



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Sobreexpresión del transportador mitocondrial de piruvato en células CHO-S: Efecto sobre el metabolismo, producción y calidad de glicoproteínas recombinantes.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Dubhe Beatriz Bulté Ocaña

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. IBt, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Adriana Valdez Cruz. IIBO, UNAM.

Dr. Iván Martínez Duncker. CIDC, UAEM.

Ciudad de México, enero 2021



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 desarrollado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de una beca de doctorado otorgada por CONACYT y del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP).

Investigación realizada gracias al financiamiento por parte de los proyectos UNAM-DGAPA-PAPIIT IT-200315, SEP-CONACyT Ciencia Básica 255445, CONACYT Infraestructura 280275, así como el apoyo de la empresa Liomont.

Se agradece especialmente a la M.C. Vanesa Hernández y M.C. Marta Contreras su contribución en este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Tonatiuh Ramírez y la Dra. Laura Palomares por haberme acogido dentro de su grupo, así como por todo su apoyo y guía, que ha contribuido enormemente a mi crecimiento profesional a lo largo de estos años.

A mi Comité Tutoral, la Dra. Adriana Valdés y Dr. Iván M. Duncker por sus valiosas críticas y oportunos consejos.

A mi familia, en especial a mis padres, que a pesar de la distancia siempre han sido el pilar incondicional en cada paso de mi vida.

A Alier, mi esposo, quien ha celebrado conmigo cada alegría y soportado estoicamente cada frustración a lo largo de este camino.

A Carolina Gómez, porque el desarrollo de este trabajo proviene del legado de un proyecto que ella inició en su maestría, y su apoyo fue muy importante en mi arrancada.

A las técnicas académicas del grupo: Vanesa, Ruth y muy especialmente a Martita por su disposición siempre a ayudarnos y estar pendiente de cuanto podamos necesitar.

A la Dra. Lilia Noriega y el Dpto. de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por su colaboración en los experimentos de respiración celular.

A Andrés Martínez por su valiosa contribución en las publicaciones que compartimos.

Al laboratorio nacional de microscopía y en especial al Dr. Arturo Pimentel por su colaboración en el análisis de imágenes.

A todos mis compañeros del grupo GPR, los que están y los que ya han pasado; por la acogida, por todo el tiempo compartido, por la paciencia para entenderme en los seminarios y por todo el apoyo, en especial a Ponchito, Karim, Julio, Alberto, Juan Carlos, Bere... que son algunos de los que más he molestado.

A los grandes amigos de esta segunda patria: Jérica, mi hermana mexicana, mi primo David Santiago, Jorge, Yeni, Mery, Dayanira, Felix, así como Mabel y Karel que han sido mi familia cubana en México.

CONTENIDO

I.	GLOSARIO.....	6
II.	RESUMEN.....	9
III.	INTRODUCCIÓN.....	10
	3.1- Las células de ovario de hámster chino (CHO) como sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes.	10
	3.2- Características del metabolismo energético en líneas celulares de mamíferos.....	12
	3.3- Impacto del metabolismo central del carbono sobre la calidad de la proteína secretada.	15
	3.4- Estrategias empleadas en la optimización del metabolismo energético en células de mamíferos.	19
	3.5- Papel de Transportador mitocondrial del piruvato en el metabolismo del carbono de células animales.	24
IV.	HIPÓTESIS	28
V.	OBJETIVOS	28
	Objetivo General.....	28
	Objetivos Específicos	28
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
	Sección A: Evaluación de las líneas estables no clonales CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1	29
	6.1- Líneas celulares y condiciones de cultivo	29
	6.2- Análisis de expresión relativa de mpc1 y mpc2 mediante RT-qPCR.....	29
	6.3- Análisis de expresión de las proteínas MPC1 y MPC2 por Western blot	31
	6.4- Localización mitocondrial de MPC1 y MPC2 mediante Inmunofluorescencia	31
	6.5- Determinación de consumo de oxígeno.....	32

6.6- Construcción de vectores de expresión para transfecciones transitorias.....	33
6.7- Cinéticas de crecimiento de las células CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1 con expresión transitoria de proteínas heterólogas.....	34
6.8- Determinación de concentraciones y tasas de producción específicas.....	34
Sección B: Desarrollo y evaluación de clonas estables sobreexpresando MPC y Fosfatasa Alcalina (hSEAP) como proteína recombinante modelo.....	37
6.9- Construcción de vectores de expresión.....	37
6.10- Transfecciones y selección de clonas.....	38
6.11- Cinéticas de crecimiento de clonas estables CHOmpc1mpc2-SEAP.....	39
6.12- Producción y purificación de hSEAP.....	39
6.13- Análisis del perfil de N-glicosilación de hSEAP por HPLC.....	40
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
Sección A: Evaluación de las líneas estables no clonales CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1.....	41
7.1- Sobreexpresión de MPC en líneas celulares CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1.....	41
7.2- Localización subcelular de MPC1 y MPC2 recombinante mediante Inmunofluorescencia.....	47
7.3- Análisis de la tasa de respiración celular en las líneas celulares CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1....	49
7.4- Evaluación del desempeño metabólico de líneas celulares CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1 durante la producción transitoria de proteínas heterólogas.....	53
Sección B: Generación y evaluación de clonas estables sobreexpresando MPC y Fosfatasa Alcalina (hSEAP) como proteína recombinante modelo.....	62
7.5- Desarrollo de clonas estables que sobreexpresen MPC y fosfatasa alcalina (hSEAP) como proteína recombinante modelo.....	62
7.6- Evaluación del desempeño metabólico de las clonas de CHOmpc1mpc2-SEAP.....	65
7.7- Análisis del perfil de glicosilación de hSEAP producida en células que sobreexpresan MPC.....	73

VIII. CONCLUSIONES.....	79
IX. PERSPECTIVAS.....	80
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
ANEXOS.....	96
Anexo 1: Construcciones del vector pCHO 1.0 que fueron empleadas en la obtención de las líneas estables no clonales CHOmpc1mpc2, CHOmpc2mpc1 y CHO-EGFP.	96
Anexo 2: Localización mitocondrial de MPC1 y MPC2 recombinantes en células CHOmpc2mpc1 por inmunofluorescencia y microscopía confocal.....	97
Anexo 3: Construcciones utilizadas para la expresión transitoria de las proteínas modelo hSEAP y el AcM.....	98
Anexo 4: Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de secuencias de interés en la construcción de los vectores utilizados.	99
Anexo 5: Construcción de la Curva de Calibración de PNP para la determinación de la concentración de hSEAP mediante el ensayo de actividad enzimática.	100
Anexo 6: Construcciones de vectores a partir del plásmido comercial pMONO-Blasti, utilizados para la expresión estable de hSEAP.....	101
Anexo 7: Comportamiento de la velocidad específica de producción (q_p) durante las cinéticas de producción transitoria de hSEAP y el AcM (a, b) y de las concentraciones de glutamina y glutamato durante la cinética de producción transitoria de hSEAP (c).	102
Anexo 8: Representación esquemática de las estructuras de glicanos aisladas de muestras de hSEAP.....	103

I. GLOSARIO

μ	Velocidad de crecimiento celular específica
2AB	2-aminobenzamida
AcM	anticuerpo monoclonal
ADNc	ADN complementario
Ala	Alanina
Amn	Amonio
Asn	Asparagina
BHK	Células de riñón de hámster bebe (del inglés <i>Baby Hamster Kidney</i>)
BCA	Ácido becincónico
BSA	Albúmina de suero bovino
CHO	Células de ovario de hámster chino (<i>Chinese Hamster Ovary</i> , por sus siglas en inglés)
CHO-EGFP	Línea celular estable, no clonal de CHO-S, que expresa EGFP
CHOmpc1mpc2	Línea celular estable, no clonal de CHO-S, que sobreexpresa MPC1 y MPC2 recombinante de ratón
CHOmpc2mpc1	Línea celular estable, no clonal de CHO-S, que sobreexpresa MPC2 y MPC1 recombinante de ratón
CMP	Citidin monofosfato
CMV	Citomegalovirus
COUP-TFII	Factor de transcripción II del promotor de la ovalbúmina de pollo
Ct	Ciclo umbral de detección de fluorescencia en qPCR (del inglés, <i>Threshold Cycle</i>)
CTE	Cadena de transporte de electrones
DHFR	Dihidrofolato reductasa
EF1/EF2	Factor de elongación 1/2
EGFP	Proteína verde fluorescente
ER	Expresión relativa
FADH ₂	Dinucleótido de flavina y adenina reducido
Fc	Fracción cristalizante de un anticuerpo
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
Fc	Fracción cristalizante de un anticuerpo
Fcy	Receptores que reconocen la fracción Fc de los anticuerpos IgG
Fuc	Fucosa

Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetil galactosamina
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GDP	Guanidin difosfato
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-acetil glucosamina
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GLUT	Isoformas de transportador de glucosa
GOI	Gen de interés (del inglés <i>Gene of Interest</i>)
GS	Glutamina sintetasa
HEK	Células embrionarias de riñón humano (del inglés <i>Human Embryonic Kidney</i>)
HILIC	Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica
HRP	Peroxidasa de rábano
hSEAP	Fosfatasa alcalina placentaria humana en su forma secretada
HSP60	Proteína de choque térmico 60
IgG	Inmunoglobulina G
IRES	Sitio de unión interna a ribosoma (del inglés <i>Internal Ribosome Entry Site</i>)
IVCD	Integral de células viables
Lac	Lactato
LDH	Lactato deshidrogenasa
Man	Manosa
MDH	Malato deshidrogenasa
MFA	Análisis de Flujos Metabólicos
MPC	Transportador mitocondrial de piruvato (del inglés <i>Mitochondrial Pyruvate Carrier</i>)
MTX	Metotrexato
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido
Neu5Gc	Ácido N-glicolil-neuramínico
NeuAc	Ácido N-acetil neuramínico (ácido siálico)
OCR	Velocidad de consumo de oxígeno (por sus siglas en inglés <i>Oxygen Consumption Rate</i>)

PC	Piruvato carboxilasa
PCC	Coeficiente de correlación de Pearson
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDHK	Piruvato deshidrogenasa quinasa
PNP	p-nitrofenol
PNPP	p-nitrofenol fosfato
PYC2	Isoforma citosólica de la PC de levadura
q_p	Productividad celular específica
RE	Retículo endoplasmático
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa reversa (<i>Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction</i> , por sus siglas en inglés)
Ser	Serina
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Thr	Treonina
T_m	Temperatura de fusión
UDP	Uridina difosfato
UPR	Respuesta a proteínas no plegadas (del inglés <i>Unfolded Protein Response</i>)
UTP	Uridina trifosfato
X_v	Concentración o densidad celular

II. RESUMEN

Las células de ovario de hámster chino (CHO) constituyen el sistema de elección para la producción de proteínas recombinantes con adecuado plegamiento y glicosilación. Sin embargo, su principal limitación radica en un fenotipo metabólico caracterizado por la alta tasa de glicólisis en presencia de oxígeno, que resulta en una elevada producción de lactato, fenómeno conocido como efecto Warburg. Diversos estudios han proporcionado evidencias sobre la limitación existente en el importe de piruvato a las mitocondrias y el papel del Transportador Mitocondrial de Piruvato (MPC) en esta función. En el presente trabajo se evaluó la sobreexpresión de las subunidades MPC1 y MPC2 del transportador en líneas celulares CHO estables, que se construyeron para facilitar la entrada de piruvato a las mitocondrias y su incorporación a las vías oxidativas. Mediante RT-qPCR y Western blot, se verificó una sobreexpresión significativa de ambos genes recombinantes en comparación con el nivel basal de las células control. Se confirmó la localización subcelular de ambas subunidades MPC recombinantes en las mitocondrias, lo cual permitió la adecuada formación del heterodímero funcional, que promovió el incremento de la respiración celular máxima en las líneas que sobreexpresan MPC. La evaluación cinética de las células MPC recombinantes estables no clonales mostró una reducción de hasta el 50% en el rendimiento global de la producción de lactato, en la línea celular con mayor sobreexpresión de MPC con respecto al control, e incrementó hasta más de un 70% posterior a la selección clonal. También se observó un favorecimiento de la concentración celular máxima, así como un incremento de hasta 40% en la concentración máxima de dos proteínas recombinantes modelo, expresadas de forma transitoria: un anticuerpo monoclonal (AcM) y la enzima fosfatasa alcalina humana secretada (hSEAP). La producción de esta última alcanzó hasta un 70% de incremento con respecto al control, en las clonas productoras de hSEAP de forma estable. El perfil de glicosilación de la proteína hSEAP producida en células CHO que sobreexpresan MPC, se encontró favorecido por un incremento significativo en los niveles de galactosilación con respecto a la obtenida en las células parentales. Como conclusión, este estudio mostró que el transporte de piruvato a las mitocondrias limita la eficiencia de la oxidación de la glucosa, lo cual puede superarse mediante un enfoque de ingeniería celular como la sobreexpresión de MPC, que fue capaz de activar un crecimiento más equilibrado y reducir el efecto Warburg, sin comprometer la tasa de consumo de glucosa y la concentración celular máxima.

III. INTRODUCCIÓN

3.1- Las células de ovario de hámster chino (CHO) como sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes.

Muchos productos biotecnológicos de interés terapéutico consisten en glicoproteínas cuya actividad biológica depende de su adecuado perfil de glicosilación como parte de complejas modificaciones postraduccionales, que las células microbianas e incluso de insectos, no son capaces de sintetizar óptimamente. Por esta razón, el cultivo de células de mamíferos, en especial de células de ovarios de hámster chinos (CHO, *Chinese Hamster Ovary*, por sus siglas en inglés), se ha convertido en la plataforma de elección para la producción de glicoproteínas recombinantes con tales requerimientos (*Bandaranayake y Almo, 2014; Butler y Spearman, 2014; Walsh, 2018; Fischer et al., 2015; Golabgir et al., 2016*). De este modo, los productos biofarmacéuticos aprobados a partir del cultivo de células de mamífero, entre 2015 y 2018, alcanzaron un 79%, destacándose entre ellos los anticuerpos monoclonales, de los cuales el 84% son producidos en células CHO, con ventas anuales que exceden los 100, 000 millones de dólares (*Bandaranayake y Almo, 2014; Walsh, 2018*).

Las células CHO, como sistema de expresión, abarca un extenso grupo de líneas celulares establecidas derivadas de un tronco común, a partir del aislamiento, por Theodore Puck en 1957, de células de ovario de hámster chino (*Puck et al., 1958*), las cuales fueron espontáneamente inmortalizadas. La capacidad de adaptabilidad de estas células a crecer a altas densidades en cultivos en suspensión representa una importante ventaja y ha dado lugar al desarrollo de líneas celulares como CHO-K1 y CHO-S, las cuales son ampliamente utilizadas en aplicaciones industriales. Por otra parte, la variabilidad genómica de las células CHO y el hecho de que sean funcionalmente hemicigóticas para muchos genes ha permitido el aislamiento de líneas mutantes con deficiencias en enzimas metabólicas, que constituyen una valiosa herramienta para la generación de líneas productoras utilizando la deficiencia como marcador de selección. De esta forma se generaron líneas mutantes de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) dando lugar a CHO-DXB11 (mono-alélica) y CHO-DG44 (con ambos alelos DHFR eliminados) (*Wurm, 2013; Bandaranayake y Almo, 2014*).

Pese a que la alta tasa de variabilidad y adaptabilidad de las células CHO, que ha dado origen a la amplia diversidad previamente mencionada, puede acarrear inconvenientes desde el punto de vista del mantenimiento de un fenotipo clonal, muchas son las ventajas de esta plataforma para su uso industrial. Entre ellas se encuentra su facilidad para el cultivo en suspensión a grandes escalas y a elevadas densidades celulares ($> 40 \times 10^6$ células/mL), así como la adaptación a medios de cultivo libre de suero y químicamente definidos. El uso de estos medios da lugar a procesos más rentables y seguros, al prevenir el riesgo de contaminación viral y priónica del suero bovino, y han simplificado los requisitos de procesamiento posterior, ya que contienen menos proteínas contaminantes (*Altamirano et al., 2013; Bandaranayake y Almo, 2014; Freeman et al., 2016*). Por otra parte, un estudio realizado en 1989 probó 44 patógenos humanos (incluidos el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la influenza, la poliomielitis, el herpes y el sarampión) y descubrió que la mayoría de ellos no se replican en las células CHO, lo que las hace ideales desde un punto de vista regulatorio (*Jayapal et al., 2007*).

Otra ventaja a destacar de las células CHO radica en el perfil de glicosilación impartido a las glicoproteínas recombinantes producidas en este sistema, el cual es compatible al de células humanas. Dicha compatibilidad viene dada al carecer, en mayor medida, estas líneas celulares, de la maquinaria biosintética para producir los epítopos galactosa- α -1,3-galactosa (α -Gal) y el ácido N-glicolil-neuramínico (Neu5Gc), que resultan altamente inmunogénicos (*Butler y Spearman, 2014*).

Aunque, de manera general, las células de mamífero exhiben menores tasas de crecimiento y productividad en comparación con las células microbianas, para satisfacer las demandas de la producción comercial, muchos han sido los esfuerzos encaminados al desarrollo de estrategias para maximizar la producción de proteína recombinante en estos sistemas. A partir de la optimización de medios de cultivo, el manejo de las estrategias de alimentación, el perfeccionamiento de los procesos de purificación y la ingeniería celular, se han logrado significativos avances en el incremento de los rendimientos volumétricos desde la aprobación del Activador tisular del plasminógeno (t-PA) en 1986, cuando se obtenían solamente valores máximos de 50 mg/L, hasta más de 5 g/L, que logran producirse actualmente como estándar en la industria, a partir de las líneas celulares derivadas de CHO (*Nallet et al., 2008; Freeman, 2016*).

