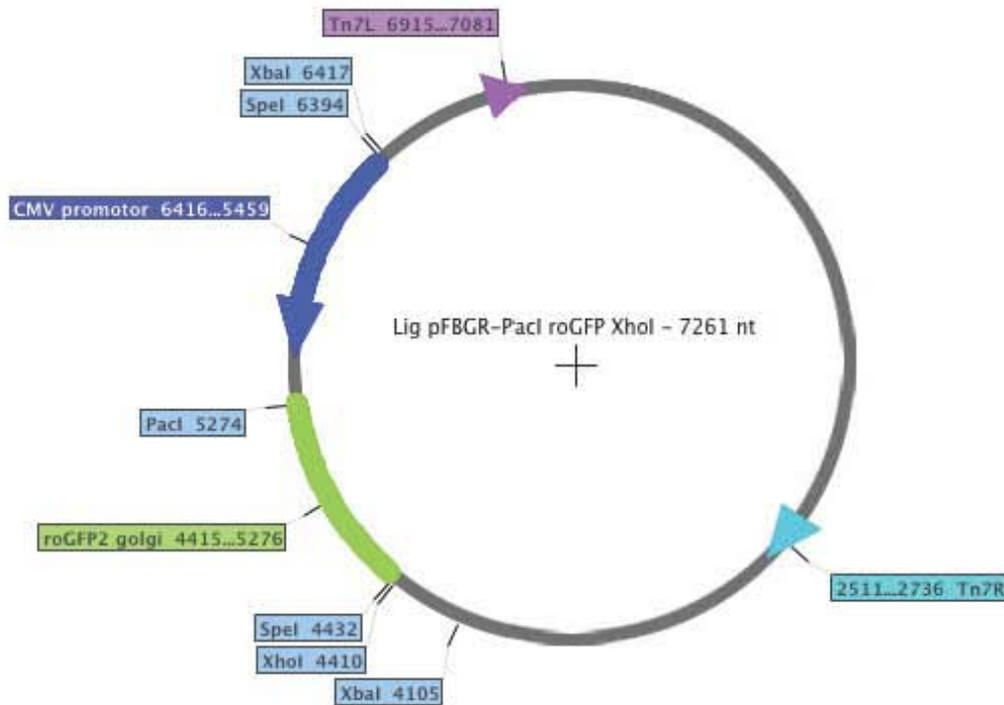


Figura 43. Mapa de restricción del vector pFBGR-EGFP con roGFP2_{golgi}. Software Serial Cloner 2.6.1

Para encontrar la clona productora con la construcción correcta, se realizó PCR de colonia con un oligo del vector pFBGR Rv a (Tabla 2), que amplifica en sentido desde el inicio del CMV y un oligo del inserto, que amplifica desde el extremo 3' del gen. El producto de PCR esperado fue de 2214 pb, como se muestra en la Figura 44.

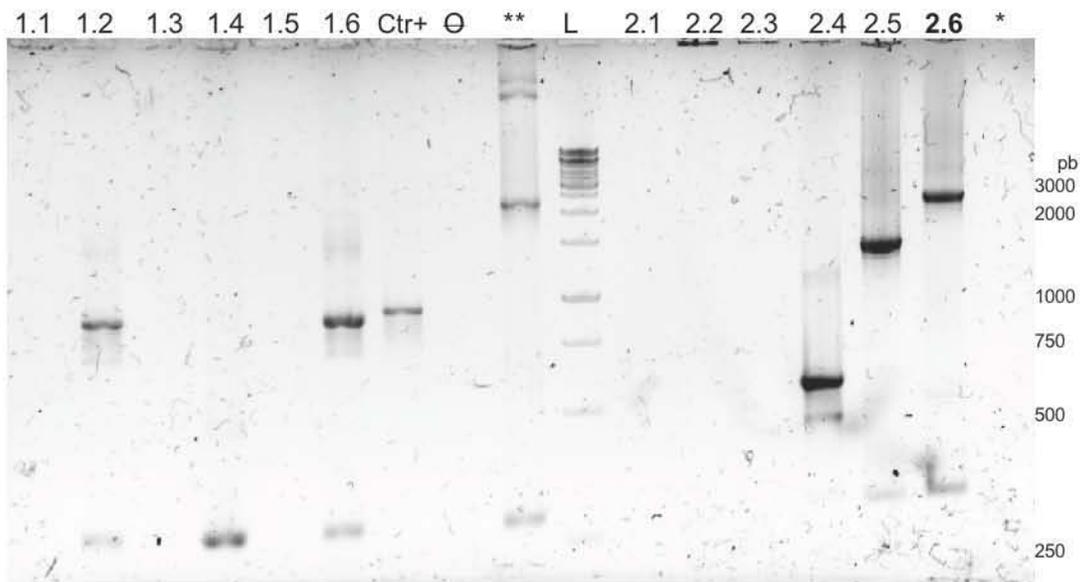


Figura 44. PCR de células de *Escherichia coli* XL1-Blue después de la transformación con la ligación pFBGR- roGFP2_{golgi}. El carril nombrado Ctr+: PCR del plásmido pJET roGFP2 y los oligos del gen roGFP2. Ø corresponde al control de oligos en el cual se evidencia que no existen productos de PCR inespecíficos. ** PCR con vector pFBGR-EGFP. * Mezcla de PCR. L 1kb Gene Ladder.

En el carril (**) de la Figura 44, el vector pFBGR-EGFP, se observó un producto de PCR de entre 2000 y 2500 pb, el mismo que se esperaría para el vector ligado. Esto puede deberse a que el gen EGFP es la secuencia de la cual proviene roGFP2, que difiere por las sustituciones en S147C y Q204C y por el péptido de anclaje a Golgi en el extremo 5'. Nótese que solo a partir de la clona 2.6 se amplificó una banda que coincide con la orientación esperada dentro del vector pFBGR. Para confirmar la correcta ligación de roGFP2_{golgi} en pFBGR de la colonia 2.6, se purificó el plásmido, se realizó una PCR para amplificar el gen roGFP2_{golgi} y una digestión con XbaI y SpeI según lo descrito en Metodología 5.5.6, Tabla 7. El resultado, mostrado en los geles de la Figura 45, confirma la integración de roGFP2_{golgi} en el vector pFBGR. El corte con la enzima de restricción SpeI generó el patrón de restricción esperado, pues como se muestra en el mapa de la Figura 43, la inserción de roGFP2 añade un nuevo sitio SpeI, por lo que libera un fragmento de aproximadamente 2000 pb.

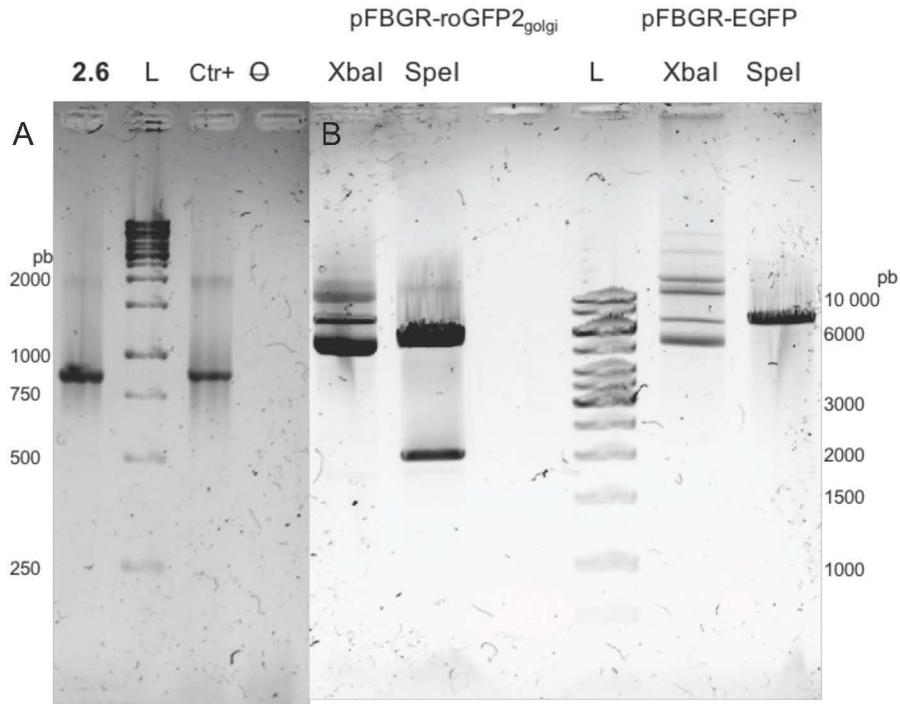


Figura 45. Confirmación de construcción pFBGR-roGFP2_{golgi} proveniente de la colonia 2.6.
 A) Electroforesis de PCR de colonia con oligos del inserto. L, marcador de peso molecular 1kb Gene Ladder, O corresponde al control de oligos, en el cual se evidencia que no existen productos de PCR inespecíficos. Ctr+ control positivo correspondiente a la amplificación del gen roGFP2_{golgi}.
 B) Patrón de restricción de plásmido pFBGR-roGFP2_{golgi} (Clona 2.6) comparación con vector pFBGR-EGFP.

10.5. Resultados de cuantificación indirecta de ácido siálico transferido. Evaluación del efecto del potencial redox en la sialidación de un IgG1.