Sin embargo, una de las principales limitaciones de este sistema de expresión continúa siendo su metabolismo, caracterizado por una alta tasa glicolítica, incluso en presencia de oxígeno disuelto en concentraciones no

limitantes, conduciendo a la producción de lactato, lo cual se conoce como efecto Warburg y que continúa siendo un desafío tecnológico a resolver (*Vander et al., 2009; Altamirano et al., 2013; Schell et al., 2014; Kelly et al., 2018*).

3.2- Características del metabolismo energético en líneas celulares de mamíferos.

Las alteraciones características del metabolismo energético en células de mamíferos han sido ampliamente documentadas en la literatura. Se ha descrito que las líneas celulares de mamíferos transformadas (tales como CHO, BHK, HEK-293 e hibridomas) presentan un desempeño metabólico equivalente a las células carcinogénicas (HeLa, MCF-7 y hepatomas) (*Altamirano et al., 2013*). Estas alteraciones involucran un incremento en la capacidad glicolítica, incluso en presencia de altas concentraciones de oxígeno disuelto (glicólisis aerobia, también descrita como “Efecto Warburg”), así como en el catabolismo de la glutamina (glutaminólisis), que excede los requerimientos metabólicos (*Vander et al., 2009; Altamirano et al., 2013; Schell et al., 2014; Kelly et al., 2018*). Una de las principales consecuencias de este comportamiento metabólico es que conduce a una formación exacerbada de metabolitos de desecho como lactato y amonio, a partir de glucosa y glutamina respectivamente, que son las principales fuentes de carbono utilizadas en el cultivo de células animales.

En el caso de glucosa, un elevado flujo en la glicólisis produce un exceso de piruvato que no ingresa al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA, por sus siglas en inglés) para la producción final de energía mediante la fosforilación oxidativa, sino que es reducido formando lactato y garantizando así la regeneración de NAD⁺ a partir de NADH. Este fenómeno puede ser fácilmente explicado si tomamos en cuenta que para pequeñas tasas de glicólisis, los sistemas de lanzadera malato-aspartato y glicerol fosfato, son capaces de re-oxidar el NADH, equilibrando su tasa de producción. Sin embargo, a altas velocidades de consumo de glucosa, cuando se incrementa notablemente la tasa de generación de NADH, en comparación con las condiciones fisiológicas de células no transformadas, generalmente se excede la capacidad de estos transportadores mitocondriales que son relativamente lentos. De este modo, no es probable que estas lanzaderas puedan regenerar suficiente NAD⁺ cuando el transporte a través de las membranas intracelulares se acerca a su velocidad máxima. Por lo tanto, a las tasas de glicólisis observadas en células que se dividen rápidamente como las líneas celulares

inmortalizadas, estos mecanismos de transporte probablemente estén saturados y como resultado, se requieren otros mecanismos para regenerar el NAD⁺ citosólico, los cuales mayoritariamente implican la reducción de piruvato a lactato para generar NAD⁺ a partir de NADH a través de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Locasale y Cantley, 2011; Pereira et al., 2018).

Por su parte en el proceso conocido como glutaminólisis, la glutamina es desamidada a glutamato, el cual a su vez, pierde su grupo amino al ser convertido a α -cetoglutarato por la glutamato deshidrogenasa (GDH), liberándose así 2 moles de amonio por mol de glutamina completamente oxidada, resultando en la acumulación de grandes cantidades del mismo (Figura 1) (Lao and Toth, 1997; Altamirano, 2013; Torres et al., 2018). En células cancerígenas se ha observado que la glutamina es transportada a la mitocondria a velocidades de 4 a 10 veces superior que en células normales y es oxidada a glutamato por una glutaminasa dependiente de fósforo inorgánico (Pi), con una actividad incrementada de 10 a 20 veces con respecto a las células normales (Molina et al., 1995); mientras que el ciclo de la urea, principal responsable del reciclaje del amonio, es probable que sea prácticamente inactivo en las células CHO, ya que sólo pequeñas cantidades de urea han sido detectadas (Zamorano et al. 2010).

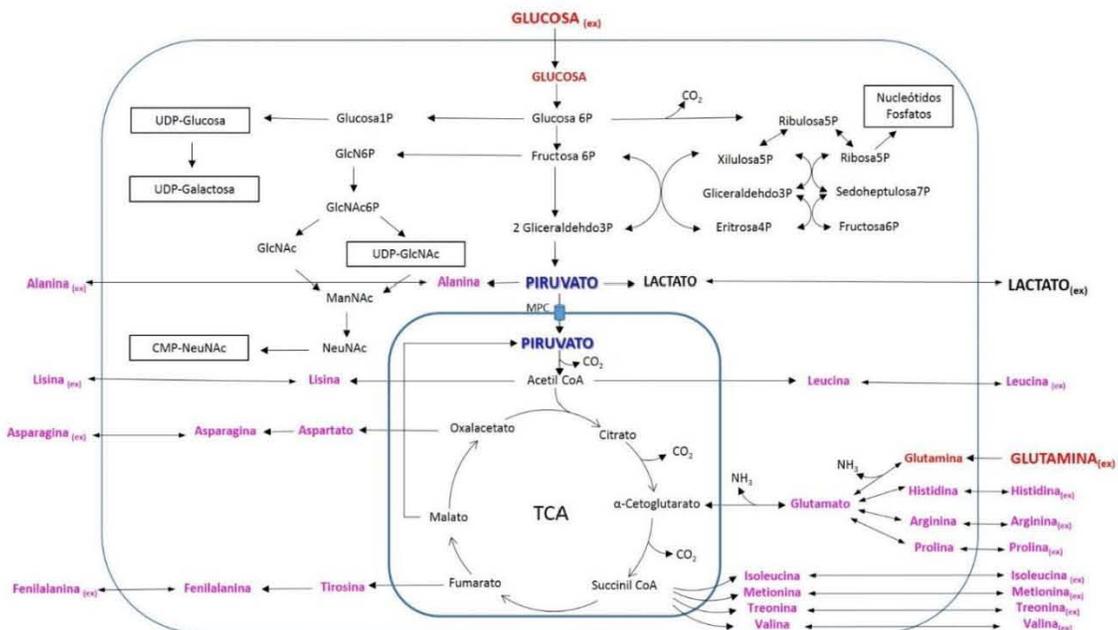


Figura 1: Principales reacciones involucradas en el metabolismo central de glucosa y glutamina en células CHO.

Adicionalmente, el catabolismo de la glutamina se ha observado que se encuentra muy relacionado al fenotipo metabólico del efecto Warburg, ya que puede verse incrementado ante la entrada ineficiente del piruvato a la mitocondria, donde la enzima málica mitocondrial es capaz de transformar el malato a piruvato, para completar el “pool” mitocondrial de este metabolito (Yang *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2014; Altamirano *et al.*, 2013; Wahrheit *et al.*, 2014; Vacanti *et al.*, 2014). También la glutaminólisis, bajo estas circunstancias, tiene la función de alimentar las reacciones anapleróticas que suplen los intermediarios del TCA para diferentes vías biosintéticas; así como la producción de NADPH a partir de la conversión de malato a piruvato por la enzima málica. El piruvato formado a partir del malato que se exporta al citoplasma, puede también contribuir a la formación de lactato, y se ha visto que una vez agotada la glutamina en el medio, esto puede inducir el cambio de producción a consumo de lactato que tiene lugar en muchos de los procesos que involucran el uso de estas líneas celulares (Zagari *et al.*, 2013a).

Tanto el lactato como el amonio constituyen subproductos metabólicos tóxicos, que al exceder ciertas concentraciones críticas, afectan el crecimiento celular y provocan una disminución en la producción de la proteína recombinante de interés (Lao and Toth, 1997; Gambhir *et al.*, 2003). El lactato puede causar una reducción significativa del pH del medio, inhibiendo el crecimiento de las células, aunque este efecto se puede evitar parcialmente con un sistema de control que mantenga el pH dentro de un intervalo óptimo. Sin embargo, el principal mecanismo por el cual el lactato parece afectar negativamente a las células, es por un aumento en la osmolaridad del medio extracelular ante la adición de álcali para regular el pH (Cruz *et al.* 2000, Pereira *et al.*, 2018; Torres *et al.*, 2018). En general, se ha descrito que concentraciones de lactato de 20 a 40 mM deterioran la productividad y más de 40 mM inhiben el crecimiento celular (Altamirano *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2018).

En el caso del ion amonio, este tiene un mayor impacto en el cultivo de células que el lactato, debido a que concentraciones de amonio de tan solo entre 2 y 5 mM, pueden inhibir el crecimiento y afectar la productividad (Altamirano *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2018). El mecanismo preciso de la toxicidad del amonio en células no se encuentra totalmente claro, a pesar de que se ha demostrado que este efecto depende del pH (Schneider *et al.* 1996, Cruz *et al.*, 2000). El ion amonio puede competir con cationes, tales como potasio, para el transporte dentro de la célula a través de la bomba Na^+/K^+ . De este modo, la acumulación de amonio interrumpe el gradiente celular electroquímico e induce la acidificación del citoplasma, aumentando así el consumo de energía para mantener la homeostasis del pH (Martinelle *et al.* 1998; Cruz *et al.*, 2000). El amonio también induce la

apoptosis en células cultivadas, donde se ha observado fragmentación del ADN y disminución del volumen celular, efecto que probablemente esté relacionado con los procesos de transporte que ocurren a nivel de la membrana plasmática (Cruz *et al.*, 2000). Por otra parte, el amonio puede afectar negativamente a la glicosilación de las proteínas producidas a partir del cultivo de células de mamíferos, ya que causa un incremento del pH en los compartimentos del Trans-Golgi, que afecta el funcionamiento de enzimas como las sialil-transferasas y galactosil-transferasas, lo que puede provocar una disminución de ácido siálico (NeuAc) y galactosa (Gal) (Gawlitzek *et al.*, 2000; Yang y Butler, 2002; Butler, 2006; McAtee *et al.*, 2014); además se ha observado que puede inducir variaciones en los sitios de ocupación y el número de ramificaciones, como detallaremos más adelante (Altamirano *et al.*, 2013; McAtee *et al.*, 2014).

3.3- Impacto del metabolismo central del carbono sobre la calidad de la proteína secretada.

El perfil de glicosilación se encuentra entre los atributos de calidad críticos más importantes de las glicoproteínas terapéuticas. El proceso de glicosilación consiste en la adición de glicanos u oligosacáridos a una cadena de polipéptido, como cadenas laterales covalentemente unidos a residuos específicos de aminoácidos. La glicosilación se presenta en dos formas principales, como N-glicosilación y O-glicosilación, que se designan por el grupo funcional de los aminoácidos donde se unen los glicanos (Fan *et al.*, 2015; Blondeel y Aucoin, 2018).

Los N-glicanos se unen mediante enlaces amida a residuos de asparagina y son típicamente oligosacáridos más grandes en comparación con los O-glicanos, que se unen a la serina o treonina mediante enlaces glicosídicos. En las glicoproteínas terapéuticas, la N-glicosilación resulta de mayor relevancia, particularmente con respecto a los AcM, ya que la glicosilación de la región Fc es un factor importante en las funciones efectoras del sistema inmunológico, como la activación del complemento y la unión a los receptores Fc γ de los leucocitos que da lugar a diversas respuestas inmunes (Blondeel y Aucoin, 2018). De manera general, el perfil de N-glicosilación es esencial para asegurar las propiedades fisicoquímicas, biológicas y clínicas de las proteínas terapéuticas; incluyendo estabilidad y plegamiento de la estructura, la solubilidad, el tiempo de vida media en suero, la eficacia y la inmunogenicidad, entre otras (Berger *et al.*, 2012; Butler, 2006; Costa *et al.*, 2013; McAtee *et al.*, 2014). Por lo tanto, el control la N-glicosilación resulta crucial en el procesamiento biológico-farmacéutico, siendo un atributo

de calidad crítico para garantizar tanto la función biológica de estos biofármacos, como la farmacocinética y farmacodinámica de los mismos.

La N-glicosilación tiene lugar en el retículo endoplasmático (RE) y aparato de Golgi a través de varios pasos de reacciones catalíticas impulsados por un repertorio de glicosiltransferasas y glicosidasas (Figura 2). Estas reacciones consisten en la unión de un precursor lípido-oligosacárido dolicol fosfato (Glc3Man9GlcNAc2-PP-dolicol) al sitio de N-glicosilación (secuencia Asn-X-Ser/Thr) de la proteína en cuestión, seguido de una serie de reacciones de remoción de residuos de glucosa y manosa, así como la adición de otros azúcares (N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa (Gal), fucosa (Fuc) y ácido siálico (NeuAc)). Como sustratos, son utilizados los azúcar-nucleótidos UDP-GlcNAc, UDP-Gal, GDP-Fuc y CMP-NeuAc, los cuales son sintetizados en el citoplasma y transportados luego al interior del RE o los diferentes compartimentos de Golgi (*Fan et al., 2015*).

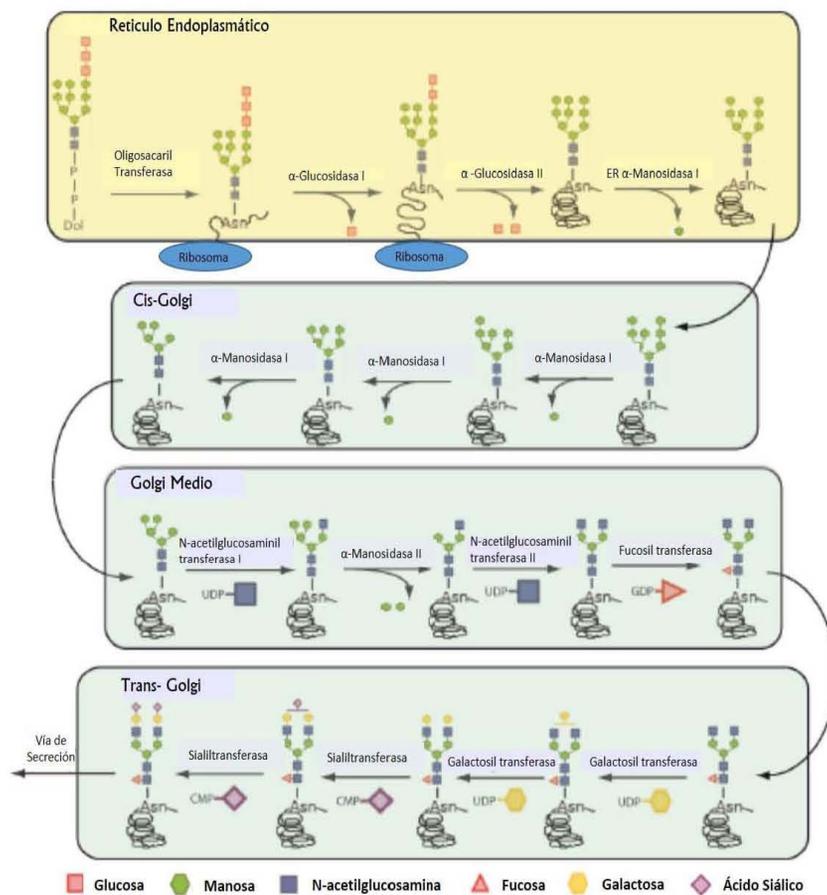


Figura 2: Esquema del proceso de N-glicosilación (*Adaptado de Fan et al., 2015*).

Los patrones de glicosilación son naturalmente y en general heterogéneos. Hay dos fuentes principales de variabilidad en la glicosilación: macroheterogeneidad, que se refiere al hecho de que un sitio particular en la proteína puede estar o no glicosilado; y microheterogeneidad, relacionada con la diversidad de estructuras de glicanos que podemos encontrar en el mismo sitio entre una molécula de proteína y otra. Sin embargo, esta variabilidad natural presenta un desafío particular para la producción de glicoproteínas terapéuticas, donde los patrones de glicosilación deben reproducirse dentro de regiones de tolerancia estrictas definidas por las autoridades reguladoras (*Butler, 2006*).

Los patrones de N-glicosilación son dependientes, en gran medida, de factores tales como la estructura tridimensional de la proteína recombinante, que determina la accesibilidad de las glicosiltransferasas a los sitios de glicosilación (*Butler, 2006; Hills et al., 2001*), el tiempo de residencia en el aparato de Golgi, así como la expresión, localización y actividad de las enzimas de procesamiento de la glicosilación (*Gawlitzeck et al 2000; Pacis et al 2011; Rivinoja et al., 2009; Fan et al., 2015*), y la disponibilidad intracelular de sustratos de azúcar-nucleótidos (*Fan et al., 2015; McAtee et al., 2014; Wong et al., 2010*), todo lo cual conduce a cambios en la heterogeneidad. Varios de estos factores que influyen en el perfil de glicosilación pueden verse a su vez influenciados por cambios en el entorno del cultivo, y además se encuentran estrechamente relacionados directa o indirectamente al metabolismo energético celular.

La disponibilidad de los precursores azúcar-nucleótidos es controlada por el metabolismo central, teniendo en cuenta que son fundamentalmente sintetizados a partir de intermediarios de la vía glicolítica, siendo la glucosa el sustrato principal. La limitación de glucosa puede resultar en una escasez de precursores que conduce a una disminución en la glicosilación, tanto a nivel de los sitios de ocupación como en la complejidad de los glicanos. Se ha demostrado que la restricción de glucosa conlleva a un incremento de formas altas en manosa (formas no maduras), así como una disminución de la galactosilación y sialilación, siendo esta última de gran importancia para el tiempo de vida media de la proteína en sangre (*Nyberg et al., 1999; Butler, 2006*).

Se ha observado que el efecto de la limitación de la glucosa se encuentra fundamentalmente relacionado con la reducción intracelular de UDP-GlcNAc + UDP-GalNAc (UDP-GNAc). *Nyberg et al., (1999)* propusieron, sobre la base del análisis de los niveles de nucleótidos y estimaciones de los flujos metabólicos, un modelo de para explicar los efectos de la limitación de la glucosa y la glutamina que, como hemos visto, es el otro sustrato

esencial para el metabolismo de células CHO. Tales autores mostraron que durante la limitación de glucosa, el carbono disponible se usa preferentemente para la producción de energía, lo que provoca una reducción de la biosíntesis de nucleótidos. Debido a que los trifosfatos de nucleósidos como el UTP se consumen continuamente para la síntesis de ARN, se agotan, afectando la síntesis de UDP-GNAc. Por su parte, el agotamiento de la glutamina disminuye significativamente la formación del azúcar que se activará con UTP, la glucosamina-fosfato, que se forma a través de la reacción enzimática catalizada por la fructosa 6-fosfato amidotransferasa (GFAT), donde la glutamina es donante del amonio requerido.

Por otra parte, la producción de subproductos metabólicos como el lactato y el amonio, liberados durante el catabolismo de la glucosa y glutamina respectivamente, puede afectar también los patrones de glicosilación. En cuanto a la influencia del amonio, se han descrito dos posibles mecanismos para explicar su efecto. El primero de ellos se encuentra relacionado con el aumento observado en la relación UDP-GlcNAc/UTP que se produce por la mayor incorporación del amonio a glucosamina, precursor de UDP-GlcNAc, como vimos anteriormente. Este azúcar-nucleótido compite con el transporte de CMP-NeuAc al Golgi, provocando por una parte incremento en el número de antenas (por una mayor adición de GlcNAc); y por otro, una disminución de la concentración del sustrato disponible para la sialilación (*Gawlitzeck et al., 1998; Grammatikos et al., 1998; Valley et al. 1999; Yang y Butler, 2000*).

El segundo mecanismo plausible para el efecto del amoníaco es que eleva el pH del Golgi, desplazándose así del pH óptimo de las enzimas sialil-transferasas para su actividad (*Grammatikos et al., 1998; Gawlitzeck et al., 2000; Yang y Butler, 2002; Aghamohseni et al., 2014*). El amonio es una base débil capaz de difundir a través de las membranas celulares, impactando el pH intracelular de organelos como Golgi, en el cual las cisternas de *cis*, *medial* y *trans* operan a niveles de pH distintos. *Hassinen y Kellokumpu (2014)*, demostraron que las glicosiltransferasas forman dímeros homoméricos y heteroméricos reversibles, que migran como complejos móviles entre el RE y los diferentes compartimentos de Golgi. Los homodímeros se favorecen más cerca del pH neutro del RE, donde se sintetizan estas enzimas, mientras que la formación de dímeros heteroméricos, con actividad mejorada, se favorece en los puntos de pH reducido de las respectivas cisternas de Golgi donde operan. De este modo, los niveles más altos de amoníaco neutralizarán el pH intracelular de las cisternas de

Golgi, haciendo que los pares de heterodímeros se dividan y vuelvan a adoptar sus formatos de homodímeros, reduciendo su funcionalidad.

En el caso del lactato, aunque no ha sido determinado hasta el momento un efecto directo de este metabolito sobre el patrón de glicosilación, se ha visto que varias de las modificaciones metabólicas realizadas para disminuir su acumulación, pueden afectar negativamente la calidad de la glicoproteína (*Altamirano et al., 2006; McAtee et al., 2014*). Ejemplo de esto, es el trabajo de *Pacis et al. (2011)* quienes encontraron un incremento en la proporción de formas altas en manosa, las cuales son más rápidamente removidas del suero, ante la exposición a mayor osmolaridad en el medio de cultivo, condición que deriva de la adición de bases para controlar la acidificación producida por la acumulación de lactato.

Teniendo en cuenta los aspectos anteriores, sobre la interrelación del metabolismo energético con el adecuado perfil de glicosilación de las glicoproteínas recombinantes producidas en líneas celulares de mamíferos, resulta esencial llevar a cabo un seguimiento cercano sobre el comportamiento de estos patrones, ante cualquier estrategia desarrollada para optimizar el metabolismo celular.

3.4- Estrategias empleadas en la optimización del metabolismo energético en células de mamíferos.

La cantidad de proteína expresada en un cultivo celular es dependiente en general, de la integral en el tiempo de la concentración de células viables y de la productividad celular específica (q_p). En tal sentido, las estrategias de ingeniería celular se han enfocado, principalmente, en extender la longevidad del cultivo, regulando el ciclo de vida y limitando la apoptosis (*Mohan et al., 2008*). Por su parte, la ingeniería metabólica se ha direccionado a incrementar indirectamente el crecimiento celular y la productividad volumétrica, inhibiendo la acumulación de metabolitos tóxicos como el lactato y amonio; además de optimizar la eficiencia del metabolismo central, redireccionando las vías metabólicas a una utilización más eficiente de la energía (*Altamirano et al., 2013*).

Es de destacar que estudios recientes basados en Análisis de Flujos Metabólicos (MFA), han observado consistentemente que las células CHO dependen más de los flujos del TCA y de la fosforilación oxidativa para el suministro de energía, cuando la tasa de producción específica de proteína recombinante (q_p) es la más alta (Figura 3) (*Martínez et al., 2013; Ahn y Antoniewicz, 2013; Templeton et al., 2013; Young, 2014; Vacanti et al.,*

2014; Wahrheit et al., 2014). Este fenotipo metabólico, con flujos respiratorios incrementados, resulta por tanto más deseable en aras de maximizar la productividad celular, siendo el que se intenta promover a través de las diferentes estrategias de ingeniería metabólica.

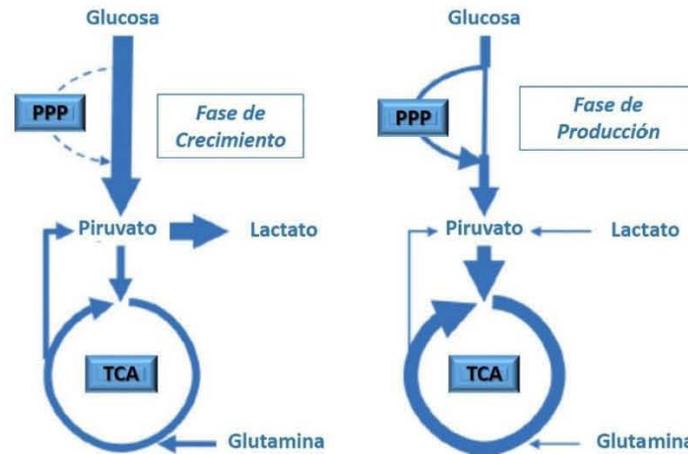


Figura 3: Fenotipos metabólicos durante las fases de crecimiento y producción de cultivos por lote alimentados (Adaptado de Young, 2014). El grosor de las flechas se relaciona proporcionalmente con la magnitud de los flujos de las reacciones o vías representados, las líneas discontinuas indican la presencia de flujos prácticamente despreciables.

Múltiples estrategias han sido diseñadas para optimizar el metabolismo energético y reducir el impacto que los metabolitos de desecho, como el lactato y amonio, suelen tener sobre la producción de glicoproteínas recombinantes en células de mamífero. Estas estrategias se resumen en la figura 4 y podemos agruparlas básicamente, dentro de tres enfoques fundamentales: 1- la reducción de las tasas de consumo de las principales fuentes de carbono, 2- el acoplamiento de la glicólisis y las vías oxidativas y 3- la inhibición de la producción de lactato a través de la LDH.

Como parte de la primera de las aproximaciones mencionadas, el uso de galactosa o fructosa en lugar de glucosa ha demostrado ser una alternativa para evitar la sobreproducción de lactato, debido a que la afinidad de la hexoquinasa para estos azúcares es aproximadamente 20 veces menor que para la glucosa (Altamirano et al, 2006). Sin embargo, aunque se ha visto que la galactosa aumenta la viabilidad celular y la duración de cultivo (Altamirano et al. 2000), se produce una reducción significativa del crecimiento celular. Para mejorar la biomasa celular, se ha propuesto una estrategia de cultivo bifásico (alternando el consumo de glucosa y galactosa) en

cultivos en lotes y de lote alimentado en células CHO, lográndose mayores densidades celulares con una acumulación de lactato significativamente menor (Altamirano et al., 2004; Vergara et al, 2012; Sun et al., 2013;).

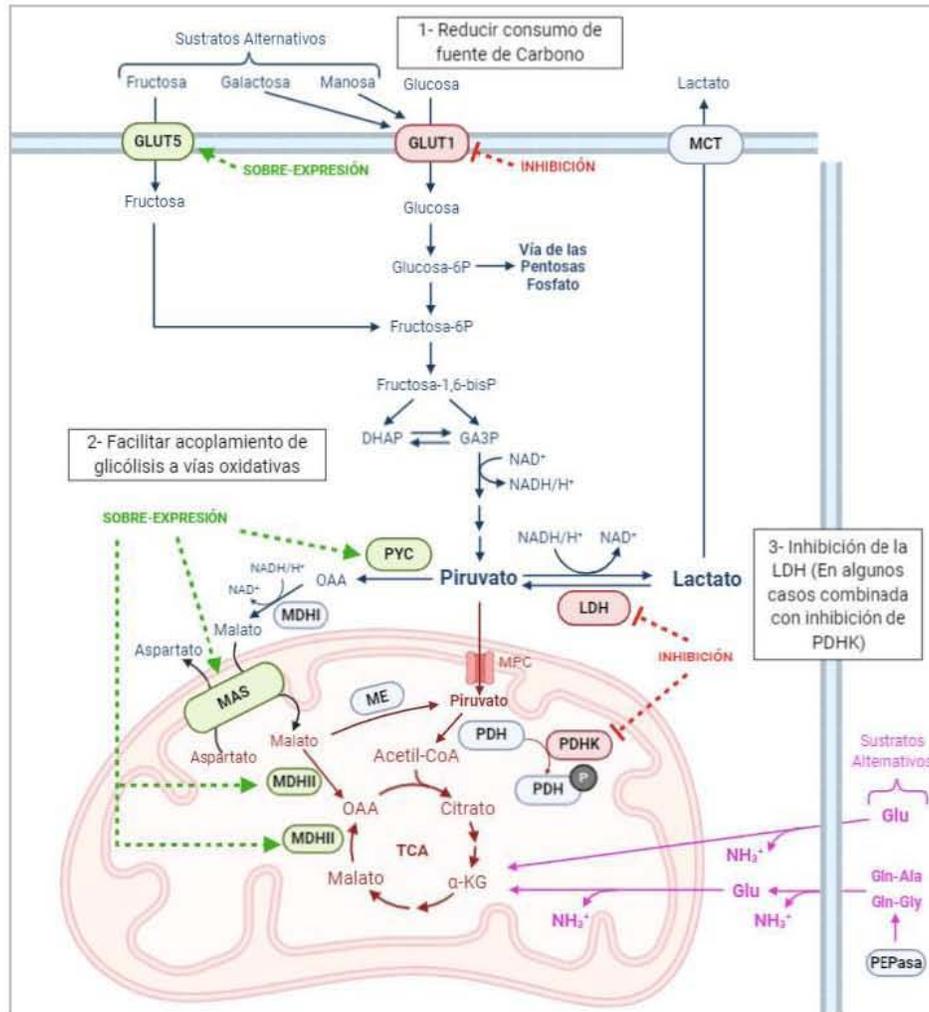


Figura 4: Representación esquemática de las principales estrategias empleadas en la optimización del metabolismo del carbono en células de mamíferos. Leyenda. Líneas azules: etapas citoplasmática principalmente relacionadas con la vía glicolítica; líneas marrón: etapas mitocondriales principalmente relacionadas al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y reacciones anapleróticas; líneas malva: etapas relacionadas a la glutaminólisis; líneas verdes discontinuas: sobreexpresión de enzimas o transportadores; líneas rojas discontinuas: regulación negativa de enzimas o transportadores; elipses verdes: enzimas y transportadores sobreexpresados; elipses rojos: enzimas y transportadores negativamente regulados. GLUT1: Transportador de glucosa isoforma 1; GLUT5: Transportador de glucosa isoforma 5; MCT: transportador de monocarboxilatos; DHAP: dihidroxicetona fosfato; GA3P: gliceraldehído 3-fosfato; PYC: piruvato carboxilasa de levadura; MDH1: malato deshidrogenasa citoplasmática; MDHII: malato deshidrogenasa mitocondrial; LDH: lactato deshidrogenasa; PDH: piruvato deshidrogenasa;

PDHK: piruvato deshidrogenasa quinasa; ME: enzima málica; MAS: Lanzadera de malato-aspartato; OAA: oxalacetato; α KG: α -cetoglutarato; TCA: Ciclo de los ácidos tricarbóxicos; Glu: glutamato; Gln: glutamina; Ala: alanina; Gly: glicina; NH_3^+ : amonio; PEPasa: peptidasa.

También se han desarrollado alternativas al uso de la glutamina para evitar los efectos de un aumento de la concentración de iones amonio, fundamentalmente basadas en la sustitución por glutamato, en células con el sistema de expresión de la glutamina sintetasa (GS) (Altamirano et al., 2000; Hong et al., 2010). El uso de dipéptidos como L-alanil-L-glutamina (disponible comercialmente como GlutaMAX™) ha demostrado ser un sustituto fiable de la glutamina y ha conducido también a una disminución de la acumulación de lactato (Altamirano et al., 2000; Karengera et al., 2017a). Sin embargo, se ha visto que el reemplazo de glucosa y glutamina eventualmente conlleva a un gran impacto en la glicosilación de proteínas recombinantes terapéuticas, teniendo en cuenta que la disminución de los niveles de glucosa intracelular puede afectar la síntesis de azúcar-nucleótidos requeridos en la glicosilación (McAtee et al., 2014; Ha y Lee, 2015; Torres et al., 2018).

Entre las estrategias de ingeniería celular encaminadas al mismo objetivo de entretener el consumo de glucosa, se destacan la regulación negativa del transportador de glucosa GLUT1 en células de hibridoma, lo cual reduce la incorporación de glucosa en casi un 50% y el rendimiento lactato/glucosa en 12% (Paredes et al. 1999).

La sobreexpresión de la isoforma del transportador de glucosa con mayor afinidad por fructosa GLUT5, utilizando fructosa como principal fuente de carbono en el medio de cultivo condujo a una importante disminución de las tasas de producción de lactato y un aumento de la densidad de células viables en comparación a los cultivos alimentados con glucosa en células CHO. Sin embargo, estos resultados dependen en gran medida de la regulación de la expresión del gen *glut5* como fue mostrado por Le et al. (2013), mediante la expresión inducible del gen. Por el contrario, Wilkens y Gerdtzen (2015), que utilizaron una línea celular CHO constitutiva que sobreexpresa GLUT5 en un lote convencional con fructosa como principal fuente de carbono, reportaron un aumento del crecimiento celular y la producción de IgG, pero una producción de lactato similar en comparación con los cultivos basados en glucosa.

La modulación de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) ha sido un blanco ampliamente estudiado para disminuir directamente la producción de lactato, aunque no todos los genes que codifican para las diferentes subunidades de los heterotetrámeros, que dan lugar a las 5 isoenzimas, pueden ser silenciados, ya que se afecta

fuertemente la viabilidad celular (*Sanfeliu et al. 1997*). Sin embargo, varios estudios se han enfocado en la regulación negativa de la LDH mediante la inhibición parcial del gen *LDH-A*, el cual codifica para el tipo de subunidad H, que ha mostrado ser la de mayor afinidad por el piruvato, catalizando mayormente la reacción en el sentido de la conversión de piruvato a lactato (*Hartley et al., 2018*). Los resultados de estos trabajos, aunque han conducido a una disminución de la producción de lactato en la mayoría de los casos, han sido mixtos en la relación del metabolismo del carbono y la producción de proteína recombinante. (*Chen et al. 2001; Jeong et al. 2001; Kim y Lee, 2007; Wilkens et al., 2019*). Un enfoque novedoso en relación a la regulación de la LDH resultó el de *Fu et al. (2016)* quienes desarrollaron una línea celular CHO tolerante al lactato al sobreexpresar la LDH-C, un tipo de subunidad generalmente expresada en esperma animal, que preferencialmente convierte lactato a piruvato. Esto condujo a un mejor crecimiento celular, disminución de la producción de lactato y una respuesta de apoptosis más robusta en las células CHO.

Por otra parte, la regulación de la actividad de *LDH-A* se ha combinado con la modulación de la expresión de otras proteínas que podrían estar asociadas con un fenotipo celular mejorado. Este es el caso de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDHK), la cual regula negativamente el complejo de la piruvato deshidrogenasa impidiendo, por tanto, la incorporación del piruvato al TCA. La inhibición conjunta de *LDH-A* y PDHK condujo a una drástica disminución en la acumulación de lactato (hasta en un 90%) y el aumento en la producción de proteína recombinante (*Zhou et al., 2011*). La suplementación de cultivos de células CHO con dicloroacetato (DCA), un inhibidor de PDHK, disminuyó la producción de lactato, aumentó la concentración de células viables y el título final de anticuerpos (*Buchsteiner et al., 2018*), lo cual apoya la PDHK como un objetivo metabólico relevante en la optimización metabólica. Adicionalmente cabe destacar, que la concentración mitocondrial de piruvato puede naturalmente inhibir la actividad de la PDHK (*Patel y Korotchkina, 2001*), siendo este un hecho a considerar en el diseño de nuevas estrategias.