Para realizar este ensayo se adquirió el paquete “Sialyltransferase activity” de R&D Systems®, descrito en la Figura 21 de la sección 6.4, el cual tiene un rango de detección entre 100 y 4000 pmol de fosfato, considerando el número de tratamientos y controles necesarios, el conjunto de reacciones se denominó experimento “A”. El fabricante advierte la reducción de sensibilidad a concentraciones mayores a 3 mM DTT. Se calculó que aplicando 4 nmoles de IgG1 por reacción (12mg/mL), podrían producirse hasta 1195 pmol de P_i (Tabla 16) y sería posible detectar esta liberación en caso de tener del 10–100% de

transferencia de ácido siálico en estas condiciones. Para lograr una medición más adecuada y descartar cuantificación de inespecificidad, se consideraron tres reacciones control como parte del experimento “A” descritas en la Tabla 17.

Tabla 16. Cálculo de nanomoles de galactosa equivalentes al total de AcM añadido a la reacción con base en el patrón de glicosilación del anticuerpo utilizado.

AcM añadido (nmol)	Galactosa en G1 (nmol)	Galactosa en G2 (nmol)	Galactosa total (nmol)	P _i equivalente teórico (pmol)
4	0.96	0.19	1.15	1 150

Tabla 17. Reacciones de sialidación experimento “A”.

Reacción	Código	IgG1 (nmol)	DTT (mM)	Pre-incubación (h)
Sialiltransferasa acoplada a fosfatasa $\text{CMP-ácido siálico} + \text{IgG1} \xrightarrow{\text{SiaT}} \text{IgG1-ácido siálico} + \text{CMP}$ <div style="margin-left: 150px;"> $\downarrow \text{CD73}$ Citidin + Pi </div>	A1	4	0	24
	A2	4	3	24
	A3	4	10	24
Control de interferencia por fosfatasa $\text{CMP-ácido siálico} + \text{IgG1} \xrightarrow{\text{CD73}} ?$	A1-f	4	0	24
	A2-f	4	3	24
	A3-f	4	10*	24
Control de interferencia por sialiltransferasa $\text{CMP-ácido siálico} + \text{IgG1} \xrightarrow{\text{SiaT}} \text{IgG1-ácido siálico} + \text{CMP}$	A1-s	4	0	24
	A2-s	4	3	24
	A3-s	4	10*	24
Control de interferencia no enzimática $\text{CMP-ácido siálico} + \text{IgG1}$	A1-e	4	0	24
	A2-e	4	3	24

Todas las reacciones se hicieron por duplicado excepto las marcadas con * (reacción única).

Como se observa en la Figura 46, la reacción control de interferencia por fosfatasa muestra la liberación de fosfato no asociado a la transferencia de ácido siálico, en ausencia de sialiltransferasa. Por otro lado, la reacción control de interferencia por sialiltransferasa muestra que la reacción de sialidación de IgG1 no produce por sí misma una señal superior a la obtenida por la mezcla de reacción sin enzimas. En la reacción de sialidación del IgG1 con 3 mM DTT se calculó un total de 14.32

nmol de ácido siálico transferido, una cifra ilógica, dado que, de acuerdo al cálculo realizado a partir del patrón de glicosilación del IgG1 (Tabla 16), se añadieron solamente 1.195 nmol de galactosas aceptoras. La incongruencia de este resultado se confirma al observar la abundancia de N-glicanos sialidados obtenidos por HPLC de la Figura 47, en donde no se observa diferencia entre las muestras de las reacciones A1 y A2 (0 y 3 mM DTT). El rendimiento obtenido por medio de la determinación de fosfato inorgánico sugiere, que el DTT favorece la hidrólisis de CMP-ácido siálico no asociada a la transferencia del ácido siálico, posteriormente la liberación de CMP conlleva a su defosfatación y en consecuencia a la detección con verde malaquita. Por esta razón, se decidió evaluar la transferencia de ácido siálico unido a través de la determinación de su perfil de glicosilación y desechar el uso del paquete de cuantificación “Sialyltransferase activity” R&D Systems®.

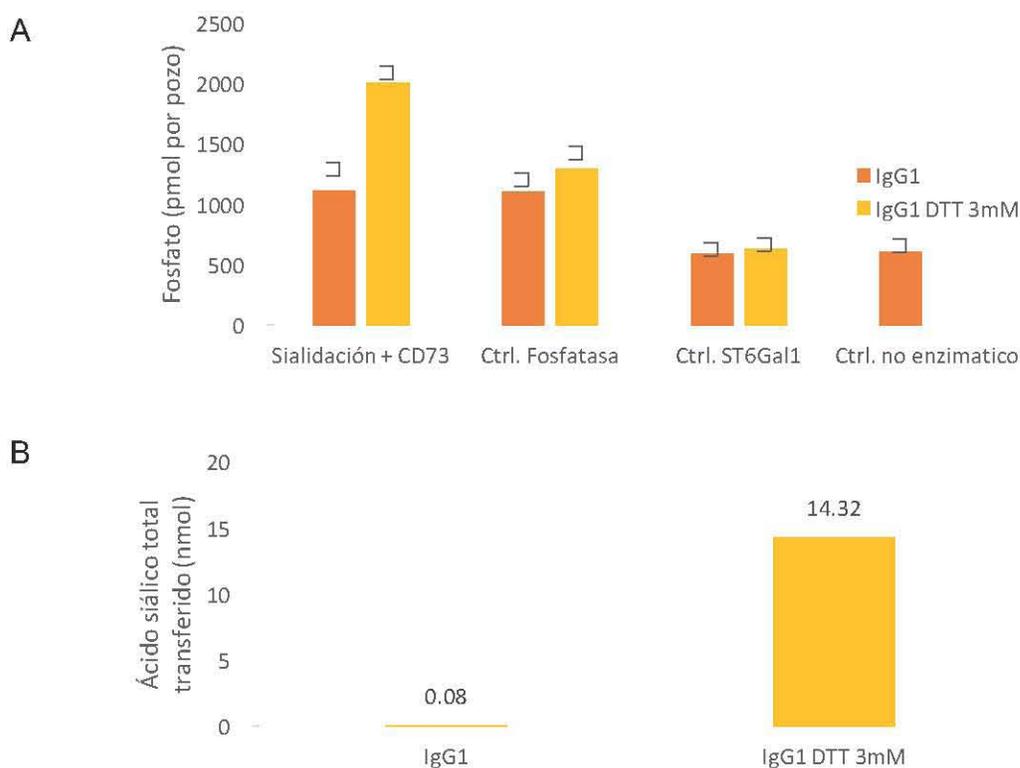


Figura 46. Determinación de ácido siálico transferido mediante el ensayo de fosfatasa acoplada a sialiltransferasa. A) Cuantificación de fosfato liberado por pozo (Dilución 1:20). B) Cálculo de ácido siálico transferido en la reacción.

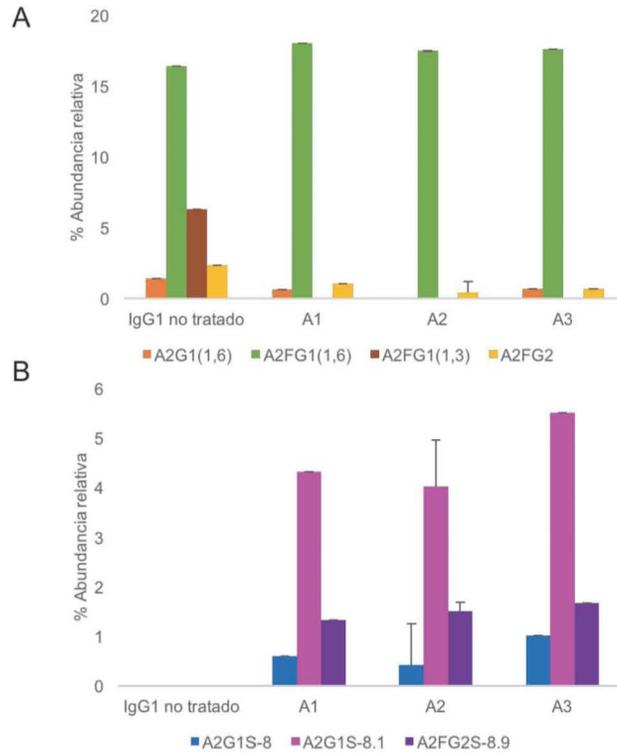


Figura 47. Abundancia relativa en glicofomas en muestras del experimento “A”. A) Estructuras con galactosas terminales. B) Estructuras con ácido siálico terminal. Números después del guion UG de elución. A2, barras representan diferencia entre dos experimentos, el resto son cuantificaciones únicas. Los perfiles de glicosilación se describen en la Tabla 18.