En función del redireccionamiento del piruvato para evitar la formación de lactato, la sobreexpresión de enzimas anapleróticas, como la piruvato carboxilasa (PC) o la malato deshidrogenasa (MDH), ofrecen un blanco atractivo que ha sido explotado. Muchos estudios han demostrado que la sobreexpresión de PC citosólica de levadura (*PYC2*) disminuye de manera efectiva la producción de lactato, mejora la viabilidad celular y conduce a un uso más eficiente de las fuentes de carbono en las líneas celulares HEK-293, BHK-21 y CHO recombinantes (*Irani et*

al., 1999; Jeong *et al.*, 2001; Elias *et al.* 2003; Fogolín *et al.*, 2004; Toussaint *et al.*, 2016; Gupta *et al.*, 2017a; Karengera *et al.*, 2017a; Karengera *et al.*; 2017b). Sin embargo, estos trabajos no siempre arrojan resultados consistentes con respecto a la producción de proteína recombinante, el consumo de glucosa y la capacidad de las células para cambiar de un fenotipo productor de lactato a consumidor de lactato (Templeton y Young, 2018; Torres *et al.*, 2018). Aunque los estudios más recientes han destacado la influencia que la variación clonal y el proceso de cultivo tienen en la productividad resultante y los niveles de consumo de nutrientes de las líneas celulares que expresan PYC2 (Toussaint *et al.*, 2016; Gupta *et al.*, 2017a). En cuanto a la sobreexpresión de MDHII (isoforma mitocondrial de la enzima MDH), ha mostrado reducción en la producción de lactato e incremento en los niveles de NADH y ATP, pero los efectos sobre el crecimiento celular y producción de proteína recombinante no han sido del todo consistentes (Chong *et al.*, 2010; Wilkens y Gerdtzen, 2015).

La sobreexpresión del transportador mitocondrial Aralar1, que forma parte de la lanzadera malato-aspartato (MAS), en una línea celular CHO productora de lactato, facilitó el cambio metabólico de la producción a consumo de lactato (Zagari *et al.*, 2013b); mientras que la expresión conjunta de esta proteína junto a PYC2 y piruvato quinasa en HEK293, condujo a un mejor balance del metabolismo del piruvato y un incremento en la producción de partículas pseudovirales recombinantes (Xie *et al.*, 2019).

Como se ha visto hasta este punto, hemos discutido las principales estrategias hasta este momento exploradas con la finalidad de contender con el efecto Warburg en células de mamíferos, haciéndolas metabólicamente más eficientes y por tanto, mejores productoras de proteínas recombinantes. Sin embargo, es este un campo con interesantes aristas aún por continuar desarrollando, teniendo en cuenta que aunque el objetivo de la reducción del lactato se logró en la mayoría de estos estudios, no siempre se alcanza un incremento significativo y constante del rendimiento del producto y el crecimiento celular en muchos de ellos se ve comúnmente afectado.

3.5- Papel de Transportador mitocondrial del piruvato en el metabolismo del carbono de células animales.

El piruvato es un eslabón fundamental dentro de la vía central del metabolismo energético celular, al ser el producto final de la glicólisis. Varios estudios han aportado evidencias sobre el cuello de botella existente en la entrada del piruvato a la mitocondria y el papel del transportador mitocondrial del piruvato (MPC), que ha sido

identificado como el complejo proteico responsable del transporte de piruvato a las mitocondrias (*Halestrap, 1975*). Si bien el piruvato puede atravesar libremente la membrana externa de las mitocondrias (a través de porinas o canales no selectivos), necesita el MPC para cruzar la membrana interna y entrar a la matriz mitocondrial (*revisado por Vanderperre et al., 2015*). La identidad molecular del MPC se ha descrito como un complejo multimérico de alrededor de 150kDa, altamente conservado de levaduras a humanos, lo cual implica su relación a funciones celulares fundamentales. Está integrado por múltiples representaciones de un heterodímero, compuesto por las subunidades MPC1 y MPC2 en células de mamíferos, aunque en levaduras se ha descrito que también puede aparecer MPC3 asociado a MPC1 (*Bricker et al., 2012; Herzig et al., 2012; Bender y Martinou, 2016*). El complejo del heterodímero se ha propuesto como unidad funcional en células de mamíferos, ya que se ha demostrado que ambas subunidades deben estar presentes para el adecuado transporte de piruvato. Sin embargo, la estequiometría exacta entre ambas subunidades aún no ha sido determinada para las células de mamíferos y la posibilidad de un ensamblaje oligomérico más grande, no puede ser completamente excluida (*Bender y Martinou, 2016; Tavoulari et al., 2019*).

Al comparar la secuencia del MPC con la de otros transportadores mitocondriales canónicos de la familia SLC25, se ha observado que no poseen gran similitud. Sin embargo, el MPC parece tener estructuras secundarias similares a las de los transportadores de glucosa "semiSWEET" en bacterias como *Vibrio sp.* y *Leptospira sp.*, formando un dímero pseudo-simétrico como el que se muestra en la figura 5 (*Vanderperre et al. 2015*). También, *Halestrap (1975)* encontró que el transporte de piruvato al interior de la mitocondria está asociado a un flujo estequiométrico de protones dependiente de la cadena de transporte de electrones tal y como se representa en la figura 5.

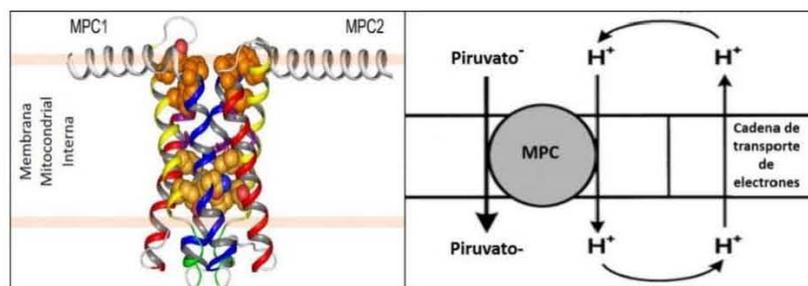


Figura 5: Representación de la estructura del transportador "semiSWEET" de bacterias, un homólogo de la estructura secundaria de MPC (*Adaptado de Vanderperre et al. 2015*) y mecanismo de acción sugerido para MPC (*Adaptado de Halestrap, 1975*).

Diferentes autores han demostrado el papel de MPC en el destino oxidativo del piruvato. *Bricker et al. (2012)* y *Herzig et al. (2012)* reportaron que la delección de *mpc1* en modelos de levaduras y *Drosophila sp.*, conduce a un consumo defectuoso de piruvato por la mitocondria, lo que resulta en la reducción de los intermediarios del TCA y, en consecuencia, la acumulación de intermediarios de la glucólisis. También se ha evaluado el silenciamiento de *mpc1* o *mpc2* en células de mamíferos, mostrándose una reducción en la oxidación del piruvato (*Bricker et al. 2012*). Diversos trabajos de Análisis de Flujos Metabólicos marcando con C^{13} han mostrado, que la inhibición farmacológica o transcripcional del transportador mitocondrial de piruvato resulta en una redistribución de flujos, observándose la oxidación de otros sustratos como lo son ácidos grasos y aminoácidos, especialmente la glutamina, para satisfacer la provisión de intermediarios biosintéticos en el TCA a través de reacciones anapleróticas, y así suplir la profunda supresión de piruvato, todo lo cual resulta en mayor acumulación de lactato y amonio (*Yang et al., 2014; Wahrheit et al., 2014; Vacanti et al., 2015*). *Schell et al. (2014)* encontraron una reducción del efecto Warburg cuando la expresión de *mpc1* y *mpc2* se restauró en diferentes líneas celulares de cáncer de colon que carecían o tenían una expresión insuficiente de MPC1.

Pese a no ser muy amplia la información encontrada en la literatura acerca de la regulación de la expresión de este transportador, se ha descrito que MPC1 se encuentra regulado negativamente por el factor de transcripción II del promotor de la ovalbúmina de pollo (COUP-TFII). Este es un receptor de esteroides presente en células de mamíferos durante etapas del desarrollo embrionario en muchos tejidos, mientras que su expresión suele perderse más adelante en las células diferenciadas. Sin embargo, este factor se ha visto sobreexpresado en diferentes tejidos tumorales como el cáncer prostático y glioblastomas, donde juega un papel fundamental en la progresión del tumor mediante la supresión de *mpc1* y la desregulación, de este modo, del metabolismo de la glucosa (*Wang et al., 2016; Xiao et al., 2018*). Por su parte, en carcinomas renales humanos, se ha encontrado relacionada la expresión de MPC1, a la del co-activador 1-alfa del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma (PGC-1 α). *Koh et al. (2018)* encontraron que PGC-1 α interactúa con el receptor alfa relacionado con estrógenos (ERR- α) y lo recluta, impidiendo su unión a los motivos de elemento de respuesta ERR- α ubicados en el promotor MPC1 proximal, lo que resulta en una activación eficiente de la expresión de MPC1. La baja expresión de PGC-1 α en el carcinoma renal humano podría contribuir a la expresión reducida de MPC, resultando en una capacidad respiratoria mitocondrial deteriorada al limitar el transporte de piruvato a la matriz mitocondrial.

Todos estos antecedentes sobre el papel esencial del MPC en la regulación del catabolismo de la glucosa, sugieren la sobreexpresión del mismo como un blanco atractivo de la ingeniería metabólica para reducir la producción de lactato en células de mamíferos empleadas en la producción biofarmacéutica. En un reciente trabajo *Xie et al. (2019)*, sobreexpresaron *mpc3* de levadura (entre otras modificaciones realizadas) en células HEK-293, encontrando una disminución en la producción de lactato y una producción estimulada de partículas pseudovirales recombinantes. Este es un resultado promisorio, pese a no haberse incluido la sobreexpresión de *mpc1*, que es el gen cuya expresión se ha visto mayormente suprimida en células cancerígenas.

Teniendo en cuenta los hechos anteriores y la semejanza del comportamiento fenotípico entre las células tumorales y las líneas celulares inmortalizadas, planteamos la hipótesis de que una presencia disminuida del MPC en las células CHO podría ser el cuello de botella para el importe de piruvato y la posterior oxidación mitocondrial, lo que desencadena una alta producción de lactato. De esta forma, la sobreexpresión de ambas subunidades MPC1 y MPC2 de mamíferos en células CHO, podrá favorecer, en mayor medida, la entrada de piruvato a la mitocondria y lograr un mayor rendimiento energético, menor acumulación de lactato y un incremento en la productividad y calidad de glicoproteínas recombinantes expresadas en este sistema. En una primera aproximación a este objetivo, mediante el trabajo desarrollado por *Gómez (2017)* en nuestro grupo, fueron sobreexpresadas en células CHO-S, las secuencias *mpc1* y *mpc2* de ratón, que codifican para subunidades del transportador mitocondrial del piruvato. De este modo, el presente trabajo, representa una continuidad al curso de esa estrategia, donde se evaluará la sobreexpresión de ambas subunidades del transportador mitocondrial de piruvato (MPC1 y MPC2) en las células CHO-S, así como el efecto de dicha sobreexpresión en el desempeño metabólico de las células modificadas genéticamente, la productividad de las mismas y la calidad de glicoproteínas recombinantes producidas en este sistema.

IV. HIPÓTESIS

La sobreexpresión del transportador mitocondrial de piruvato en células CHO promueve una utilización más eficiente de la glucosa como fuente de carbono, disminuyendo la producción de metabolitos de desechos como lactato y amonio, y favoreciendo la producción de proteínas recombinantes.

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar las modificaciones metabólicas inducidas por la sobreexpresión del transportador mitocondrial de piruvato en células CHO-S y su repercusión en la productividad y calidad de glicoproteínas heterológamente expresadas en este sistema.

Objetivos Específicos

- 1- Evaluar la sobreexpresión de las subunidades MPC1 y MPC2 del transportador mitocondrial de piruvato en células CHO con diferentes construcciones moleculares de los genes de interés.
- 2- Determinar cómo influye la sobreexpresión del transportador mitocondrial de piruvato sobre el desempeño cinético y metabólico en los cultivos de las líneas MPC recombinantes, produciendo proteínas heterólogas de manera transitoria y estable.
- 3- Diseñar clonas estables de la línea celular CHO-S con elevada expresión de las subunidades MPC1 y MPC2 del transportador mitocondrial de piruvato, que co-expresen la secuencia codificante de la fosfatasa alcalina humana secretada como proteína recombinante modelo.
- 4- Evaluar el efecto de la sobreexpresión del transportador mitocondrial de piruvato sobre perfil de glicosilación de la fosfatasa alcalina humana secretada, co-expresada en el sistema como glicoproteína modelo.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Sección A: Evaluación de las líneas estables no clonales CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1

6.1- Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se utilizó la línea celular comercial CHO-S® (A1155701, Invitrogen), así como las líneas celulares recombinantes estables CHOmpc1mpc2, CHOmpc2mpc1 y CHO-EGFP; derivadas de CHO-S previamente obtenidas por Gómez, (2017). Las dos primeras líneas sobreexpresan el transportador mitocondrial de piruvato y solo difieren en el orden de los genes *mpc1* y *mpc2* recombinantes (secuencias de *Mus musculus*) dentro de los casetes de expresión del vector pCHO 1.0 (A13696-01, Invitrogen) con el que fueron transfectadas. Por su parte, la tercera línea expresa el gen de la proteína verde fluorescente y se utilizó como línea celular control para varios de los análisis desarrollados a lo largo de este trabajo.

Las líneas celulares fueron subcultivadas cada tercer día en matraces Erlenmeyer de 125 mL, a 0.4×10^6 células/mL en 30 mL de medio CD FortiCHO (A1148301, Gibco) suplementado con L-glutamina 8 mM. Los cultivos se mantuvieron a 37°C, 96% de humedad, en una atmósfera de aire enriquecido con CO₂ al 8% y 130 rpm de agitación. El conteo celular y la viabilidad se evaluaron mediante un Multisizer™ Coulter Counter® (Beckman) y exclusión con azul de tripano en cámara de Neubauer, respectivamente.

6.2- Análisis de expresión relativa de *mpc1* y *mpc2* mediante RT-qPCR

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar específicamente secuencias *mpc1* y *mpc2* de *Cricetulus griseus* (secuencias nativas) y *Mus musculus* (secuencias recombinantes), así como para β-actina que se utilizó como gen de referencia. Las secuencias codificantes de estos genes, fueron obtenidas a partir de la base de datos de GeneBank (National Center for Biotechnology Information-NCBI). De los oligos diseñados, los cuales se muestran en la tabla 1, se analizaron las propiedades de T_m, %GC, formación de horquillas y auto-dimerización, utilizando el programa en línea OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies).

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados en la RT-qPCR

Especie	Gen	Oligonucleótido (5'→3')	Fragmento (pb)	Acceso NCBI
<i>Cricetulus griseus</i>	<i>cMpc1</i>	GTC TCC CCA TTG CTG CCA TC	86	XM_007611488.1
		GGAATAGCAACAGAGGGCG		
	<i>cMpc2</i>	CTG CTG CCA GAG AAA TTG AG	108	XM_003502283.2
		AGC TAA TCC AGC ACA CAC C		
	<i>β-actina</i>	AGC TGA GAG GGA AAT TGT GCG	95	NW_003613618.1
		AGGAAGAGGATGCAGCAGTG		
<i>Mus musculus</i>	<i>mMpc1</i>	GAG CAA GGA CTT CCG GGA C	82	NM_018819.4
		GAT AGC AGC AAT GGG GAG AC		
	<i>mMpc2</i>	GGC AGG CCC CAG AAC AGT TT	109	NM_027430.2
		CTG AGC TGT GCT GAG TTT CTC		

El ARNm de las líneas celulares CHOmpc1mpc2, CHOmpc2mpc1 y CHO-S, se extrajo usando el Kit “RNeasy Mini Spin Technology” (74104, Qiagen). El ARN extraído fue tratado con Turbo DNase (AM2238, Invitrogen), se cuantificó a 260 nm (NanoDrop 1000, ThermoScientific) y la pureza se verificó mediante las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230. La integridad del ARN se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %. La RT-qPCR se realizó utilizando el mismo contenido de 50 ng de ARN por muestra, en un termociclador Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies), utilizando el kit “Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QRT-PCR Master Mix” (600886, Agilent Technologies).

La expresión relativa (ER) de la transcripción se determinó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Brevemente, este método consiste en comparar las Ct (del inglés, *Threshold Cycle*, ciclo umbral de detección de fluorescencia, que es inversamente proporcional a cantidad de transcrito inicial), de los genes objetivo en las muestras a analizar, normalizadas con respecto al gen de referencia ($\Delta Ct_{obj,ref}$), en relación a la muestra control también normalizada ($\Delta Ct_{ctrl,ref}$), según se describe en las siguientes ecuaciones:

$$ER = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\text{Donde: } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{obj,ref} - \Delta Ct_{ctrl,ref} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$\text{siendo, } \Delta Ct_{obj,ref} = Ct_{obj} - Ct_{ref(obj)} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$\text{y } \Delta Ct_{ctrl,ref} = Ct_{ctrl} - Ct_{ref(ctrl)} \quad (\text{Ecuación 4})$$

6.3- Análisis de expresión de las proteínas MPC1 y MPC2 por Western blot

Para el análisis de la expresión de proteínas MPC1 y MPC2 se llevó a cabo la extracción de proteínas mitocondriales siguiendo el protocolo descrito por *Bahnemann et al.*, (2014). En tal sentido, se partió de 1×10^8 células de los cultivos de las líneas celulares CHOmpc1mpc2, CHOmpc2mpc1 y el control de células CHO-S. Se centrifugaron a $500 \times g$ durante 5 minutos y el pellet celular fue resuspendido en 5 mL de buffer MIB (0.2 mM de EDTA, 0.25 M de Sacarosa y 10 mM de Tris-HCl, pH 7.4) al cual se le añadió un coctel de inhibidores de proteasa (539131, Merck). Los homogenados fueron luego sonicados con 3 pulsos de 15 segundos cada uno, pausando 5 segundos, con una amplitud del 10%, seguido de 3 centrifugaciones consecutivas a 2000, 4000 y $7500 \times g$, de 5 minutos cada una y reservando siempre el sobrenadante. Posteriormente se centrifugó a $9500 \times g$ durante 10 minutos, siendo luego el pellet resuspendido en 200 μ L de buffer MIB.

De aquí se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford en placas de 96 pozos utilizando una curva estándar de BSA (albúmina de suero bovino) y midiendo la absorbancia a 595 nm. 20 μ g de las muestras, previa desnaturalización a 99°C por 5 minutos, fueron cargadas a un gel de poliacrilamida (15 %) para ser luego transferidas a una membrana de PVDF. La inmunodetección se realizó utilizando como anticuerpos primarios anti-MPC1 y anti-MPC2 (D2L9I y D4I7G, Cell Signaling), a una concentración 1:1000, y como secundario un anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano (HRP, 1:5000; SC-2004, Santa Cruz Biotechnology). La proteína HSP60 se usó como control de carga y se detectó con un anticuerpo anti-HSP60 de ratón (1:1000; GTX25478, Genetex) y como secundario una IgG anti-ratón de cabra conjugada a HRP (1:5000; SC-2005, Santa Cruz Biotechnology). Las membranas se revelaron con Luminata Forte Western HRP (WBLUF0500, Millipore) y se analizaron en un fotodocumentador Chemi-doc (Bio-rad) utilizando el software Image Lab 6.0.1.

6.4- Localización mitocondrial de MPC1 y MPC2 mediante Inmunofluorescencia

Para el ensayo de Inmunofluorescencia, las líneas celulares CHOmpc1mpc2, CHOmpc2mpc1 y CHO-S se sembraron a 1×10^5 células/pozo en placas Lab-Tek TM II Chamber SlideTM (154534, Thermo Scientific) previamente recubiertas con poli-L-lisina (P4707, Sigma Aldrich). Posteriormente las células fueron tratadas con 350 μ M de Mitotracker Deep Red (M22426, Invitrogen), incubándose a 37°C por 30 minutos. Luego se fijaron con

p-formaldehído al 4 % durante 15 minutos y se permeabilizaron tratando con Triton X-100 al 0.2 % por 10 minutos. Las placas se bloquearon con una solución de BSA al 3 %, suero al 10 % y glicina 10 mM en PBS 1X, seguido de la adición de los anticuerpos primarios anti-MPC1 o anti-MPC2 (1:100) y luego el anticuerpo secundario (anti IgG de conejo acoplado a Alexa-fluor 488 (A11008, Invitrogen), con incubaciones de 1 h en cada uno de estos pasos. Finalmente se utilizó DAPI en una concentración 1:2000 para la tinción de núcleos, y se realizó la detección de fluorescencia mediante un microscopio multifotónico Olympus FV1000 invertido con un objetivo 60X. Se obtuvieron 16 *Z-stacks* y el análisis de imágenes se realizó con el software ImageJ (Colocalization_Coloc2).

6.5- Determinación de consumo de oxígeno

La tasa de consumo de oxígeno (OCR, por sus siglas en inglés *Oxygen Consumption Rate*) se evaluó utilizando un analizador Seahorse XF96 (100900-400, Agilent Technologies), el cual permite medir el OCR en tiempo real, a intervalos de aproximadamente 5-8 minutos. Las mediciones en este equipo se realizan aislando un volumen pequeño de medio (alrededor de 2 μ L) sobre una monocapa de células dentro del pozo de una microplaca. El consumo de oxígeno causa cambios rápidos y fácilmente medibles en la concentración de oxígeno disuelto dentro de la "microcámara transitoria" (200 μ m de altura) formada entre la monocapa celular y los sensores. Una vez completada cada medición, las sondas se levantan, lo que permite que el resto del volumen de medio del pozo se mezcle con el de la microcámara, restaurando los valores de la celda a la línea base. Posteriormente, un sistema integrado de inyección permite la adición secuencial de hasta cuatro compuestos por pozo a intervalos definidos.

En el presente estudio se utilizó el Mito-Stress Test Kit (103015-100, Agilent Technologies), que incluye una combinación de agentes inhibitorios y desacoplantes de la Cadena de Transporte de Electrones (CTE). Las células se sembraron en 180 μ L de medio de ensayo Seahorse XF Base Medium (102353-100, Agilent Technologies) suplementado con 20 mM de piruvato y 2 mM de glutamina, basado en las concentraciones utilizadas por *Bricker et al. (2012)* y *Schell et al. (2014)* para este tipo de ensayo. Se estudiaron las líneas celulares CHOmpc1mpc2, CHOmpc2mpc1, así como CHO-EGFP (*Gómez, 2017*) y CHO-S como control, las cuales se sembraron en placas Seahorse XF-96 (101085-004, Agilent Technologies) previamente recubiertas

con poli-L-lisina (P4707, Sigma Aldrich). Las concentración óptima de células por pozo a utilizar, así como de los diferentes compuestos a añadir fueron seleccionadas a partir de ensayar 80,000; 100,000 y 120,000 células/pozo; 1 y 2 μM de oligomicina; 0.25, 0.5, 1 y 2 μM de carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP); mientras que para la mezcla equimolar de rotenona/actimicina se utilizó la concentración de 0.5 μM recomendada por el fabricante por ser suficiente para anular la respiración mitocondrial para la mayoría de las células animales en las densidades usadas. Los experimentos realizados se programaron para tomar 3 mediciones de respiración basal (sin la adición de ningún modulador) y 3 posteriores a la adición de cada uno de los compuestos. Los datos de OCR se normalizaron con respecto al contenido de proteína total por muestra, la cual se midió mediante el método de BCA (ácido becincónico). Los resultados de 24 réplicas biológicas, de cada línea celular evaluada, se analizaron estadísticamente mediante una prueba de t de Student.

6.6- Construcción de vectores de expresión para transfecciones transitorias

Los plásmidos pVAX1-hSEAP y pCHO-AcM se usaron para la expresión transitoria de las proteínas recombinantes modelo fosfatasa alcalina humana secretada (hSEAP) y un AcM humano que reconoce la proteína E del virus Zika (EDE1-C8), respectivamente. La secuencia de hSEAP se obtuvo a partir de una línea celular CHO-DG44 productora de la enzima (*Lipscomb et al., 2005*), bajo el promotor inducible MMTV (del inglés: *Mouse Mammary Tumor Virus*). Tras 72 h de la inducción con dexametasona, se extrajo el ARN (74104, Qiagen), comprobándose su integridad mediante electroforesis. A partir del ARN purificado se obtuvo el ADNc (K1631, Thermo Scientific), para posteriormente amplificar la secuencia codificante de hSEAP con los oligonucleótidos HindIII-hSEAP-Fwd y XhoI-hSEAP-Rev diseñados para tal fin, cuya secuencia de bases se muestra en el Anexo 4. La secuencia de hSEAP previamente amplificada fue clonada al vector pVAX1 (V260-20, ThermoFisher Scientific) (Anexo 3) doblemente digerido con las enzimas HindIII y XhoI (R0104L y R0146M, NEB).

Para la construcción del plásmido pCHO-AcM, las secuencias codificantes de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo EDE1-C8 (*Rouviniski et al., 2015*) fueron sintetizadas (previa optimización de codones) por la empresa LakePharma y clonadas, en los casetes de expresión del plásmido pCHO 1.0 (A13696-01, Invitrogen). Después de la transformación en *E. coli DH5 α* quimiocompetentes, aislamiento de colonias y purificación por miniprep (D4020, Zymo Research), los vectores resultantes se verificaron mediante PCR, restricción y secuenciación.

6.7- Cinéticas de crecimiento de las células CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1 con expresión transitoria de proteínas heterólogas.

Se utilizaron las líneas celulares estables CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1 en dos cinéticas de cultivo en lote donde produjeron de forma transitoria hSEAP o AcM en cada caso. Como control del estudio se incluyó la línea celular CHO-EGFP para simular una carga metabólica equivalente a la aportada por la sobreexpresión de *mpc* en las líneas celulares de interés. Cada una de las líneas celulares fueron transfectadas mediante lipofección utilizando el reactivo FreeStyle Max (16447-100, Invitrogen), con los vectores pVAX1-hSEAP en la primera cinética y pCHO-AcM en la segunda. En paralelo a cada una de las cinéticas, se realizaron transfecciones de células CHO-S con el plásmido equivalente, pero expresando una Proteína Verde Fluorescente (pVAX1-EGFP y pCHO-EGFP), con el objetivo de evaluar la eficiencia de transfección en cada caso.

Los cultivos cinéticos se desarrollaron por triplicado para cada una de las líneas celulares estudiadas, a partir de las transfecciones transitorias realizadas. Se partió en cada caso de una concentración celular de 1×10^6 células/mL y los cultivos fueron monitoreados cada 24 horas en cuanto a densidad celular (X_v), porcentaje de viabilidad, concentración de proteína y de metabolitos como la glucosa, lactato, glutamina y glutamato. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t de Student.

6.8- Determinación de concentraciones y tasas de producción específicas

La determinación de concentración de células viables (X_v) y viabilidad se realizó mediante el método de exclusión en cámara de Neubauer utilizando azul de tripano. Las concentraciones de glucosa, lactato, glutamina, glutamato y amonio se midieron en un analizador bioquímico YSI 2950D (Yellow Springs Instruments, USA), que se basa en la reacción de oxidación del metabolito con enzimas específicas inmovilizadas sobre una membrana, liberando peróxido de hidrógeno que es a su vez oxidado en el ánodo de platino para generar electrones y, por tanto, una señal cuantificable.

Para evaluar la concentración de la proteína recombinante fosfatasa alcalina (hSEAP), se utilizó un ensayo de actividad enzimática, en el cual se evalúa la cinética de aparición de p-nitrofenol (PNP) como resultado de la hidrólisis del p-nitrofenol fosfato (PNPP) catalizada por esta enzima según la reacción:



El ensayo enzimático de hSEAP fue adaptado de *Lipscomb et al. (2005)*. Brevemente, se transfirieron 100 μL de muestras de sobrenadante sin células (o diluciones de las mismas) a pozos individuales de una placa de 96 pozos; se añadieron 100 μL de solución de reacción 2X (dietanolamina 1M y MgCl_2 0.5 mM) y se incubó por 10 min a 37 °C. Tras la adición de 20 μL de 150 mM p-nitrofenil fosfato (PNPP), se monitoreó el cambio de absorbancia en el tiempo ($\text{DO}_{405}/\text{min}$) a intervalos de 5 segundos durante un minuto, usando un lector de microplacas (FLUOstar Omega Bio Assay Reader, BMG Biotechnology). Se calculó la pendiente de la curva (a), la cual puede relacionarse con la concentración de hSEAP en términos de UI/mL (Ecuación 5), considerando la relación molar que existe entre la aparición de PNP con la hidrólisis de PNPP, y que por definición, 1UI de hSEAP es capaz de hidrolizar 1 $\mu\text{mol}_{\text{PNPP}}/\text{min}$ a pH 9.8 y 37 °C.

$$[\text{hSEAP}] = \left(\overbrace{\frac{A_{405}}{\text{min}}}_{\text{Pendiente de Regresión}} \right) \left(\overbrace{0.192 \frac{\text{mmol PNP}}{A_{405}}}_{\text{Pendiente de Curva de PNP}} \right) \left(\overbrace{\frac{1000 \mu\text{mol PNP}}{1 \text{mmol PNP}}}_{\text{Factor de Conversión}} \right) \left(\overbrace{0.00022 \text{ L}}_{\text{Volumen de Reacción en el pozo}} \right) \left(\overbrace{\frac{1}{0.1 \text{mL}}}_{\text{Fracción de Muestra}} \right) (\text{Dilución}) \quad (\text{Ecuación 5})$$

El factor $0.192 \text{ mmol}_{\text{PNP}}/A_{405\text{nm}}$, se obtuvo de manera experimental, como la pendiente de la recta de regresión de una curva estándar de concentración de PNP (0.00195, 0.0039, 0.0078, 0.0156, 0.0313 y 0.0625 mM) contra $A_{405\text{nm}}$ (Anexo 5), determinada en el mismo lector de microplacas (FLUOstar Omega Bio Assay Reader, BMG Biotechnology). Para obtener la concentración de enzima, se consideró que $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ hSEAP = 0.73 UI/mL (*Davis et al., 1992*).

La concentración del AcM se determinó mediante ELISA usando un IgG-UNLB anti-humano F(ab')₂ de cabra como anticuerpo de captura (2042-01, Southern Biotech, USA), y un anticuerpo anti-humano anti-IgG-AP de cabra (2040-04, Southern Biotech, USA) conjugado a fosfatasa alcalina.

A partir de las mediciones realizadas, se determinaron los parámetros cinéticos:

- Velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{\max}): Pendiente de la regresión lineal (en el intervalo de máximo ajuste) del logaritmo neperiano del cociente de la concentración de células vivas (X_v) entre la concentración inicial (X_{v0}), contra el tiempo, durante la fase exponencial del cultivo:

$$\ln\left(\frac{X_v}{X_{v0}}\right) = \mu(t - t_0) \quad (\text{Ecuación 6})$$

- Velocidad específica global de producción de la proteína recombinante (q_p^\dagger) se calculó a partir de la pendiente de la regresión lineal (en el intervalo de máximo ajuste) de la concentración de proteína (P) contra la integral de células vivas (IVCD) como fue propuesto por *Dutton et al. (1999)*:

$$P = q_p^\dagger (IVCD) \quad (\text{Ecuación 7})$$

$$\text{donde, } IVCD = \sum \frac{X_{v(i+1)} - X_{v(i)}}{\ln\left(\frac{X_{v(i+1)}}{X_{v(i)}}\right)} \Delta t \quad (\text{Ecuación 8})$$

- Velocidad específica de producción de la proteína recombinante (q_p) se calculó de manera puntual como:

$$q_p = \mu \frac{\Delta P}{\Delta X_v} \quad (\text{Ecuación 9})$$

- Productividad volumétrica global se determinó como:

$$q_v = \frac{\Delta P}{\Delta t} \quad (\text{Ecuación 10})$$

- Rendimientos de producción o consumo global de los diferentes metabolitos cuantificados (M):

$$Y_{[M]/X_v} = \frac{\Delta M}{\Delta X_v} \quad (\text{Ecuación 11})$$

Sección B: Desarrollo y evaluación de clonas estables sobreexpresando MPC y Fosfatasa Alcalina (hSEAP) como proteína recombinante modelo.

6.9- Construcción de vectores de expresión

El vector utilizado para expresión estable de hSEAP fue el plásmido comercial pMONO-blasti-mcs (04A22-MT, InvivoGen) (Anexo 6). Este es un plásmido de aproximadamente 3.5 kb, el cual presenta un promotor de ferritina compuesto por el promotor 1 del núcleo de la cadena pesada de ferritina (FerH) fusionado en su extremo 5' con el potenciador de SV40, y en su extremo 3' con el intrón 5'UTR que contiene el intrón del gen alfa del factor 1 de elongación de ratón. Además, este vector posee un sitio interno de unión al ribosoma (IRES) proveniente del virus de la fiebre aftosa, que permite la expresión del gen de resistencia a blasticidina bajo el control del mismo promotor del gen de interés.

La secuencia codificante de hSEAP fue amplificada a partir del plásmido pVAX1-hSEAP (previamente obtenido), utilizando los oligonucleótidos EcoRV-hSEAP-Fwd y Sall-hSEAP-Rev (Anexo 4), y posteriormente clonada en el vector pMONO-blasti-mcs doblemente digerido con *EcoRV-HF* y *Sall* (R3195L y R0138L, NEB). La selección de los plásmidos pMONO-blasti-hSEAP correctamente ligados se llevó a cabo mediante transformación en bacterias quimiocompetentes *E. coli DH5α* en medio LB sólido con blasticidina (100 µg/mL), seguido de PCR de colonia, después de 16 h de incubación de los cultivos a 37 °C.

Adicionalmente se obtuvo el plásmido p-MONO-blasti-EGFP a partir de clonar en pMONO-blasti-mcs, la secuencia de EGFP, previamente amplificada del vector pVAX1-EGFP (Rodríguez, 2014) con los oligos EcoRV-EGFP-Fwd y Sall-EGFP-Rev (Anexo 4), siguiendo el mismo protocolo para la selección.

Los vectores generados fueron purificados utilizando el kit Miniprep (D4020, Zymo Research) y posteriormente verificados mediante PCR, restricción y secuenciación.

6.10- Transfecciones y selección de clonas

Las líneas celulares CHOmpc1mpc2 y CHO-S como control, fueron transfectadas mediante lipofección con el plásmido pMONO-blasti-hSEAP, utilizando el reactivo FreeStyle Max (16447-100, Invitrogen) y siguiendo la metodología propuesta por el fabricante. Se utilizó el plásmido pMONO-blasti-EGFP para determinar la eficiencia de la transfección en células CHO-S.

Posterior a las 48 h de las transfecciones, se verificó la eficiencia mediante el conteo de células fluorescentes con respecto al total y se evaluó la producción transitoria de fosfatasa alcalina en las células transfectadas con el vector pMONO-blasti-hSEAP a través del ensayo de actividad enzimática anteriormente descrito. Una vez comprobado el éxito de las transfecciones se inició el proceso de selección añadiendo a los cultivos una concentración de blasticidina de 5 µg/mL e incubando en frascos T-150 con una densidad celular de 5×10^5 células/mL, a 37 °C, 8 % de CO₂ y sin agitación durante 7 días. Al término de este período y una vez observados signos de recuperación en cuanto a la concentración celular y viabilidad, los cultivos se pasaron a frascos agitados (130 rpm) y la concentración del antibiótico se fue incrementando en el transcurso de los pases sucesivos hasta un máximo de 20 µg/mL con el fin de maximizar la producción de la proteína recombinante con el incremento de la presión selectiva. Al alcanzarse una viabilidad celular superior al 90 % en la condición de mayor concentración de agentes de selección, se generaron bancos celulares de cada uno de los cultivos y se verificó la producción de la proteína de interés (hSEAP) mediante el ensayo de actividad enzimática.

A partir de los cultivos de las líneas celulares estables no clonales obtenidas: CHOmpc1mpc2-SEAP y CHO-SEAP, se realizó dilución limitante. Considerando una concentración teórica de 1 célula por pozo (1 célula/ 200 µL de medio FortiCHO suplementado con 6 mM de glutamina), se sembraron 6 placas de 96 pozos para CHOmpc1mpc2, y 2 placas para CHO-S, llevándose a cabo la selección clonal con apoyo del equipo IncuCyte (Sartorius), que permite monitorear en tiempo real el crecimiento y discernir la clonalidad. De las clonas obtenida se seleccionaron las de mayor producción de hSEAP, según ensayo enzimático y las de mayor sobreexpresión de MPC mediante Western blot.