10.6. Perfil de N-glicosilación del IgG1 tratado a distintos potenciales redox.

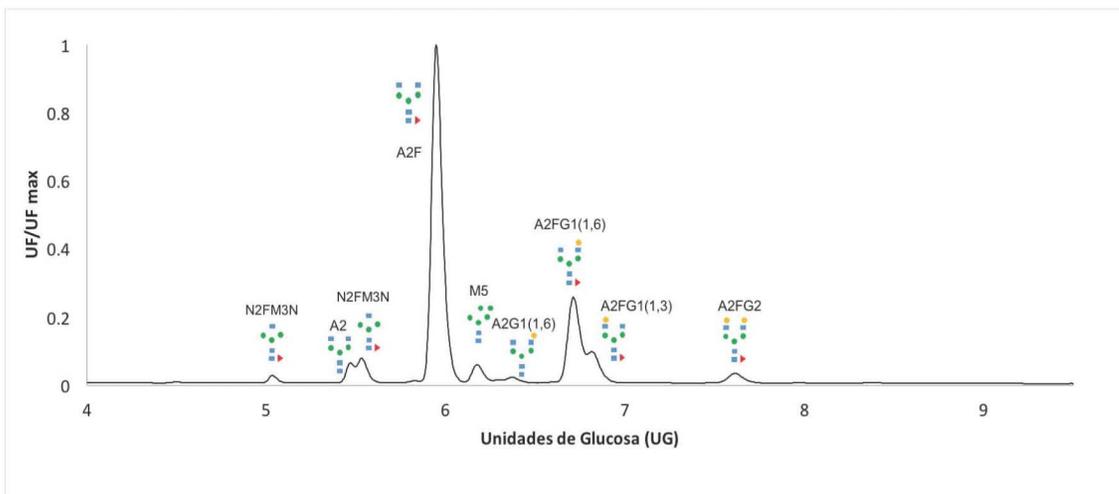


Figura 48. Cromatograma típico del IgG1 sin tratamiento.

Tabla 18. Perfil de glicosilación típico del AcM.

UG	Estructura propuesta	Descripción gráfica	Abundancia relativa %
1.8	Maltosa	Control interno	
4.13	N2M3		0.88
4.82	N2FM3		0.67
5.01	N2FM3N		0.94
5.45	A2		3.09
5.49	N2FM3N		3.94
5.93	A2F		60.18
6.17	M5		3.93
6.36	A2G1(1,6)		1.38

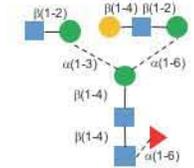
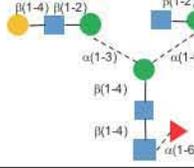
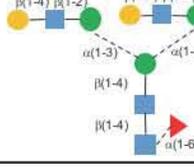
6.71	A2FG1(1,6)		16.37
6.79	A2FG1(1,3)		6.28
7.61	A2FG2		2.34

Tabla 19. Abundancia relativa de glicofomas en las muestras de las reacciones de sialidación experimento B.

	IgG1 no tratado	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
N2FM3N	1.21	1.27	1.16	1.05	0.92	1.07	0.92	1.03
A2	3.36	3.09	2.74	2.66	2.10	2.69	2.40	2.64
N2FM3N	4.16	4.59	4.68	4.48	5.00	4.58	4.98	4.68
A2F	63.27	61.54	62.65	62.19	63.00	62.36	63.14	62.94
M5	3.16	3.48	3.03	3.20	2.64	3.23	2.82	2.96
A2G1(1,6)	1.52	0.65	0.58	0.65	0.68	0.63	0.67	0.87
A2FG1(1,6)	15.73	17.12	16.96	17.12	17.51	16.83	16.46	16.63
A2FG1(1,3)	5.61	2.63	1.82	1.36	2.33	1.21	0.92	2.52
A2FG2	1.98	1.69	1.40	1.35	1.49	1.14	1.03	1.41
A2FG1S1(1,3)	0.00	2.83	3.63	4.33	3.13	4.69	5.00	3.20
A2FG2S	0.00	1.12	1.36	1.60	1.21	1.57	1.65	1.11
Desviaciones estándar								
Nombre	IgG1 no tratado*	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
N2FM3N	0	0.32	0.04	0.03	0.05	0.02	0.05	0.03
A2	0	0.86	0.39	0.20	0.12	0.12	0.24	0.17
N2FM3N	0	0.36	0.51	0.24	0.48	0.15	0.16	0.22
A2F	0	2.22	0.29	0.53	0.46	0.43	0.30	0.39
M5	0	0.86	0.22	0.17	0.13	0.26	0.15	0.21

A2G1(1,6)	0	0.05	0.08	0.10	0.08	0.03	0.02	0.10
A2FG1(1,6)	0	0.35	0.12	0.22	0.55	0.31	0.31	0.24
A2FG1(1,3)	0	0.15	0.08	0.21	0.58	0.79	0.39	0.06
A2FG2	0	0.37	0.14	0.28	0.16	0.22	0.10	0.15
A2FG1S1(1,3)	0	0.15	0.04	0.27	0.57	1.12	0.63	0.36
A2FG2S	0	0.17	0.07	0.03	0.20	0.19	0.18	0.07

*Cuantificación única.

Tabla 20. Abundancia relativa de glicofomas en las muestras de las reacciones de sialidación experimento C.

Nombre	IgG1-d no tratado	C1	C2	C3	C4	C5	C6	BisTris
N2FM3	0.99	1.49	1.38	1.48	1.19	1.42	1.29	1.47
A2	1.16	1.39	1.39	1.30	1.25	1.29	1.20	0.87
N2FM3N	3.70	5.16	5.04	4.85	5.00	4.73	4.83	4.93
A2F	59.40	60.92	59.81	58.90	59.14	60.08	59.06	58.49
M5	7.11	9.02	8.59	9.26	8.84	9.83	8.74	9.36
A2G1(1,6)	1.11	0.45	0.65	0.38	1.06	0.00	0.64	0.24
A2FG1(1,6)	10.43	9.01	9.00	9.37	9.49	9.54	8.88	9.93
A2FG1(1,3)	12.84	5.06	11.10	5.57	11.15	7.40	11.47	7.87
A2FG2	3.05	1.17	2.37	1.55	2.88	1.72	2.49	1.89
A2FG1S1(1,3)	0.00	5.25	0.51	6.10	0.00	3.32	1.06	3.97
A2FG2S	0.00	1.07	0.17	1.25	0.00	0.69	0.34	0.98

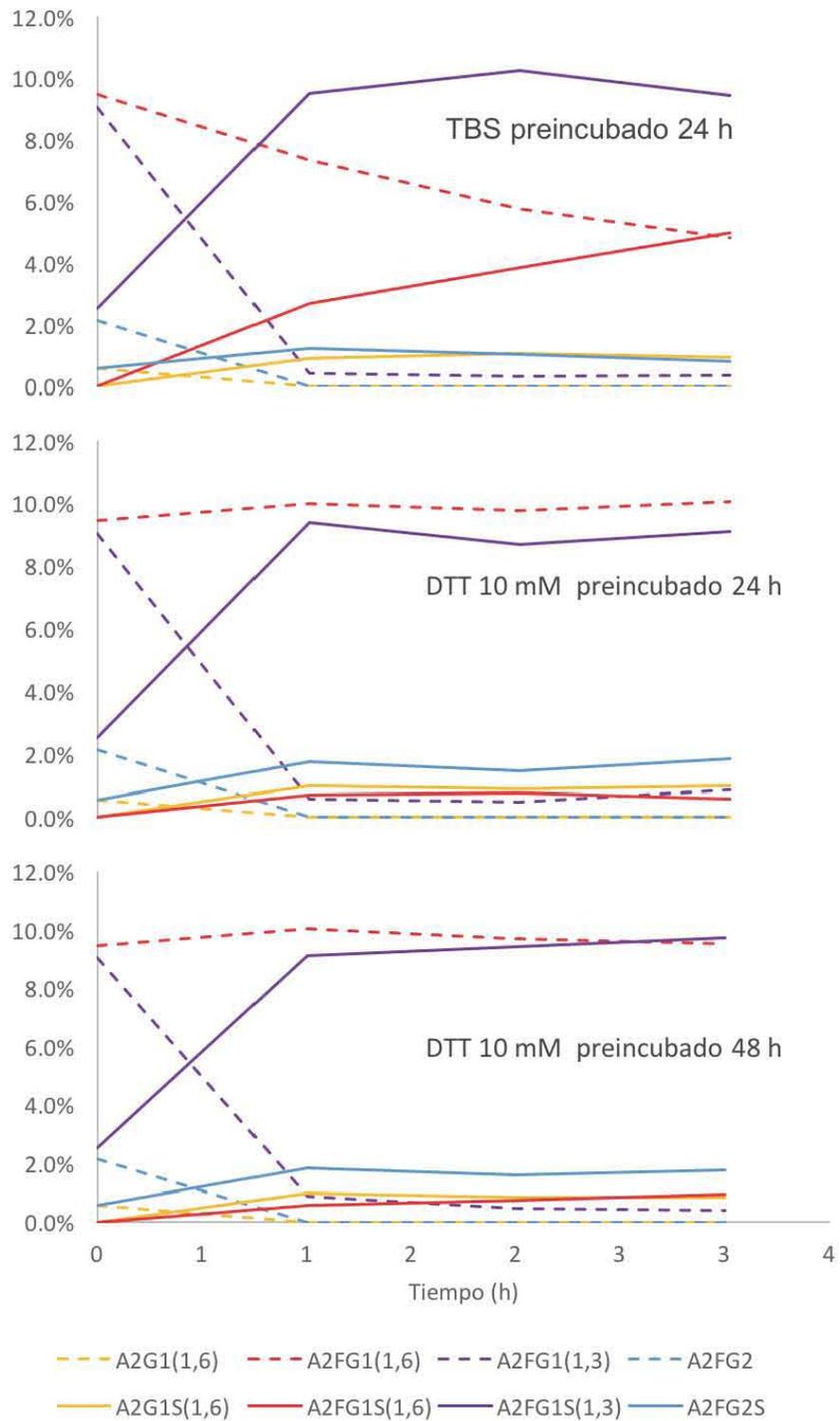


Figura 49. Cinéticas de sialidación de N-glicanos 2AB en presencia de DTT. Los porcentajes en el eje Y indican abundancia relativa al perfil de N-glicosilación completo. Las estructuras nombradas para cada especie se propusieron en base a la tasa de consumo de los N-glicanos galactosilados.