6.11- Cinéticas de crecimiento de clonas estables CHOmpc1mpc2-SEAP

Se realizaron cinéticas de cultivo en lote alimentado, de las clonas estables de CHOmpc1mpc2 co-expresando hSEAP (CHOmpc1mpc2-SEAP), suplementando con glucosa y L-glutamina para mantener niveles mínimos de 20 y 2 mM, respectivamente. Los cultivos para caracterización cinética se desarrollaron por triplicado para cada una de las clonas evaluadas, incluyendo como control una clona procedente de la línea celular CHO-SEAP. Cada clona se inoculó en una concentración celular de 0.5×10^6 células/mL y los cultivos fueron monitoreados cada 24 horas en cuanto a densidad celular (X_v), porcentaje de viabilidad, concentración de hSEAP y de los metabolitos: glucosa, lactato, glutamina, glutamato y amonio, mediante los ensayos previamente descritos en la sección 5.8. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t de Student.

6.12- Producción y purificación de hSEAP

Se realizaron 6 cultivos en lote de 2 clonas productoras de hSEAP: una clona procedente de la línea celular CHOmpc1mpc2-SEAP y la otra clona derivada de CHO-SEAP. Para ello, se inocularon matraces de 250 mL con una concentración celular de 0.5 células/mL en 50 mL de medio FortiCHO suplementado con 8 mM de glutamina. El sobrenadante fue cosechado a las 120 h y se concentró con centricones de 10kDa hasta un volumen de 5 – 10 mL. Se realizó cambio de solución tampón por diálisis, realizando 10 cambios con un volumen de 1 L de Solución de Columna 1X (Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 8) cada 12 h y utilizando membranas de 12 – 14 kDa. Seguidamente se procedió a la purificación cromatográfica, donde se utilizó la resina de afinidad Agarosa-ácido L-histidildiazobencil-fosfónico (H-6758, Sigma) equilibrando con Solución de Columna 1X y eluyendo con un gradiente de 0 a 100 % de fosfato de sodio 100 μ M. Las fracciones colectadas fueron ensayadas para actividad enzimática, juntando las positivas correspondientes a la elución, las cuales fueron concentradas con Centricon de 10 kDa y secadas al vacío en el sistema Speed Vac hasta un volumen de alrededor de 100 μ L. Se comprobó la pureza mediante SDS-PAGE y se procedió a la extracción de los N-glicanos.

6.13- Análisis del perfil de N-glicosilación de hSEAP por HPLC

El análisis del perfil de N-glicanos se realizó mediante el método de Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica (HILIC, por sus siglas en inglés) *Guile et al. (1997)*. Las muestras de hSEAP purificadas (aproximadamente 100 µg de cada muestra) se desnaturalizaron a 99°C durante 5 minutos en una solución de 2 % SDS, β-mercaptoetanol 1 M, y se digirieron con 1 U de PNGasa F (362185, Merck) durante 15 h a 37 °C para separar los oligosacáridos. Se adicionó 0.1 nmol de maltosa a cada muestra como control interno. Los N-glicanos liberados fueron derivatizados con 2-aminobenzamida (2AB) según el protocolo descrito en el manual del fabricante (GKK-404, Agilent Technologies) y separados por HPLC en una columna Fase normal TSKgel Amido-80 (13071, Tosoh Bioscience) con gradiente de acetonitrilo 100 % y formato de amonio 250 mM pH 4.4. La muestra de glicanos-2AB se inyecta al cromatógrafo en una alta concentración de solvente orgánico, donde se absorbe a los grupos funcionales polares de la columna por la interacción con los grupos hidroxilo de los azúcares, luego son eluidos por un gradiente acuoso y detectados por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 330 nm y de emisión de 420 nm, utilizando un sistema cromatográfico Alliance Bio e2796 (Waters Corp.). Los glicanos más pequeños, con menos grupos hidroxilo (menos hidrofílicos), eluyen a bajas concentraciones de solvente acuoso y por lo tanto, antes que los glicanos más grandes (más hidrofílicos). Se utilizó un estándar de escalera de glucosa (D-3818, Sigma) marcada con 2AB para asignar unidades de glucosa a los tiempos de retención de los principales picos identificados en las muestras, a través de una ecuación polinomial. Los cromatogramas fueron integrados utilizando el programa Empower 2 (Waters Corp.) La cantidad de las especies de glicanos es reportada como porcentaje (abundancia relativa) de la cantidad total detectada excluyendo el pico de maltosa. Las estructuras fueron propuestas para cada pico basadas en su migración en unidades de glucosa y la susceptibilidad a digestiones individuales con exoglicosidasas. Las exoglicosidasas utilizadas fueron: α-manosidasa 1.2 U (GKX-5010, Agilent Technologies), α-fucosidasa 20 mU (GKX-5006, Agilent Technologies), β-N-acetilhexosaminidasa 50 mU (GKX-5003, Agilent Technologies), β-galactosidasa 1.2 U (GKX-5013, Agilent Technologies) y sialidasa 12 mU (GKX-5021, Agilent Technologies).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sección A: Evaluación de las líneas estables no clonales CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1

7.1- Sobreexpresión de MPC en líneas celulares CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1

Las líneas celulares estables no clonales CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1 fueron previamente obtenidas por Gómez (2017), con el fin de sobreexpresar las subunidades MPC1 y MPC2 del transportador mitocondrial de piruvato como estrategia de ingeniería metabólica para reducir los niveles de lactato producido en células CHO. Estas líneas fueron obtenidas a partir de la transfección estable de células CHO-S (A1155701, Invitrogen) con los vectores recombinantes pCHOmpc1mpc2 y pCHOmpc2mpc1, resultantes de la clonación de las secuencias *mpc1* y *mpc2* de ratón (*Mus musculus*) en el plásmido comercial pCHO 1.0 (A13696-01, Invitrogen), variando el orden de los genes dentro de los casetes de expresión que poseen diferentes promotores híbridos.

Como parte del primer objetivo del presente trabajo, se evaluó el nivel de sobreexpresión de *mpc1* y *mpc2* en las líneas recombinantes CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1, a nivel transcripcional mediante RT-qPCR. Para la realización del ensayo, la pureza del ARN extraído de las líneas celulares se comprobó mediante la determinación de las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230, las cuales fueron mayores a 1.8 en todos los casos. La integridad de ARN fue confirmada por electroforesis en un gel de agarosa donde se observa una relación de 2:1 de las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y 18S (Figura 6).

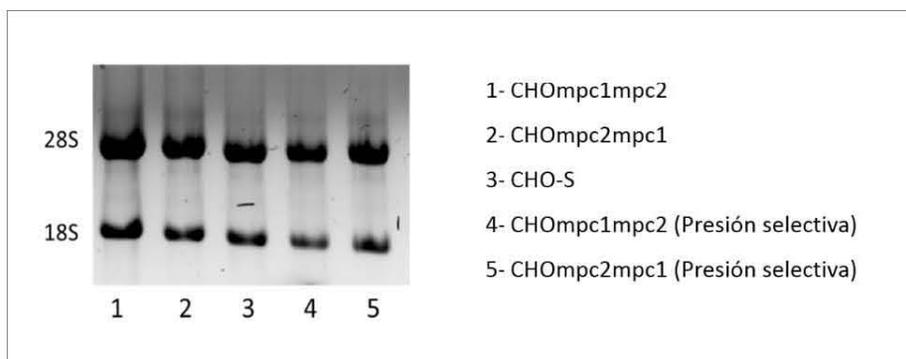


Figura 6: La purificación del ARN para RT-qPCR mostró la calidad adecuada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

La figura 7 muestra los resultados obtenidos a partir de la RT-qPCR, donde los datos se encuentran referidos al cambio relativo en los niveles de expresión de ARNm del gen objetivo (*mpc1* o *mpc2*) en las líneas celulares MPC recombinantes con respecto al del grupo control CHO-S. Como se puede observar, las líneas celulares se evaluaron con y sin adición de presión selectiva, consistente en la adición al cultivo, de los agentes utilizados durante selección de las líneas celulares en su máxima concentración (metotrexato (MTX) 1 mM y puromicina 50 µg/mL), siendo las células con dicho tratamiento las que exhibieron mayores niveles de expresión de los genes analizados. De aquí se evidencia, que al ser un cultivo policlonal, es decir, con una población celular heterogénea, en la cual el nivel de expresión de las proteínas heterólogas es heterogéneo, resulta deseable mantener la presión selectiva con el fin de favorecer la proliferación de las células con mayor número de copias de los genes de resistencia y nuestros genes de interés. Por tanto, se decidió mantener esta condición en los cultivos para el resto de los experimentos a realizar con estas líneas celulares en lo adelante.

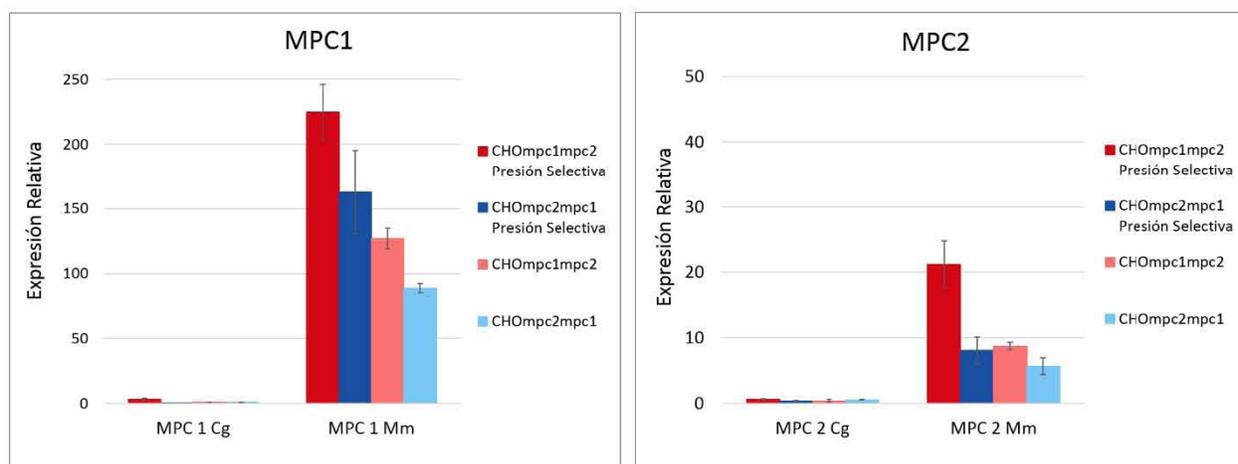


Figura 7. Sobreexpresión de los genes *mpc1* y *mpc2* de las líneas MPC recombinantes en relación con CHO-S, evaluado por RT-qPCR. MPC1_{Cg} y MPC2_{Cg}, genes nativos de *Cricetulus griseus*; MPC1_{Mm} y MPC2_{Mm}, genes recombinantes de *Mus musculus*. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar entre cuatro réplicas independientes.

Se encontró que la expresión relativa del gen recombinante *mpc1* de *M. musculus* (MPC1_{Mm}) resultó significativamente superior ($p < 0.0001$), con valores de 224.8 y 162.9 en las líneas celulares CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1 respectivamente, en relación con la expresión del gen nativo de *C. griseus* (MPC1_{Cg}) que solo alcanzó 3.32 y 0.54. La sobreexpresión de *mpc2* recombinante de *M. musculus* (MPC2_{Mm}) fue menor con respecto a *mpc1*, ya que solo alcanzó entre 21.2 y 8.1 para las células CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1,

respectivamente. No obstante, dichos valores fueron significativamente mayores ($p < 0.005$) que la expresión basal de *mpc2* nativo de *C. griseus* (MPC2_{cg}) para ambas líneas celulares, que correspondió a 0.6 y 0.4, respectivamente. Estos resultados confirmaron la sobreexpresión del transportador a nivel transcripcional en ambas líneas celulares estables MPC recombinantes CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1.

Aunque se puede apreciar que la expresión relativa del gen *mpc1* recombinante fue casi 10 veces mayor que la de *mpc2*, este hallazgo podría estar relacionado con las diferencias en los procesos de regulación a nivel transcripcional de cada gen. Algunos autores han sugerido que el promotor *mpc1* en su contexto nativo, está regulado negativamente por el factor de transcripción II del promotor de la ovalbúmina de pollo (COUP-TFII), el cual es un receptor de esteroides que está sobreexpresado en tejidos tumorales (Wang *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta la semejanza fenotípica entre las células cancerígenas y las líneas celulares inmortalizadas como las de las células CHO, es posible que exista también una sobreabundancia de COUP-TFII y que el mecanismo de regulación negativa que este ejerce sobre el promotor de *mpc1* en el contexto nativo, esté disminuyendo su expresión; mientras que la expresión recombinante de *mpc1* puede estar sobre regulada, ya que el gen heterólogo se encuentra bajo el control de un promotor constitutivo (CMV/EF1 o EF2/CMV del pCHO1.0), el cual no se ve afectado por la acción de COUP-TFII. Como resultado, el margen de diferencia entre la expresión recombinante del gen *mpc1* en relación con el nativo, puede ser mucho mayor que el encontrado en *mpc2* entre recombinante y nativo.

En el caso de *mpc2*, no parece estar sujeto a regulación transcripcional negativa, lo cual puede encontrarse relacionado al hecho de que la variación de su expresión no resulte tan acentuada como la de *mpc1* a este nivel. Hasta el momento, para este gen solo se ha descrito que en un modelo específico de adenocarcinoma prostático, se encuentra sobre-regulado por la vía del factor de transcripción del receptor de andrógeno, como consecuencia del requerimiento de estas células de mantener activo el TCA para su función de secreción de citrato (Bader *et al.*, 2019), mecanismo que no presenta analogía con las células CHO. Por otra parte, se ha demostrado que aunque MPC2 puede formar homodímeros (Nagampalli *et al.*, 2018), estos no resultan funcionales de manera natural (Bricker *et al.*, 2012; Tavoulari *et al.*, 2019). Por tanto, la inhibición de *mpc1*, puede ser suficiente como estrategia metabólica de las células inmortalizadas para potenciar el efecto Warburg.

Como se observa en la figura 7, los niveles de expresión de ambos genes *mpc* recombinantes resultaron más altos en la línea celular CHOmpc1mpc2, lo que podría deberse a la influencia de un mayor número de copias de los genes *mpc* integrados durante el proceso de recombinación, así como por el sitio de integración cromosómica. Este último fenómeno tiene un efecto crucial en la tasa de transcripción génica, y ha sido descrito como "efecto de posición" (Wilson et al., 1990; Barnes et al., 2003; Lai et al., 2013). Adicionalmente, se conoce que el MTX utilizado en el proceso de selección de las líneas celulares, como parte del sistema de amplificación del gen *dhfr*, puede conducir a heterogeneidad genética (Kim y Lee, 1999; Kim et al., 2001; Jun et al., 2005) la cuál podría ser fuente adicional de variaciones en el nivel de expresión de *mpc* entre ambas líneas celulares recombinantes. La capacidad del MTX para promover la ruptura de la doble cadena en el DNA (DBS, del inglés *Double Strand Break*), incluso suprimiendo en algunos casos los genes mediadores de reparación de DBS y generando reordenamientos genéticos, ha sido previamente documentada (Xie et al., 2016). Sin embargo, para el alcance del presente trabajo, la existencia de heterogeneidad en los niveles de expresión de *mpc* entre las líneas celulares, resulta un hallazgo oportuno, que permitirá abordar su repercusión en el desempeño metabólico en el transcurso del este trabajo.

Cuando se emplean promotores fuertes, como los que se encuentran controlando la expresión de los genes *mpc* en las líneas celulares CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1, generalmente se obtienen altos niveles de transcripción génica, pero esto no siempre se traduce en una alta producción de la proteína de interés. Para verificar si se logró una mayor producción de MPC recombinante con respecto a las células CHO-S, se analizaron mediante Western blot, muestras enriquecidas en proteínas mitocondriales. La sobreexpresión de MPC1 y MPC2 en las líneas celulares CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1, se muestra en la figura 8 y se corroboró mediante análisis densitométrico de las imágenes (Tabla 2).

Además de la evidencia de la mayor expresión de las proteínas MPC en las líneas recombinantes con respecto al control, se observó una mayor producción de las subunidades para CHOmpc1mpc2 en comparación con CHOmpc2mpc1, lo cual correlaciona con los niveles de transcripción de ARNm más altos en esta línea celular, mostrados anteriormente.

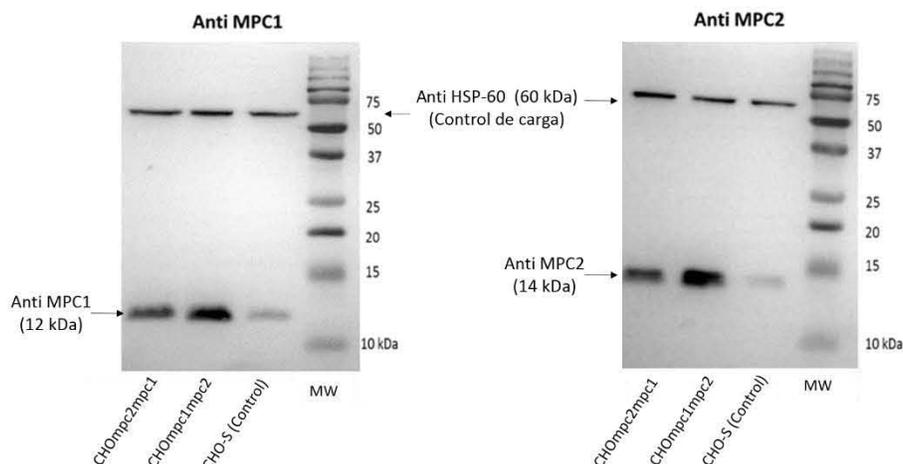


Figura 8. MPC1 y MPC2 son detectadas en mayor proporción en las líneas MPC recombinantes, mediante Western blot, a partir de muestras enriquecidas en mitocondrias, con igual cantidad de proteína cargada.