10.7. Estado de oxidación de roGFP2 en Golgi. Valores estadísticos

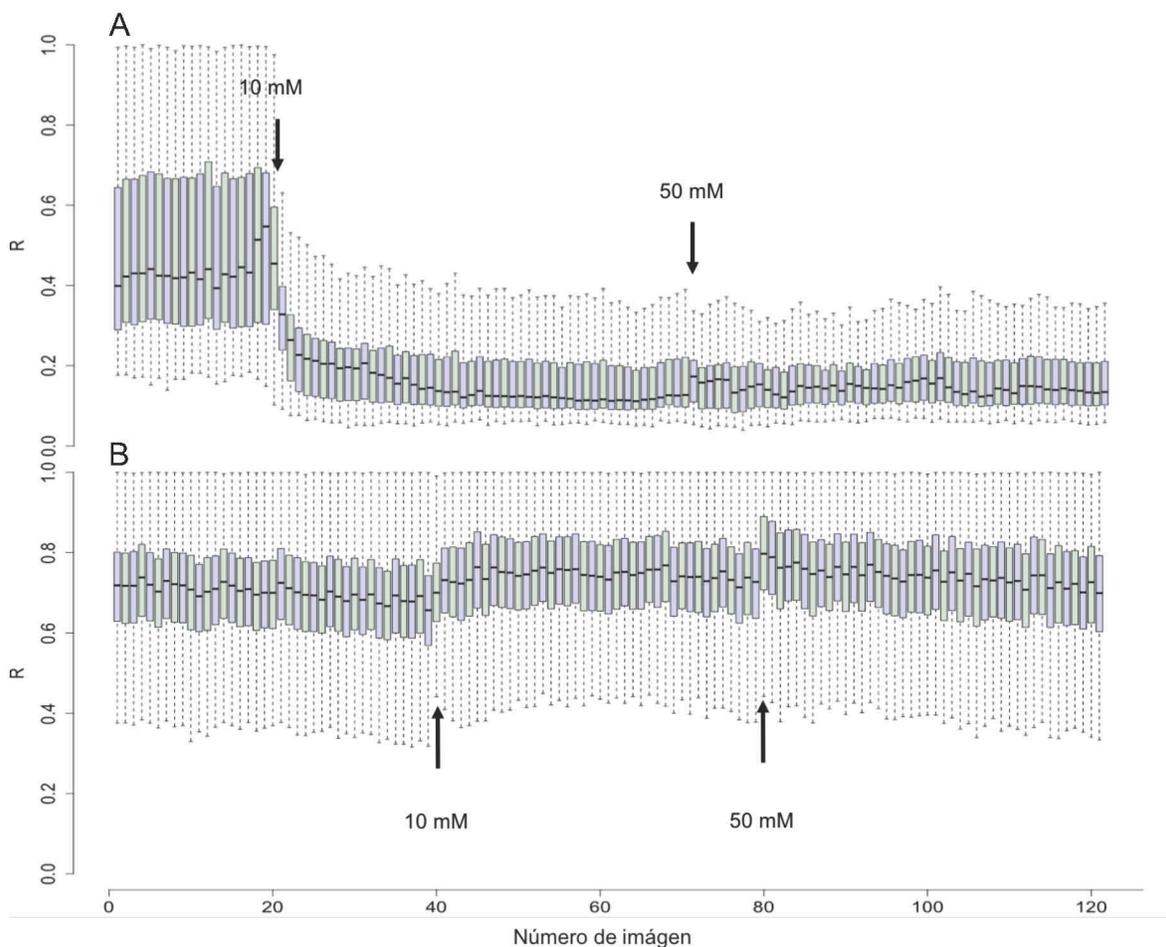


Figura 50. Análisis de proporcionalidad (I_{405}/I_{488}) de roGFP2 en Golgi de células CHO ante la adición. A) La adición de DTT se busca generar un potencial redox altamente reductor (< -320 mV) en la célula. B) Con la adición de H₂O₂ se busca generar un potencial redox altamente oxidante (> -240 mV) en la célula. El cambio en la tendencia (R/R_0) después de la adición de DTT es del 70% mientras que para la adición de H₂O₂ es apenas del 6%, se concluye que el potencial redox basal del Golgi está más cerca al estado oxidante. Cada imagen se adquirió cada 30 segundos. R_0 es la R al tiempo cero. Las concentraciones señaladas son las finales en el cultivo.

Tabla 21. Valores estadísticos del cociente R según etapa de equilibrio redox.

	DTT		H ₂ O ₂	
	Mediana	Promedio	Mediana	Promedio
Basal	0.54	0.54	0.63	0.57
10 mM	0.18	0.20	0.64	0.57
50 mM	0.15	0.16	0.56	0.54

El Potencial Redox Intracelular y su Importancia en Biotecnología

Frania J. Zúñiga-Bañuelos y Laura A. Palomares*

*Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ave. Universidad 2001 Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos 62210 México. franiazb@ibt.unam.mx *Autor para correspondencia: laura@ibt.unam.mx*

RESUMEN

Potencial redox es la capacidad de transferir electrones de una especie química a otra. Su complejidad en sistemas biológicos requiere su estudio desde varios puntos de vista. Se sabe que cada organelo tiene su propio equilibrio redox, el que cambia a medida en que la célula crece y transita por las distintas fases del ciclo celular, constituyendo un sistema dinámico. El papel del potencial redox en los procesos celulares está aún en estudio. El potencial redox ha sido utilizado para el monitoreo y control de cultivos anaerobios y para diferenciar eventos metabólicos de eventos operacionales en cultivos de células animales. El estudio del potencial redox ha sido clave para entender ciertas enfermedades como Parkinson, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Esta revisión es una breve recopilación de la información disponible sobre cómo el potencial redox influye en la fisiología celular y como puede ser aprovechado en biotecnología.

Palabras clave: Potencial redox intracelular, especies reactivas de oxígeno, plegamiento de proteínas, potencial redox del cultivo, antioxidantes, envejecimiento.

ABSTRACT

Redox potential is the ability to transfer electrons from a chemical species to another. The complexity of the cell requires a systematic view of the redox potential. It is known that each organelle has its own redox equilibrium, which can change at the various cell cycle phases, constituting a dynamic system. The role of the compartmentalized redox potential in cellular processes is still under investigation. Redox potential has been used as a control parameter in aerobic fermentation, as well as to distinguish operational from metabolic events in animal cell cultures. Furthermore, redox potential has been key for understanding certain diseases such as Parkinson's Alzheimer's and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). This review is a brief recompilation of the available information of how redox potential determines cellular physiology and its use in biotechnology.

Keywords: Intracellular redox potential, reactive oxygen species, protein folding, culture redox potential, antioxidants, aging.

INTRODUCCIÓN

El potencial redox se refiere a la capacidad de una especie química de donar o aceptar electrones (oxidarse o reducirse, respectivamente). El potencial redox intracelular (PRI) es el sistema óxido reductor que refleja la estequiometría de diversas biomoléculas implicadas en el flujo de electrones, las que además inciden en procesos de regulación dependientes de la señalización y activación de factores transcripcionales. Una de las moléculas más importante del sistema redox es el glutatión (GSH), el cual se encuentra mayoritariamente en estado reducido dentro de la célula y su concentración va de 1 a 10 mM (Kalinina *et al.*, 2014). Además del glutatión, otras moléculas forman parte del sistema de regulación del PRI, como la tiorredoxina, NADH/NAD⁺, FAD⁺/FADH, NADP⁺/NADPH, además de las enzimas involucradas en su reducción. El ambiente en un sistema redox es muy dinámico, pues las reacciones redox ocurren continuamente. Se habla de un potencial redox reductor (o negativo), cuando la estequiometría de una reacción redox se inclina hacia el aumento en la concentración de la molécula que recibe electrones (reducida). Por el contrario, existe un ambiente oxidante (potencial redox positivo) cuando aumenta la concentración de la especie que pierde electrones (oxidada).

Desde los años 1950, el interés sobre el potencial redox celular aumentó con el descubrimiento de radicales libres en tejidos celulares y vegetales como productos de las

reacciones de óxido-reducción. Commoner *et al.* (1954) encontraron que los radicales libres provienen de reacciones catalizadas por enzimas involucradas en la fotosíntesis o en la formación de melanina después de la radiación ultravioleta o ionizante. Por otro lado, Harman (1956) propuso una teoría que relaciona a un alto contenido de especies reactivas de oxígeno con mutaciones, cáncer y el envejecimiento, cuando el sistema redox celular no es capaz de proteger a la célula de estos radicales. En consecuencia, diversos estudios se dirigieron hacia la comprensión de los mecanismos de homeostasis del redox celular y su importancia, especialmente para el entendimiento de patologías que afectan al ser humano.

Se ha reportado que el potencial redox intracelular afecta las siguientes funciones celulares:

1. Transporte.
2. Plegamiento de proteínas.
3. Señalización celular.

Es muy posible que otras funciones celulares también sean afectadas por el potencial redox. Ya que la biotecnología utiliza seres vivos, particularmente células, los procesos biotecnológicos están también determinados por el potencial redox. Esta variable se vuelve entonces importante desde dos enfoques, primero para el entendimiento de patologías humanas y animales y el desarrollo de estrategias de tratamiento, y segundo, para el desarrollo y mejora de los procesos biotecnológicos. En biotecnología, el potencial redox ha sido utilizado para el control de procesos de

tratamiento de aguas, de procesos anaerobios o microaerobios, e incluso de cultivo de células animales. El papel del potencial redox desde estos dos enfoques es presentado en este escrito, con la finalidad de explicar la importancia de conocer y entender el comportamiento del potencial redox ante distintas situaciones metabólicas celulares, así como reconocer su importancia en la biotecnología.

POTENCIAL REDOX A NIVEL SUBCELULAR

Los diversos estudios realizados para determinar el potencial redox en organelos de varios tipos de células han dejado en claro que el potencial redox se regula de manera independiente en cada compartimento celular y según la especie redox en cuestión, de manera que no se puede comparar el equilibrio de dos parejas de especies redox distintas o en diferentes compartimentos (Kemp *et al.*, 2007).

Mitocondria

La mitocondria es el organelo con mayor actividad redox, pues contiene la cadena respiratoria a través de la cual sucede la transferencia de electrones desde los transportadores redox hasta el oxígeno como el último aceptor de electrones. La cadena respiratoria está formada por complejos metaloproteicos que bombean protones al espacio intermembranal, logrando la fuerza protón motriz necesaria para la producción de ATP. Al mismo tiempo, se ha demostrado la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) como el superóxido y

peróxido, como subproductos de la transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria, y su papel en la regulación de la apoptosis celular (Cai & Jones, 1998; Scialo *et al.*, 2013). La determinación del estado redox en la mitocondria bajo diferentes condiciones celulares ha sido de gran interés por su relevancia para explicar la causa de algunas enfermedades. Se ha estudiado el equilibrio de especies redox encontradas en toda la célula que además son reguladas de manera independiente, como el par NADPH/NADP⁺, tiorredoxina (Trx1, Trx2), GSH/GSSG (disulfuro de glutatión, glutatión oxidado) y Cys/CySS (Go & Jones, 2008). Mediante la cuantificación de la relación de GSH/GSSG en mitocondrias purificadas de hígado, se calculó un rango de potencial redox entre -330 y -300 mV (Kemp *et al.*, 2007). Tiempo después, mediciones en mitocondrias de células de hojas de *Arabidopsis*, utilizando roGFP2, una proteína fluorescente sensible a redox, se encontró un potencial de -330 mV (Rosenwasser *et al.*, 2010). En mitocondrias de células HeLa, Hanson *et al.*, (2004) encontraron un potencial redox de -360 mV, que es altamente reductor, posiblemente en consecuencia de un alto grado de proliferación celular, pues se ha observado que cuando el potencial redox (referido a la especie GSH) se vuelve más reductor, aumenta la concentración celular (Hutter *et al.*, 1997), de manera que cumple una función importante en la regulación del ciclo celular. Se sabe que GSH está presente en el núcleo, se ha pensado que su papel señalizador consiste en mantener una

arquitectura nuclear apta para la expresión de genes (García-Giménez, *et al.*, 2013).

En estudios más recientes, se ha comparado el impacto de la oxidación de glutatión dentro de la mitocondria, con el fin de conocer el tiempo de recuperación del potencial redox gracias a la actividad antioxidante de la célula. Para ello, Kolossov *et al.* (2014) transfectaron establemente células CHO con roGFP2 unida a Grx1 (Glutarredoxina 1), dirigida a mitocondria y citoplasma, añadieron diamida, un eficiente oxidante de tioles (Kosower *et al.*, 1969; Rigobello *et al.*, 2005) y retirándolo después de unos minutos, observaron el cambio del potencial redox mediante microscopía de fluorescencia en tiempo real, siguiendo el grado de oxidación de roGFP2. Ellos encontraron que el tiempo de vida media de recuperación del sensor es de 160 ± 6 s en mitocondria y 155 ± 12 s en citoplasma, valores muy cercanos. Sin embargo, cuando inhibieron la síntesis de GSH por BSO (Butinona sulfoxamina) en ambos compartimentos, hubo una diferencia importante en ambos compartimentos, resultando en un potencial redox más oxidante en la mitocondria, mientras que en el citoplasma el potencial redox regresó rápidamente a sus valores normales. Estos resultados resaltan la importancia del GSH en la capacidad de amortiguamiento del potencial redox en la célula, como lo han mencionado diversos trabajos en el tema (Ayer *et al.*, 2014; Foyer *et al.*, 2002). Esto indica que la respuesta a perturbaciones externas en el equilibrio redox es

independiente para cada compartimento, ya que el control del exceso de moléculas oxidantes o reductoras, puede sujetarse a la presencia y concentración de antioxidantes, reguladores e incluso la producción de ERO, como lo propone Kolossov *et al.* (2015) para el caso de la cadena respiratoria en mitocondria.

Citoplasma

Durante estudios de superóxido en apoptosis, Cai & Jones (1998) compararon el potencial redox, calculado con la ecuación de Nerst, de las especies GSSG/GSH (-239 mV) en equilibrio contra el del par NADPH/NADP (-394mV), reportado por Sies (1982), en estado estacionario. Se observa que el primero tiene un balance más oxidante que el segundo, el cual funciona como cofactor para reducir el GSSG por la glutatión reductasa (Karplus & Shulz, 1989).

Retículo endoplásmico

El equilibrio redox en el retículo endoplásmico (RE) tiende a ser oxidante. La primera cuantificación fue realizada enzimáticamente por Hwang *et al.* (1992), siguiendo la metodología de Anderson (1985), encontrando que el estado redox celular global en células de hibridoma esta entre -233 y -239 mV, mientras que en RE obtuvieron un redox de -172 a -188 mV. En otro estudio en células de epidermis de tabaco, se comparó el potencial redox en citosol y RE al expresar roGFP2 en estos compartimentos, encontrando valores de -320 ± 0.2 mV y -225 ± 2.0 mV,

respectivamente, confirmando así un mayor grado de oxidación en RE (Schwarzländer *et al.*, 2008). Actualmente se sabe que una de las funciones más importantes del retículo endoplásmico es recibir, plegar y ensamblar las proteínas que transitan por esta vía secretora, para lo cual, como se describirá más adelante, un entorno oxidante es imprescindible.

Golgi

Después de su descubrimiento hace más de 100 años, la complejidad de este organelo ha atraído el interés de muchos investigadores en diversos temas, uno de ellos es la forma en que funciona durante la respuesta celular para contender con el estrés oxidante. Se ha determinado el potencial redox en los lisosomas, utilizando la proteína roGFP dirigida a este sitio y se sabe que es de -240 mV (Austin *et al.*, 2005), mucho más oxidante que en mitocondria, pero similar al estado redox global en hibridoma, según Anderson (1985). A pesar de esta diferencia, los lisosomas se consideran los principales organelos en la modulación del estrés oxidante (Go & Jones 2008; Kurz, *et al.*, 2010). Aunque no se conoce el potencial redox en el Golgi, se han descrito mecanismos de respuesta ante estrés oxidante (Jiang *et al.*, 2011), por ejemplo cuenta con las bombas $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPasas codificadas por los genes *ATPC1/ATP2C2* en mamíferos (Vanoevelen *et al.*, 2005), que contribuyen a disminuir la concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} en el citoplasma, lo cual es muy relevante, por ser iones involucrados en vías de señalización

para la producción de ERO e inducción de apoptosis (Brookes *et al.*, 2004; Görlach *et al.*, 2015).

En el Golgi también hay producción de antioxidantes por componentes en su membrana. La ubiquinona es el transportador de electrones y es un antioxidante (Nyquist *et al.*, 1970; Crane *et al.*, 1993; Maroz, *et al.*, 2009), principalmente evitando la peroxidación lipídica relacionada a enfermedades cardiovasculares (Siegel, *et al.*, 2014). Dos glutaredoxinas (Grx6 y Grx7) y parkin, se añaden a la lista de antioxidantes. Las primeras evitan la oxidación y posible degradación de proteínas citoplásmicas, lo que aumenta la resistencia de la célula al estrés oxidante (Mesecke *et al.*, 2008). Parkin fue localizada en el trans-Golgi por Kobo y colaboradores (2001). Posee un dominio ubiquitin en la región N-terminal y dos motivos tipo dedo de zinc. Fue llamada así porque es codificada por un gene que presenta amplias deleciones en pacientes con AR-JP ("*Autosomal recessive juvenile parkinsonism*") (Kitada *et al.*, 1998). La sobreexpresión de parkin silvestre y mutado en células NT-2 y SK-N-MC por Hyun *et al* (2002) mostró que la concentración de lípidos peroxidados es más alta en las células expresando la mutante. Esto sugiere que estos componentes son vitales para conservar la homeostasis celular.

Interesantemente la regulación del potencial redox en cada organelo es distinta e independiente. Al parecer esto tiene relación con la función que cada uno desempeña en la célula. No obstante, el desequilibrio de las reacciones redox en tan

solo un compartimento celular puede causar una sucesión de eventos con impacto fisiológico, por ejemplo, el plegamiento ineficiente de proteínas como resultado de un exceso de radicales libres en el retículo endoplásmico (Iqbal *et al.*, 2014; Karademir *et al.*, 2015), que conduce a la formación de agregados proteicos y a diversas respuestas de estrés, como se describe a continuación.