Tabla 2: El análisis densitométrico de las imágenes de Western blot para la detección de las proteínas MPC1 y MPC2, corrobora la mayor abundancia en las líneas recombinantes no clonales CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1.

Líneas celulares	MPC 1			MPC 2		
	Intensidad de la Banda Principal	Intensidad de la Banda del Control de Carga	Intensidad Normalizada de la Banda Principal	Intensidad de la Banda Principal	Intensidad de la Banda del Control de Carga	Intensidad Normalizada de la Banda Principal
CHO-S	2,616,750	5,346,855	0.49	968,161	2,633,822	0.37
CHOmpc1mpc2	12,809,496	5,822,502	2.20	8,344,892	3,077,748	2.71
CHOmpc2mpc1	8,997,795	5,391,630	1.67	4,873,435	3,543,785	1.38

Teniendo en cuenta que la recombinación de plásmidos en el genoma de la línea celular del huésped es un proceso estocástico (Lai *et al.*, 2013), estas diferencias en la expresión de las dos subunidades MPC entre ambas líneas celulares podrían estar relacionadas más bien con el desigual número de copias de los genes de interés y/o su posición en el cromosoma (efecto de posición), en lugar de estar influenciado por la fortaleza de los promotores, como se discutió anteriormente. Los genes incorporados dentro del genoma de las células huésped

no siempre son estables y a menudo son blanco de reordenamientos genéticos que también podrían alterar la integridad de los genes endógenos (*Barnes et al., 2003*). Sin embargo, usando el mismo plásmido comercial pCHO 1.0, *Li et al. (2016)* demostraron que es posible obtener una integración transgénica en la región telomérica 1q13 del cromosoma 1 de las células CHO-S, lo que puede conducir a una expresión proteica eficiente. Esto puede explicar la mayor concentración de proteína obtenida para la línea celular CHOmpc1mpc2.

Por otra parte, es de destacar que al nivel de la proteína producida, no se encontraron las diferencias tan marcadas entre MPC1 y MPC2 recombinante, que se habían anteriormente observado en la expresión transcripcional de dichos genes. Este comportamiento para MPC1 coincide con lo reportado anteriormente por diversos grupos, en cuanto a que el número de copias del transgen o la elevada expresión de ARNm, no correlaciona proporcionalmente con el aumento en la producción de proteína recombinante (*Mohan et al. 2008; Barnes et al. 2003, 2007; Ku et al. 2009*); lo cual sugiere que después de cierto umbral de la cantidad de ARNm, los pasos que limitan la velocidad en la producción, pueden ser procesos de traducción o postraduccionales (*Lim et al. 2010*). Es conocido que los altos niveles en la expresión de una proteína recombinante, como es el caso de MPC1, a la cual le fue suprimido el mecanismo nativo de sub-regulación transcripcional, pueden exceder la capacidad de procesamiento del retículo endoplasmático (RE). Esto generalmente conlleva a la acumulación de proteína mal plegada en el RE, que desencadena una serie de mecanismos reguladores que forman parte de los que se conoce como la “Respuesta a Proteínas no Plegadas” (*UPR*, por sus siglas en inglés). Dentro de los mecanismos de la UPR que pueden estar regulando los niveles de MPC1 recombinante producida, se encuentran tanto la degradación del ARNm mediante el mecanismo conocido como “decaimiento regulado dependiente de IRE1” (*RIDD*, por sus siglas en inglés), como la “degradación de la proteína asociada al RE” (*ERAD*, por sus siglas en inglés), fenómeno mediante el cual las proteínas mal plegadas o procesadas incorrectamente, son transportadas desde el ER al citoplasma a través de translocones, después de lo cual se ubiquitinan para ser degradadas través del proteasoma (revisado por *Hussain et al., 2014*).

Es importante hacer referencia además, que aunque la estructura tridimensional, así como estequiometría exacta del complejo MPC, no han sido hasta la fecha completamente dilucidadas, se ha demostrado el heterodímero MPC1-MPC2 (o MPC1-MPC3 en el caso de levaduras) como unidad funcional del transportador (*Bricker et al., 2012; Tavoulari et al., 2019*), y varios trabajos han evidenciado que no se presenta una acumulación de la

proteína de una subunidad en ausencia de la otra, aun cuando exista una robusta expresión de ARNm (*Schell et al., 2014; Tavoulari et al., 2019*). Por lo tanto, cabe esperar que las proporciones de MPC1 y MPC2 dentro del complejo sean equivalentes, y que el exceso de MPC1 que pudiera ser producido, no pueda acumularse y se encamine a vías de degradación, aún en el caso de que la UPR no fuera activada.

7.2- Localización subcelular de MPC1 y MPC2 recombinante mediante Inmunofluorescencia.

Para corroborar experimentalmente que las proteínas MPC recombinantes sobreexpresadas en las líneas celulares CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1, estuvieran en la localización mitocondrial esperada, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia y análisis mediante microscopía confocal.

La figura 9 ilustra el análisis de las imágenes captadas a partir de las muestras celulares de CHOmpc1mpc2, tomando en consideración que CHOmpc2mpc1 presentó el mismo comportamiento. Podemos observar la presencia de patrones muy similares para los canales rojo y verde (Figuras 9b y 9c), en el área citoplasmática celular, que rodea el espacio correspondiente a los núcleos, los cuales se visualizan en la figura 9a. Dichos canales rojo y verde corresponden, respectivamente, al marcador mitocondrial específico (Mitotracker) y al MPC marcado a través de un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 488. La superposición de ambos canales produjo la aparición de píxeles amarillos (Figura 9d), lo cual refleja la colocalización de ambas subunidades MPC en las mitocondrias.

Adicionalmente se realizó una determinación cuantitativa del grado de colocalización mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson (PCC), el cual es un parámetro estadístico que mide la covarianza píxel a píxel, de los niveles de señal de dos imágenes. Tomando en cuenta, que para la determinación del PCC, se le resta la intensidad media a cada valor de intensidad de píxel, este coeficiente resulta independiente de los niveles de la señal y del desplazamiento de la señal (fondo), por lo cual se consideró de utilidad su determinación para el presente análisis. El valor del PCC puede variar de 1 a -1, siendo 1 para una correlación positiva completa, -1 para una correlación negativa o cero cuando no hay correlación. En el análisis de colocalización de MPC1 y MPC2 con Mitotracker, se obtuvieron valores de PCC de 0.78 y 0.85, respectivamente, indicativos de un adecuado grado de correlación, que corrobora la presencia de estas proteínas en la mitocondria.

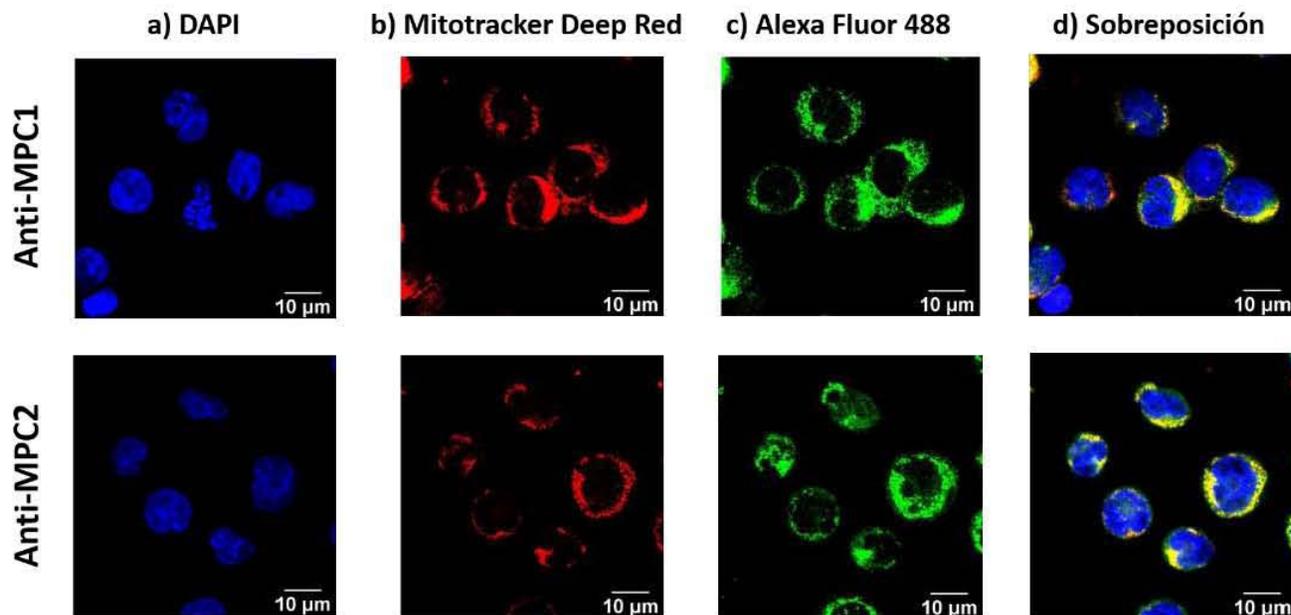


Figura 9. Localización mitocondrial de MPC1 y MPC2 recombinantes en células CHOmpc1mpc2 por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Las imágenes representan la proyección de máxima intensidad de 16 Z-stacks de 0.49 µm de espesor con un aumento de 60X. a) marcaje con DAPI para visualizar núcleos celulares a 460 nm; b) marcaje con Mitotracker Deep Red, 665 nm; c) marcaje con un anticuerpo secundario anti-γFc de conejo acoplado a Alexa Fluor 488; d) Imágenes superpuestas de canales azul, rojo y verde.

En el caso del análisis de las células control CHO-S, no se encontró señal perceptible en el canal verde correspondiente al marcaje específico de MPC1 y MPC2, como se puede apreciar en la figura 10. Esto puede estar relacionado a una débil sensibilidad de este ensayo, para detectar la escasa abundancia de estas proteínas en las células parentales, considerando además que la especificidad reportada por el fabricante de los anticuerpos primarios anti-MPC1 y anti-MPC2 utilizados, es para el reconocimiento de proteínas de ratón, pero no así para el caso de las proteínas de hámster que son las nativas de células CHO. Sin embargo, para el alcance de los objetivos del presente trabajo, este ensayo permitió reconocer que ambas subunidades MPC recombinantes, sobreexpresadas en las líneas celulares CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1, colocalizan en las mitocondrias, donde pueden formar un complejo funcional.

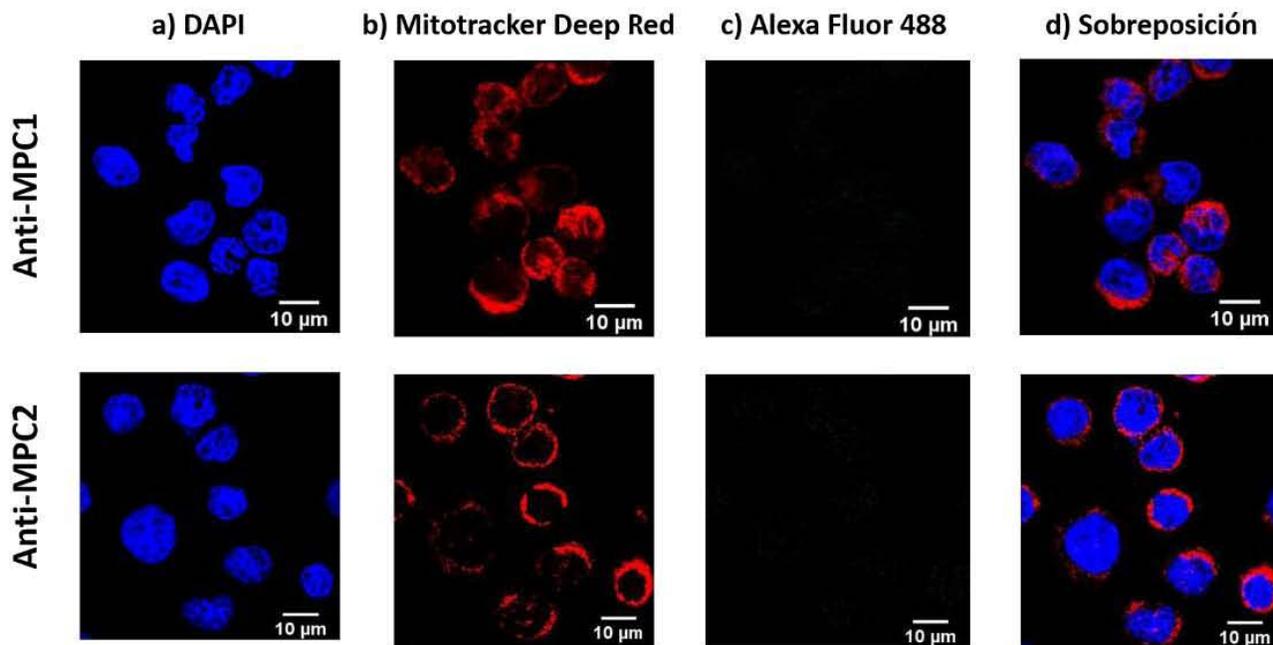


Figura 10. Las células CHO-S (control), tratadas por inmunofluorescencia, no mostraron señal perceptible del reconocimiento de las subunidades MPC1 y MPC2 nativas en las imágenes captadas por microscopía confocal. Las imágenes representan la proyección de máxima intensidad de 16 Z-stacks de 0.49 µm de espesor con un aumento de 60X. a) marcaje con DAPI para visualizar núcleos celulares a 460 nm; b) marcaje con Mitotracker Deep Red, 665 nm; c) marcaje con un anticuerpo secundario anti-γFc de conejo acoplado a Alexa Fluor 488; d) Imágenes superpuestas de canales azul, rojo y verde.

7.3- Análisis de la tasa de respiración celular en las líneas celulares CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1.

El consumo de oxígeno es un parámetro fundamental relacionado con el requerimiento energético de la célula y está directamente asociado a la función mitocondrial (Strovas *et al.*, 2010). En este trabajo, la tasa de consumo de oxígeno (OCR) se calculó como una medida indirecta de la función del MPC, utilizando piruvato como sustrato principal. La función del MPC está relacionada con el consumo de oxígeno ya que a mayor velocidad del consumo de piruvato por las mitocondrias, se incrementa la disponibilidad de equivalentes de reducción (NADH y FADH₂) para la cadena de transporte de electrones (CTE), con el correspondiente aumento del consumo de oxígeno por parte de la célula.

Se utilizó el kit “Agilent Seahorse XF Mito-Stress Test” para evaluar los parámetros críticos de la función mitocondrial, incluidos la OCR basal, la respiración máxima y la capacidad de respiración de reserva. A partir de

la evaluación de diferentes concentraciones celulares y de los compuestos inhibidores del kit, se establecieron las condiciones óptimas de ensayo para utilizar 80,000 células/pozo, 2 μM de oligomicina y 0.5 μM de FCCP. El criterio para definir la cantidad de células a sembrar por pozo se basó en el intervalo de sensibilidad de medición del equipo y se consideraron las menores concentraciones de cada agente capaces de promover el efecto deseado en la disminución o incremento de la respiración celular, para el número de células seleccionado.

La figura 11a muestra el perfil de respiración obtenido en la evaluación de las líneas celulares CHOmpc1mpc2, CHOmpc2mpc1, así como los controles de CHO-S y CHO-EGFP. Esta última fue incluida con el propósito de emular la carga metabólica conferida en las otras líneas recombinantes, por la expresión de MPC. En la figura, podemos observar que las primeras 3 mediciones corresponden a la respiración basal de las células, sin adición de ningún modulador. Seguidamente, cuando se añade oligomicina, inhibidor de la ATP sintasa, se observa una caída en el consumo de oxígeno. Esta caída resulta de la inhibición del flujo electrónico como consecuencia del bloqueo de la subunidad Fo de la ATP sintasa, que inhabilita esta vía para el retorno de los protones a la matriz mitocondrial, por lo cual el costo (energía libre) del bombeo de protones contra el gradiente iguala la energía liberada por la transferencia de electrones desde el NADH al O_2 y se detiene el flujo de electrones (*Nelson y Cox, 2017*). Luego al adicionarse FCCP, que al ser un ionóforo actúa como desacoplante de la CTE disipando protones del espacio intermembrana, se incrementa el transporte de electrones en aras de mantener el gradiente electroquímico y por tanto, el consumo de oxígeno como aceptor final. Este comportamiento corresponde a la capacidad respiratoria máxima de la célula. Es importante destacar que la adición de oligomicina previo a la del FCCP, cumple la finalidad de prevenir la actividad reversa de la ATP sintasa, que conlleva a la necesidad de utilizar mayores concentraciones del desacoplante, mientras que por otra parte, la rápida depleción del ATP intracelular podría conducir a una disfunción metabólica y muerte celular (*Ruas et al., 2016*). Finalmente la adición de rotenona-actimicina, que inhiben los complejos I y III de la CTE respectivamente, anula por completo el consumo de oxígeno mitocondrial.