IMPORTANCIA EN PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS

Una de las funciones más importantes de las especies redox es la formación de puentes disulfuro a través de la oxidación de las cisteínas que poseen las proteínas. Este evento sucede principalmente en el retículo endoplásmico (RE) y forma parte del proceso de maduración y estabilización de proteínas que finalmente serán secretadas o formarán parte de la membrana celular. El número de combinaciones posibles para el plegamiento de una proteína puede ser enorme, sin embargo, como lo propuso Anfinsen (1962) hace 50 años, el arreglo tridimensional de la cadena de aminoácidos es el más favorable, y la proteína contiene información que permite el correcto apareamiento de sus puentes disulfuro y así lograr la formación de otros entrecruzamientos covalentes que le den mayor estabilidad a la proteína. Actualmente se sabe que las reacciones que catalizan la formación de puentes disulfuro son realizadas por un amplio número de enzimas con actividad disulfuro isomerasa (PDI por sus siglas en inglés "*Protein disulfide isomerase*"), caracterizadas por tener un dominio tiorredoxina (Trx) (Edman

et al., 1985). Cada una de estas proteínas tiene especificidad por su sustrato, regulada por el número, localización y reactividad redox de los motivos Cys- Xaa- Xaa- Cys, de la proteína a plegar, así como de los valores de *pKa* de ambas cisteínas (Okumura *et al.*, 2015).

El mecanismo de formación de puentes disulfuro se esquematiza en la figura 1. La primer reacción ocurre a partir de la PDI oxidada (PDIOxd), que, después de encontrarse con su sustrato ditiol, genera la PDI reducida (PDIred) y el puente disulfuro en la proteína "cliente", luego un oxidante no enzimático o enzimático, como Ero1, reacciona con PDIred para generar nuevamente PDIOxd y H₂O₂. Lo anterior vuelve a repetirse iterativamente hasta formar los puentes disulfuro de la proteína "cliente" (Hudson *et al.*, 2014). La complejidad de este mecanismo aumenta, pues otros pares redox contribuyen directamente a la oxidación de proteínas desplegadas, como GSSG, dehidroascorbato, peróxido de hidrógeno (Hudson *et al.*, 2014), y miembros de la familia quiescin-sulfidril oxidasa (QSOX), muy abundante en eucariontes, que utilizan un dominio de tiorredoxina y un pequeño sitio de unión a FAD (Thorpe *et al.*, 2002). Se sabe que la PDI contribuye a evitar la formación de agregados proteicos. Aunque estudios en pacientes con enfermedades neurodegenerativas han encontrado que PDI forma cuerpos de inclusión en células del sistema nervioso central (Iqbal *et al.*, 2014).

ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL POTENCIAL REDOX

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa que, en la mayoría de los casos, está relacionada con mutaciones en la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1) (Atkin *et al.*, 2008; Ezzi *et al.*, 2007; Laurindo *et al.*, 2012). La SOD1 tiene un alto poder antioxidante, pues cataliza la conversión de superóxido a

oxígeno y peróxido (Getzoff *et al.*, 1983; Fridovich, 1995).

En estudios recientes se ha encontrado que las mutaciones adquiridas no siempre ocasionan la disminución de la actividad catalítica, sino por el contrario, generan nuevas propiedades catalíticas que incrementan la producción de radicales tóxicos, como en el caso de la actividad de

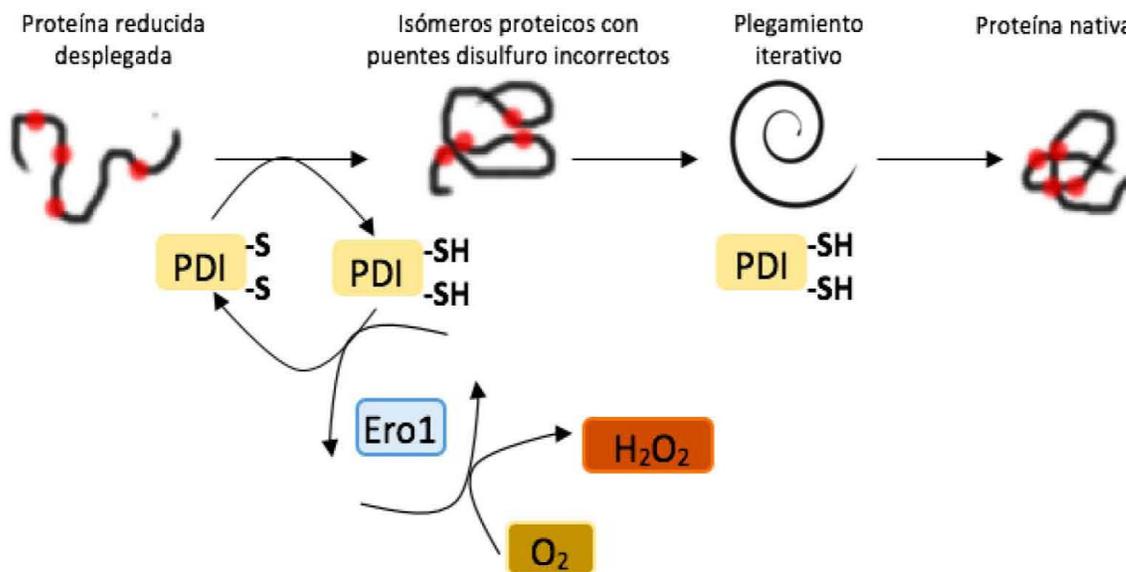


Fig. 1. Ejemplo del mecanismo formación de puentes disulfuro durante el plegamiento de proteínas. El proceso empieza con el péptido completamente reducido. La disulfuro isomerasa (PDI) oxidada cataliza la formación de puentes disulfuro entre las cisteínas. Los puentes disulfuro se forman de manera iterativa hasta que se obtiene el plegamiento funcional más estable, el que corresponde a la forma nativa de la proteína. Nótese que la presencia de oxidantes es necesaria para la regeneración de la PDI. La regeneración de la PDI puede ocurrir a través de reacciones catalizadas por enzimas, por ejemplo la Ero1, o a través de reacciones no enzimáticas.

SOD1/H₂O₂ dependiente de bicarbonato, que cataliza la oxidación de tocoferoles y lípidos insaturados (Goss *et al.*, 1999). Más aún, nuevos estudios mostraron que los radicales generados por la SOD mutante ocasionan la oxidación, inactivación y agregación de PDI, provocando la pérdida del control de calidad durante el plegamiento de proteínas en el

retículo endoplásmico y la formación de cuerpos de inclusión en neuronas motoras (Iqbal *et al.*, 2014; Karademir *et al.*, 2015).

ENVEJECIMIENTO RELACIONADO CON POTENCIAL REDOX

Otra relación interesante entre el potencial redox y la salud, es con la longevidad y el envejecimiento. La teoría del envejecimiento

Basada en radicales libres (FRTA, por sus siglas en Inglés "*Free Radical Theory of Aging*") fue propuesta por Harman en 1956, quien publicó en 1993 una hipótesis sobre el origen de la demencia senil en relación con la disfunción celular y la acumulación de ERO en el cerebro, desde entonces, se han acumulado estudios que refuerzan o rechazan esta teoría. Por ejemplo, en un estudio realizado por Rebrin & Sohal (2004), en el que compararon la concentración de GSH/GSSG total y mitocondrial, además de proteína reactiva a sulfidrilos en hígado, cerebro, riñón, músculo esquelético y corazón, de dos cepas de ratones de distinta esperanza de vida, encontró que la proporción de GSH con respecto a GSSG, fue 32, 50 y 21% mayor en mitocondria de hígado, cerebro y músculo esquelético en ratones de esperanza de vida larga (C57BL/6) que en ratones de vida corta (SAM), de igual forma, la diferencia en cantidad de proteína reactiva a sulfidrilos fue significativamente mayor en tejido de hígado, riñón, corazón y músculo esquelético de ratones C57BL/6 que en ratones SAM. Se destaca la particularidad de que el tejido de ratones longevos está en condiciones más reductoras que el tejido de ratones con vida corta y curiosamente estos últimos muestran menor capacidad reductora por su baja concentración de proteína reactiva a sulfidrilos. No obstante esto no indica con seguridad que el envejecimiento sea una consecuencia del estado de oxidación celular, pues no es posible distinguir causa de efecto. Otros estudios han demostrado

que no existe relación entre la capacidad de mantener un ambiente mitocondrial reductor y la longevidad, sobre todo en organismos pequeños como la mosca *Drosophila* (Miwa et al, 2004) y el gusano *Caenorhabditis elegans* (Clancy & Birdsall, 2013; Ranjan et al., 2013). También se ha buscado explicar mediante esta teoría la diferencia de longevidad entre el género femenino y el masculino en una misma especie (Magnani & Accorsi, 1993) y se ha propuesto la idea de que el nivel de estrógeno pudiese influir la capacidad reductora de la mitocondria. Sin embargo, no se observó diferencia en la longevidad de ratones C57BL/6 machos o hembras y no hay diferencia significativa entre los niveles de ERO mitocondriales (Sanz et al. 2006). Otras investigaciones han mostrado que la capacidad de mantener un potencial redox mitocondrial reductor en hembras es mayor al tener un alto nivel de expresión, así como de actividad, de las enzimas glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa (Borrás et al., 2003). Se ha observado un importante incremento en las mutaciones del ADN mitocondrial en animales con vida corta, resultando en proteínas de la cadena respiratoria con función alterada. El mal funcionamiento de la cadena respiratoria resulta en la sobreproducción de ERO (Payne & Chinnery, 2015; Krishnan et al., 2008; Ritcher, 1995). Queda por responderse la pregunta: ¿qué es lo que propicia una menor vulnerabilidad a la mutación en el DNA mitocondrial de organismos longevos?.

Artículos

EFFECTO DEL POTENCIAL REDOX EN CULTIVOS CELULARES

El potencial redox en cultivos (PRC) celulares se refiere al balance entre las especies óxido-reductoras en el medio de cultivo, estas especies redox pueden ser moléculas producidas por la célula o adicionadas al reactor, como O₂, DTT, glutatión, etc. Como se muestra en la tabla I, existen estudios con el interés de determinar el efecto del potencial redox sobre la

productividad y la calidad del producto en biorreactores, ésto representa una ventaja para el control de cultivos, pues el potencial redox es un parámetro relativamente fácil de medir en línea, que se ha propuesto para seguir cambios en tiempo real de otras variables que estén relacionadas como el crecimiento celular (Lin *et al.*, 2010), viabilidad (Pluschkell & Flickinger, 1996; Eyer & Henzle, 1995) y metabolismo (Higareda *et al.*, 1997).

Tabla I. Cultivos bajo control de PRC y su efecto en la producción.

Tipo de cultivo	Control de PRC	Efecto en el cultivo	Referencia
Quimiostato con aguas residuales (sintética) de composición conocida, alta en glucosa, K ₂ SO ₄ y NaHCO ₃ , para la producción de biogas.	Dosificación de O ₂ usando PR, controlado de -230 a -180mV, 50 y 100mV por encima del PR natural, respectivamente.	Durante la oxigenación a PR controlado, los sulfuros disueltos y gaseosos fueron completamente eliminados, lo que resultó en mayor producción de metano.	Khanal & Huang, 2002.
Reactor en lote secuencial para la remoción de amonio en aguas residuales de soya.	Control de aeración mediante PR. Correlación entre potencial redox y degradación de materia orgánica y oxidación de amonio.	Control de acumulación de nitrógeno en tiempo real, usando PR y pH. Disminución del amonio al 95%, como resultado de aeración controlada.	Gao <i>et al.</i> , 2007
Fermentación de <i>Candida tropicalis</i> para la producción de xilitol a partir de D-xilosa durante limitación de oxígeno.	Control de aeración y alimentación de glucosa mediante monitoreo de PR.	La máxima producción de xilitol se obtuvo a -180mV y una tasa de aeración de 0.21 min ⁻¹	Sheu <i>et al.</i> , 2003.
Reactor en lote secuencial, alimentado dos veces, para la	Monitoreo en un rango de 0 a -500mV. Correlación entre	Indicador de nitrificación y desnitrificación del cultivo. La concentración mínima	Han <i>et al.</i> , 2008

Artículos

desnitrificación de estiércol de puerco.	presencia de $\text{NO}_3\text{:N}$ y PR.	de $\text{NO}_3\text{:N}$ se encuentra entre -320 a -412mV (máxima desnitrificación).	
Fermentación en lote con <i>Actinobacillus succinogenes</i> NJ113 para la producción de ácido succínico.	Comparación de PR constante en cinco niveles: -100, -300, -350, -400 y -450mV con la adición de ferrocianuro de potasio (1g L^{-1}) y/o ditiotreitól (1g L^{-1}).	Se encontró que cuando el PR fue de -350mV, la productividad aumentó un 66%, dado que disminuye la fuga de sustrato hacia la formación de compuestos sin interés para la producción.	Li <i>et al.</i> , 2010
Cultivo en lote de hibridomas produciendo un anticuerpo monoclonal (AcM).	Control del PRC entre -130 y 70 mV utilizando mezclas de oxígeno y nitrógeno.	Las condiciones reductoras resultaron en mayor producción de AcM y concentración celular. La mayor velocidad de producción del AcM a PRC intermedios. PRC oxidantes indujeron apoptosis.	Meneses-Acosta <i>et al.</i> , 2012

Sabiendo que el potencial redox en el cultivo es resultado del balance entre diversos pares redox, Higareda *et al.* (1997) monitorearon el oxígeno disuelto (OD), pH y potencial redox de cultivos en lote de células de hibridoma murino, para la producción de un anticuerpo monoclonal. Encontraron distintos patrones de cambio de las tres variables cuando el cultivo se encontraba bajo limitación de glucosa (Glc) o glutamina (Gln), a diferencia de un cultivo con suficiente sustrato en el que hubo cambios relacionados a eventos operacionales. Ellos proponen dos ecuaciones para predecir el PRC con base en la especie redox $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$, (fácilmente cuantificable por pH gracias al peróxido de hidrógeno), cuando OD

es constante y cuando pH es constante. Sin embargo, es probable encontrar un comportamiento que no se ajuste las ecuaciones propuestas, lo cual denota que existen otras moléculas oxidantes y/o reductoras secretadas por las células que dominan en el cultivo, como en el caso de la limitación de Glc y Gln, sustratos importantes en el metabolismo celular, para los cuales valdría la pena ajustar un modelo especial, como lo destacan Lee *et al.* (1998). Estos modelos son valiosos al ser implementados como estrategia de control, para encontrar variaciones metabólicas en el cultivo que pudieran afectar la producción.

CONCLUSIONES

La medición del potencial redox en sistemas biológicos permite obtener información sobre el metabolismo celular, su estado energético e incluso predecir la viabilidad o longevidad. El surgimiento de nuevas tecnologías que nos permiten darle seguimiento a la evolución del potencial redox celular en tiempo real permiten entender los procesos celulares y como dependen del balance redox. Quedan aún muchas preguntas por responder, pues en la mayoría de las situaciones es difícil determinar si el potencial redox y la acumulación de ERO son los responsables de algún evento celular, o por el contrario, consecuencia de ese evento. Este campo seguirá siendo un importante tema de estudio que permitirá un mayor entendimiento de un amplio rango de eventos celulares e incluso a nivel orgánico. La biotecnología se beneficiará de este conocimiento al poder obtener productos en mayor cantidad y calidad a través del mayor entendimiento de los fenómenos redox que los rigen.

AGRADECIMIENTOS

Financiamiento PAPIIT UNAM IT200315 e IT201214. FJZB es alumna del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y recibe beca del CONACYT 384123. Agradezco a Shirley Ainsworth, Omar Arriaga, Javier Peza Villa y Alexa Milley Gómez Restrepo, responsables de poner a nuestra disposición los recursos de información científica y tecnológica del acervo institucional.

REFERENCIAS

- Anderson M (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Method. Enzymol.* 113: 548-555.
- Anfinsen C (1962) Some observations on the basic principles of design in protein molecules. *Comp. Biochem. Physiol.* 4: 229-240.
- Atkin J, Farg M, Walker A, McLean C, Tomas D & Horne M (2008) Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 30: 400–407.
- Austin C, Wen X, Gazzard L, Nelson C, Scheller R & Scales S (2005) Oxidizing potential of endosomes and lysosomes limits intracellular cleavage of disulfide-based antibody–drug conjugates, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (50): 17987–17992.
- Ayer A, Gourlay C & Dawes I (2014) Cellular redox homeostasis, reactive oxygen species and replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.* 14: 60–72.
- Borrás C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó F & Viña J (2003) Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biol. Med.* 34(5): 546–552.
- Brookes P, Yoon Y, Robotham J, Anders M, Sheu S, (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle, *Am. J. Physiol.- Cell Ph.* 287: C817–C833.

- Cai J & Jones D (1998) Superoxide in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273: 11401-11404.
- Clancy D & Birdsall J (2013) Flies, worms and the Free Radical Theory of ageing. *Aging Res. Rev.* 12(1): 404-412.
- Commoner B, Townsend J & Pake G (1954) Radicals in biological materials. *Nature* 4432: 689-691.
- Crane F, Sun I & Sun E (1993) The essential functions of coenzyme Q. *Clin. Investig.* 71: S55- S59.
- Edman J, Ellis L, Blacher R, Roth R & Rutter W (1985) Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature* 317: 267-270.
- Eyer K & Heinzle E (1995). On-line estimation of viable cells in a hybridoma culture at various DO levels using ATP balancing in redox potential measurement. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 277-283.
- Ezzi S, Urushitani M & Julien J (2007) Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *J. Neurochem.* 102: 170-178.
- Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112.
- Foyer C, Theodoulou F & Derlot S (2002) The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants, *Trends Plant Sci.* 6(10): 486-492.
- Gao D, Peng Y, Liang H & Wang P (2007) Using oxidation-reduction potential (ORP) and pH value for process control of shortcut nitrification-denitrification. *J. Environ. Sci. Heal. A* A38(12): 2933-2942.
- García-Giménez J, Markovic J, Dasí F, Queval G, Schnaubelt D, Foyer C & Pallardó F (2013) Nuclear glutathione. *Biochim. Biophys. Acta* 1830: 3304-3316.
- Getzoff E, Tainer J, Weiner P, Kollman P, Richardson J & Richardson D (1983) Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* 306: 287-290.
- Go YM & Jones D (2008) Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1780: 1273-1290.
- Görlach A, Bertram K, Hudecova S & Krizanova O (2015) Calcium and ROS: A mutual interplay, *Redox Biol.* 6: 260-271.
- Goss S, Singh R & Kalyanaraman B (1999) Bicarbonate Enhances the Peroxidase Activity of Cu,Zn-Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* 274: 28233-28239.
- Han Z, Wu W, Zhu J & Chen Y (2008) Oxidation-reduction potential and pH for optimization of nitrogen removal in a twice-fed sequencing batch reactor treating pig slurry. *Biosyst. Eng.* 99: 273-281.
- Hanson G, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi R, Tsien R & Remington J (2004) Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicator. *J. Biol. Chem.* 279: 13044-13053.
- Harman D (1956) Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11: 298-300.
- Harman D (1993) Free radical theory of aging: a hypothesis on pathogenesis of senile

- dementia of the Alzheimer's type. *Age* 16: 23-30.
- Higareda AE, Possani LD & Ramírez OT (1997) The Use of Culture Redox Potential and Oxygen Uptake Rate for Assessing Glucose and Glutamine Depletion in Hybridoma Cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 56: 555-563.
- Hudson D, Gannon S & Thorpe C (2014) Oxidative protein folding: From thiol-disulfide exchange reactions to the redox poise of the endoplasmic reticulum. *Free Rad. Biol. Med.* 80: 171-182.
- Hutter D, Till B & Greene J (1997). Redox State Changes in Density-Dependent Regulation of Proliferation. *Exp. Cell Res.* 232: 435-438.
- Hyun D, Lee M, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Halliwell B & Jenner P (2002) Effect of wild-type or mutant parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome. *J. Biol. Chem.* 277: 28572-28577.
- Hwang C, Sinskey A, Lodish H (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257: 1496-1502.
- Iqbal A, Paviani V, Moretti A, Laurindo F & Augusto O (2014) Oxidation, inactivation and aggregation of protein disulfide isomerase promoted by the bicarbonate-dependent peroxidase activity of human superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 557: 72-81.
- Jiang Z, Hu Z, Zeng L, Lu W, Zhang H, Li T & Xiao H (2011) The role of the Golgi apparatus in oxidative stress: is this organelle less significant than mitochondria? *Free Rad. Biol. Med.* 50: 907-917.
- Karademir B, Corek C & Ozer N (2015) Endoplasmic reticulum stress and proteasomal system in amyotrophic lateral sclerosis. *Free Rad. Biol. Med.* 88: 42-50.
- Karplus P & Shulz G (1989) Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: substrate crystal structures at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 210: 163-180.
- Kalinina E V, Chernow N & Novichkova E (2014) Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox dependent processes. *Biochemistry* 79: 1562-1583.
- Kemp M, Go YM & Jones D (2007) Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: A perspective on redox systems biology. *Free Rad. Biol. Med.* 44: 921-937.
- Khanal S & Huang, J (2002) ORP-based oxygenation for sulfide control in anaerobic treatment of high-sulfate wastewater. *Water Res.* 37: 2053-2062.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Mizuno Y, & Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 392: 605-608.
- Kolossov V, Hanafin W, Beaudoin J, Bica D, DiLiberto S, Kenis P & Gaskins H (2014) Inhibition of glutathione synthesis distinctly alters mitochondrial and cytosolic redox poise. *Exp. Biol. Med.* 239: 394-403.

Artículos

- Kolossov V, Beaudoin J, Ponnuraj N, DiLiberto S, Hanafin W, Kenis P & Gaskins H (2015) Thiol-based antioxidants elicit mitochondrial oxidation via respiratory complex III. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 309: C81-C91.
- Kosower N, Kosower E & Wertheim B (1969) Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 37: 593-596.
- Krishnan K, Reeve A, Samuels D, Chinner P, Blackwood J, Taylor R, Wanrooij S, Spelbrink J, Lightowlers R & Turnbull D (2008). What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat. Genet.* 40(3): 275-279.
- Kurz T, Eaton J & Brunk U (2010) Redox Activity Within the Lysosomal Compartment: Implications for Aging and Apoptosis, *Antioxid. Redox Signal.* 13: 511-523.
- Laurindo F, Pescatore L & Fernandes D (2012) Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Rad. Biol. Med.* 52: 1954–1969.
- Lee T, Chang Y, Chung B & Park Y (1998) Correlation of redox potential with state variables in cultures under controlled dissolved oxygen concentration and pH. *Biotechnol. Prog.* 14: 959-962.
- Li J, Jiang M, Chen K, Ye Q, Shang L, Wei P, Ying H & Chang H (2010) Effect of redox potential regulation on succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33:911–920.
- Lin Y, Chien W & Duan K (2010) Correlations between reduction–oxidation potential profiles and growth patterns of *Saccharomyces cerevisiae* during very-high-gravity fermentation. *Process Biochem.* 45: 765–770.
- Magnani M & Accorsi A (1993) The female longevity phenomenon. Hypotheses on some molecular and cell biology aspects. *Mech. Ageing Dev.* 72: 89-95.
- Maroz A, Anderson R, Smith R & Murphy M (2009) Reactivity of ubiquinone and ubiquinol with superoxide and the hydroperoxyl radical: implications for in vivo antioxidant activity. *Free Rad. Biol. Med.* 46:105–109.
- Meneses-Acosta A, Gómez A & Ramírez OT (2012) Control of redox potential in hybridoma cultures: effects on MAb production, metabolism and apoptosis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39: 1189-1198.
- Mesecke N, Spang A, Deponte M & Herrmann J (2008) A Novel Group of Glutaredoxins in the cis-Golgi Critical for Oxidative Stress Resistance. *Mol. Biol. Cell* 19: 2673–2680.
- Miwa S, Riyahi K, Partridge L & Brand M (2004) Lack of correlation between mitochondrial reactive oxygen species production and life span in *Drosophila*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019: 388-391.
- Nyquist S, Barr R & Morré D (1970) Ubiquinone from rat liver Golgi apparatus fractions. *Biochim. Biophys. Acta.* 208: 532-534.
- Okumura M, Kadokura H & Inaba K (2015) Structures and functions of protein disulfide isomerase family members involved in proteostasis in the endoplasmic reticulum. *Free Rad. Biol. Med.* 83: 314-322.
- Payne B & Chinnery P (2015) Mitochondrial

Artículos

- dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *Biochim. Biophys. Acta* 1847: 1347–1353.
- Pluschkell S & Fickinger M (1996) Improved methods for investigating the external redox potential in hybridoma cell culture. *Cytotechnol.* 19: 11-26.
- Ranjan M, Gruber J, Ng L & Halliwell B (2013) Repression of the mitochondrial peroxiredoxin antioxidant system does not shorten life span but causes reduced fitness in *Caenorhabditis elegans*. *Free Rad. Bio. Med.* 63: 381-389.
- Rebrin I & Sohal R (2004). Comparison of thiol redox state of mitochondria and homogenates of various tissues between two strains of mice with different longevities. *Exp. Gerontol.* 39: 1513–1519.
- Rigobello M, Folda A, Scutari G & Bindoli A (2005) The modulation of thiol redox state affects the production and metabolism of hydrogen peroxide by heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 441: 112–122.
- Ritcher C (1995) Oxidative Damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int. J. Biochem. Cell B.* 27(7): 647-653.
- Rosenwasser S, Rot I, Meyer A, Feldman L, Jiang K & Friedman H (2010) A fluorometer-based method for monitoring oxidation of redox-sensitive GFP (roGFP) during development and extended dark stress *Physiol. Plantarum* 138: 493–502.
- Sanz A, Hiona A, Kujoth G, Seo A, Hofer T, Kouwenhoven E, Kalani R, Prolla T, Barja G & Leeuwenburgh C (2006) Evaluation of sex differences on mitochondrial bioenergetics and apoptosis in mice. *Exp. Gerontol.* 42: 173–182
- Scialo F, Mallikarjun V, Stefanatos R & Sanz A (2013). Regulation of Lifespan by the Mitochondrial Electron Transport Chain: Reactive Oxygen Species-Dependent and Reactive Oxygen Species-Independent Mechanisms. *Antiox. Redox Signal.* 19: 1953-1969.
- Schwarzländer M, Fricker M, Müller C, Marty L, Brach T, Novak J, Sweetlove L, Hell R & Meyer A (2008) Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells, *J. Microsc.* 231: 299–316.
- Sheu D, Duan K, Jou S, Chen Y & Chen C (2003) Production of xylitol from *Candida tropicalis* by using an oxidation-reduction potential-stat controlled fermentation. *Biotechnol. Let.* 25: 2065–2069.
- Sies H (1982) Metabolic Compartmentation. Academic Press, Toronto pp. 205–231.
- Siegel G, Ermilov E, Pries A, Winkler K, Schmidt A, Ringstad L, Malmsten M & Lindman B (2014) .significance of lipid peroxidation in cardiovascular disease. *Colloid. Surface. A.* 442: 173–180.
- Thorpe C, Hooper K, Raje S, Glynn N, Burnside J, Turi G & Coppock D (2002) Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Arch. Biochem. Biophys.* 405: 1–12.
- Vanoevelen J, Dode L, Baelen K, Fairclough R, Missiaen L, Raeymaekers L & Wuytack F (2005) The Secretory Pathway Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase 2 Is a Golgi-localized Pump with High Affinity for Ca²⁺ Ions. *J. Biol. Chem.* 280: 22800–22808.