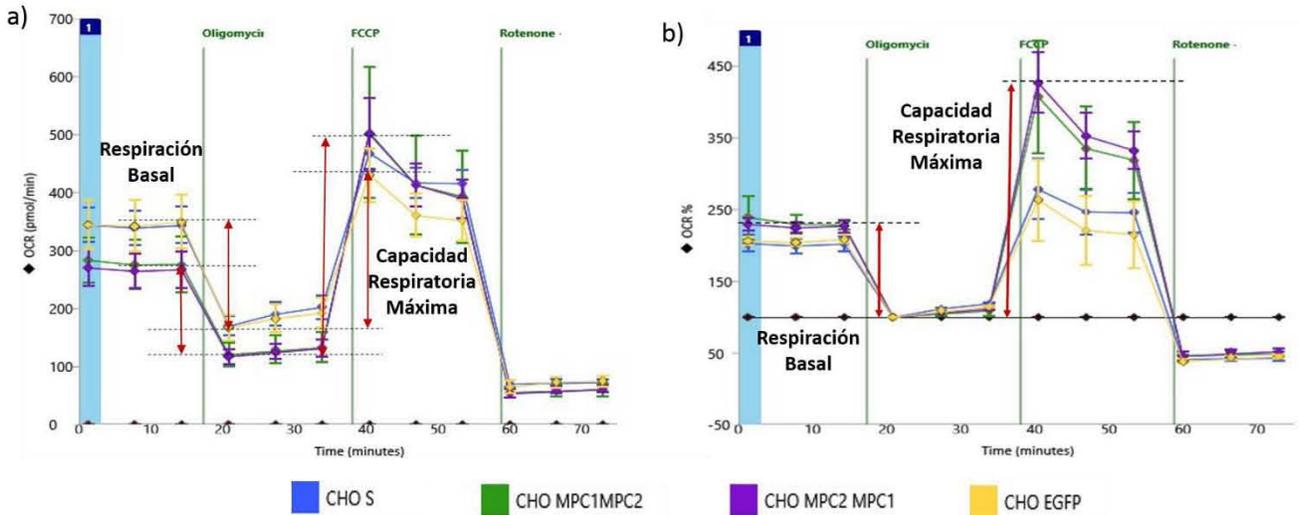


Figura 11: El perfil de respiración en Seahorse difiere entre las diferentes líneas celulares MPC recombinantes y las líneas control. a) Velocidad de consumo de oxígeno en las diferentes condiciones inducidas; b) Porcentaje de consumo de oxígeno con respecto a las mediciones de OCR tras la inhibición de la síntesis de ATP con oligomicina.

Como puede apreciarse en la figura 11a, se observan diferencias en los niveles de respiración basal entre las distintas líneas celulares estudiadas, que se relacionan con el grado de disminución alcanzado tras la adición de oligomicina. Este comportamiento puede encontrarse principalmente relacionado con un desigual número de células sembradas para las diferentes líneas celulares, pues, aunque se contemplaron 80,000 células por pozo en el cálculo teórico, el mismo se encuentra condicionado por la imprecisión del método de conteo celular en cámara de Neubauer. Por esta razón, se consideró tomar las mediciones de OCR como línea base, y de este modo, la figura 11b muestra el porcentaje con respecto a la misma, del consumo de oxígeno basal y de la respiración máxima; donde se evidencia un incremento del porcentaje de consumo de oxígeno para las líneas MPC recombinantes en ambas condiciones.

Adicionalmente se decidió normalizar la OCR con respecto a la concentración de proteínas totales de las células determinada mediante BCA, con la finalidad de independizar los valores de respiración medidos, de la variabilidad aportada por el número de células sembradas. Estos resultados se muestran en la figura 12. Se puede observar que, en las condiciones basales (Figura 12a), la sobreexpresión de MPC solo promovió un pequeño incremento del consumo de oxígeno para las células CHOmpc1mpc2, que fue la línea celular que mostró la mayor expresión de MPC, aunque este aumento resultó significativo desde el punto de vista

estadístico. Sin embargo, no se observó diferencia para CHOmpc2mpc1 en estas condiciones. Por su parte, el efecto de la sobreexpresión del MPC en la OCR se hizo evidente en ambas líneas MPC recombinantes, cuando se estimuló la respiración máxima mediante la adición secuencial de oligomicina y FCCP (Figura 12b). La oligomicina suprime la síntesis de ATP, causando una caída en la OCR, valor que se toma como línea base para calcular la respiración máxima tras la adición de FCCP, que desencadena el flujo máximo a través de la CTE.

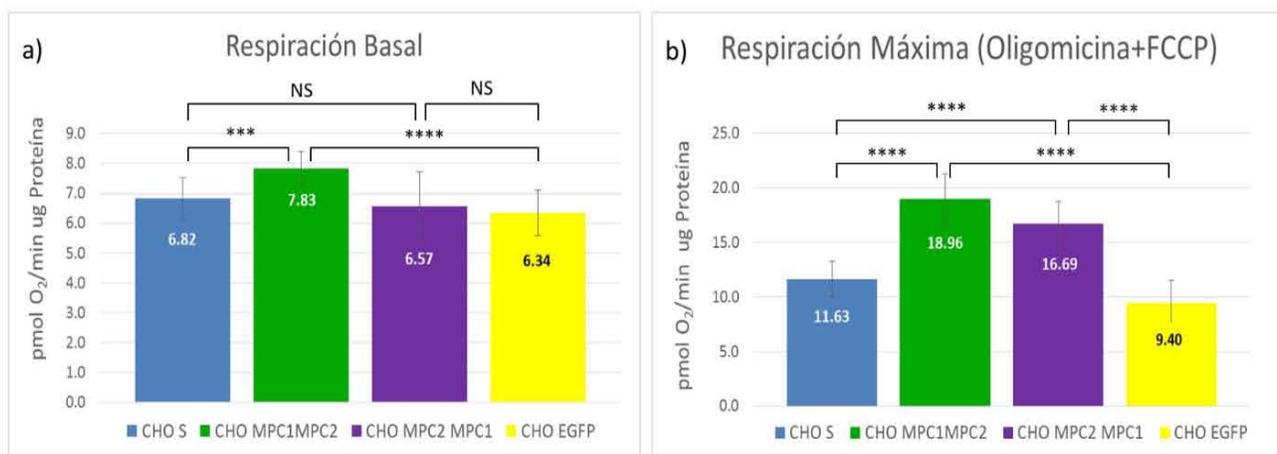


Figura 12: La sobreexpresión de MPC promueve incremento de la tasa de consumo de oxígeno en diferentes condiciones. a) Respiración mitocondrial basal (sin moduladores) incrementada en la línea celular de mayor expresión de MPC (CHOmpc1mpc2) b) Respiración mitocondrial máxima (tras adición secuencial de Oligomicina y FCCP) incrementada en ambas líneas MPC recombinantes. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles CHO-S y CHO-EGFP: (****) $p < 0.0001$, (***) $p < 0.001$ y (NS) No significativo

Este incremento en la respiración celular máxima, obtenida para las líneas celulares MPC recombinantes con respecto a las líneas control CHO-S y CHO-EGFP, revela la capacidad respiratoria adicional conferida por la sobreexpresión del transportador. Dicho comportamiento puede explicarse considerando que en presencia de una condición de estrés, como la adición del desacoplante, las células que sobreexpresan MPC pueden suministrar mayor cantidad de equivalentes de reducción a la CTE, debido a un flujo mejorado de piruvato hacia el TCA, que podría ser sin embargo, un paso limitante para células control, tanto CHO-S como CHO-EGFP. En el caso de esta última, se pudo apreciar que aunque su comportamiento fue bastante similar a CHO-S, los valores de respiración resultaron ligeramente inferiores, dado probablemente por el efecto de la carga metabólica que genera la producción de la proteína EGFP, sin poseer la contribución de la sobreexpresión del MPC. Estos resultados indican que en las líneas celulares CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1, se produjo la adecuada

formación del complejo MPC1-MPC2 recombinante, que se requiere para el transporte de piruvato, según se determina a partir de la capacidad funcional del transportador para incrementar la tasa de respiración celular (Bricker *et al.*, 2012; Herzig *et al.*, 2012; Schell *et al.*, 2014; Bender *et al.*, 2015; Vanderperre *et al.*, 2015; Tavoulari *et al.*, 2019).

Consistente con nuestros resultados, Bricker *et al.* (2012) encontraron una disminución de la OCR en fibroblastos embrionarios de ratón con expresión del *mpc* negativamente regulada (*mpc*-), lo cual relaciona el funcionamiento del MPC a la capacidad respiratoria de las células. Es de resaltar que también en el trabajo mencionado, se encontraron mayores diferencias entre la OCR de sus células control y *mpc*-, después de la adición de FCCP, en comparación con las condiciones basales, tal y como fue observado en el presente trabajo.

Resultados similares fueron reportados por Schell *et al.* (2014) al re-expresar *mpc1* y *mpc2* en líneas celulares de cáncer de colon HCT15 y HT29. Estos autores no encontraron diferencias significativas en la OCR entre las células HT29 con MPC restaurado y las parentales, para las condiciones de respiración basal, pero sí después de la adición de FCCP, de manera similar a lo observado en el presente trabajo para la línea celular CHOmpc2mpc1. Sin embargo, las células HCT15, que tenían una expresión recombinante más alta de *mpc*, mostraron mayor incremento de la OCR tanto a nivel basal, como tras la adición de FCCP. En consecuencia, el efecto en la OCR podría depender del nivel de expresión del MPC, que previamente se demostró en el presente trabajo que es superior para CHOmpc1mpc2.

7.4- Evaluación del desempeño metabólico de líneas celulares CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1 durante la producción transitoria de proteínas heterólogas.

Una vez corroborada la sobreexpresión del transportador en las líneas celulares CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1, así como su localización mitocondrial y funcionalidad, se evaluó su desempeño metabólico a lo largo de 2 cinéticas de crecimiento, produciendo de manera transitoria, las proteínas recombinantes modelo hSEAP o un AcM.

El primer estudio cinético se realizó utilizando ambas líneas celulares recombinantes CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1, transfectando con el vector pVAX1-hSEAP, para producir hSEAP como proteína recombinante

modelo. Como control, se usó la línea celular estable CHO-EGFP, donde la expresión de la proteína EGFP sirvió para simular una carga metabólica comparable a la de las líneas celulares que sobreexpresan MPC. Este control permitió la discriminación entre los efectos debidos al transportador, frente a los debidos a la carga metabólica causada por la expresión de proteínas heterólogas. La eficiencia de transfección, como resultado de las células CHO-S transfectadas de forma paralela con el plásmido pVAX1-EGFP, fue de $\approx 45\%$ como puede observarse en la figura 13.

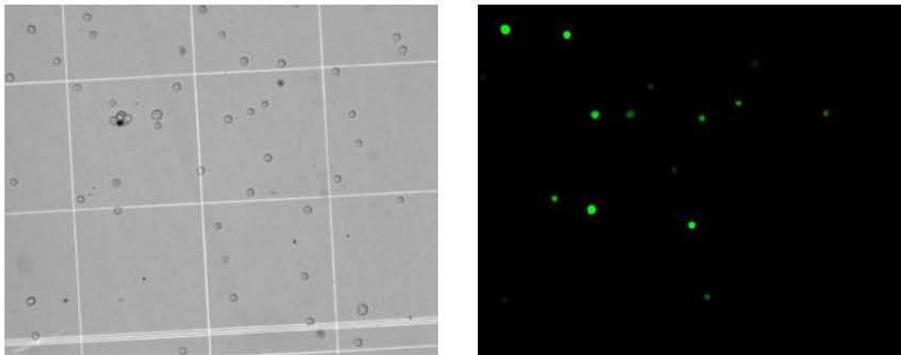


Figura 13: Eficiencia de las transfecciones transitorias determinadas mediante microfotografía de campo claro (a) y de fluorescencia (b) de células CHO-S transfectadas con el vector pVAX1-EGFP a las 48h de transfección.

Los perfiles de concentración celular de los cultivos de las tres líneas celulares se muestran en la figura 14a, donde se observa que CHOmpc1mp2 tuvo una mayor velocidad de crecimiento (μ_{max}) y concentración celular máxima ($X_{v_{max}}$), lo cual demuestra el efecto benéfico de la sobreexpresión del MPC, sobre el desempeño cinético de estas células. La caída más dramática en la viabilidad celular que se observa para esta línea celular CHOmpc1mpc2 hacia el final del cultivo puede relacionarse a un agotamiento más temprano de los nutrientes del medio, como consecuencia del rápido crecimiento y de la mayor densidad celular alcanzada.

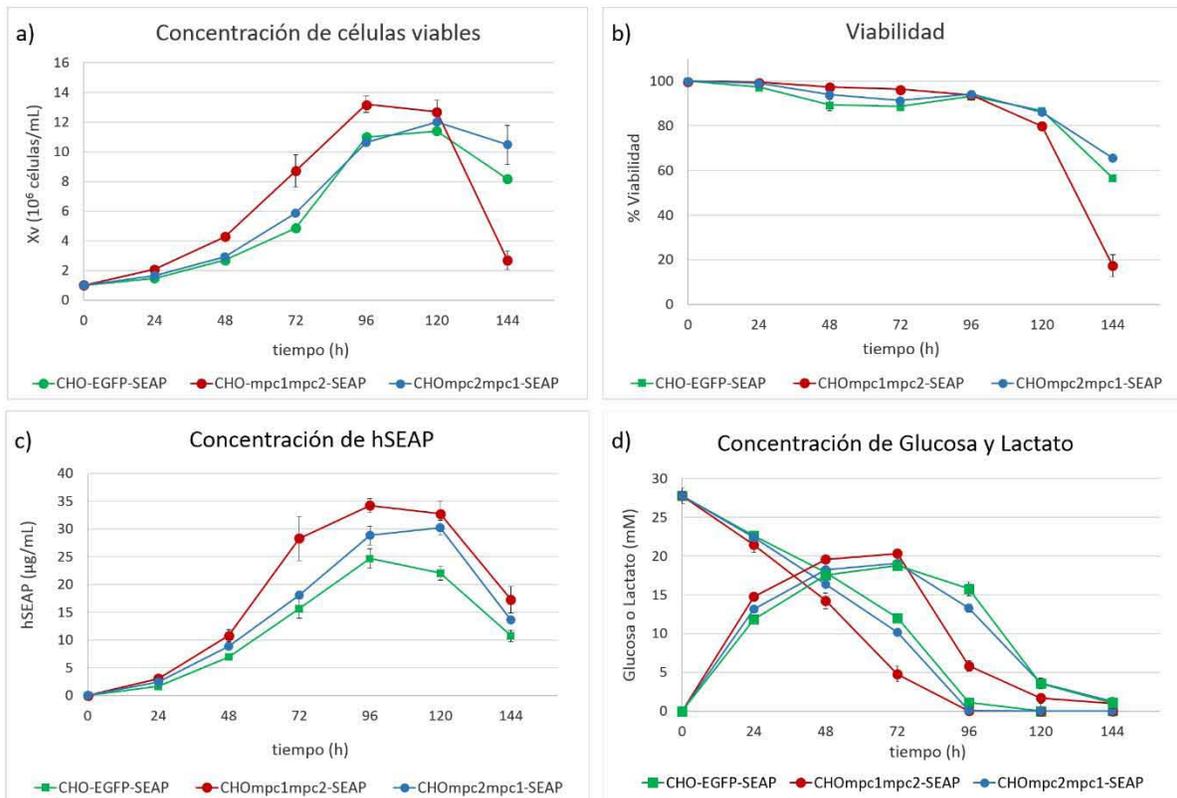


Figura 14. La sobreexpresión del MPC favorece el desempeño cinético y metabólico de líneas celulares MPC recombinantes produciendo transitoriamente hSEAP. a) Concentración celular viable; b) Porcentaje de viabilidad celular; c) Concentración de hSEAP; d) Concentración de glucosa y lactato. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar entre tres réplicas de cultivo.

La mayoría de los estudios destinados a controlar la producción de lactato se basan en estrategias que limitan directa o indirectamente el flujo glicolítico, por ejemplo, mediante el empleo de sustratos alternativos (Altamirano et al., 2006; Wilkens et al. 2011); la regulación negativa del transportador de glucosa (GLUT1) (Paredes et al.; 1999); o regulación negativa de la LDH (Sanfeliu et al., 1997; Wilkens et al., 2019). Desafortunadamente, tales enfoques generalmente resultan en tasas de crecimiento celular más bajas y concentraciones celulares máximas reducidas (Altamirano, 2013). En contraste a lo anterior, en el presente trabajo, la sobreexpresión del MPC no afectó el crecimiento celular, ya que la estrategia propuesta para la reducción del lactato, se basa en este caso, en la incorporación del piruvato a la mitocondria, sin que ello implique una reducción significativa de la tasa de glicolítica (ver Tabla 3 y Figura 14d). El consumo global de glucosa fue más rápido para CHOmpc1mpc2, debido a la mayor concentración celular alcanzada por estas células, sin embargo, la velocidad específica de consumo de glucosa durante la fase exponencial (q_{Glc}), no difirió significativamente para CHOmpc1mpc2 con respecto al control y solo resultó ligeramente más alta para CHOmpc2mpc1 (Tabla 3). El acelerado crecimiento de

CHOmpc1mpc2 dio como resultado un agotamiento más temprano de los nutrientes y, en consecuencia, una caída en la viabilidad (Figura 14b), lo que sugiere que el lote alimentado podría ser un modo de cultivo más efectivo para explotar el potencial de esta línea celular. *Toussaint et al. (2016)* También reportaron una entrada temprana en las fases estacionarias y de muerte, debido al rápido crecimiento celular, cuando sobreexpresaron PYC2 en cultivos en lote de células CHO. Al extender el tiempo de cultivo a través de una estrategia de lote alimentado, pudieron aumentar aún más la concentración celular máxima y prolongar su duración. Del mismo modo, *Irani et al. (1999)* y *Gupta et al. (2017a)* lograron concentraciones celulares y viabilidades más altas de las células recombinantes PYC2-BHK y PYC2-CHO, respectivamente, a través de estrategias de alimentación.

Como se muestra en la Figura 14d, la concentración máxima de lactato fue muy similar para las tres líneas celulares que producen hSEAP, aunque considerando las diferencias en la concentración celular, ambas líneas celulares MPC recombinantes, mostraron una disminución significativa en el rendimiento de lactato por célula ($Y_{Lac/X}$) y de la velocidad de producción específica de lactato (q_{Lac}) en un 45 % y 20 % con respecto al control, para CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1, respectivamente (Tabla 3). Estas reducciones se encuentran dentro del intervalo de las alcanzadas por otras estrategias de ingeniería metabólica, como la regulación negativa de la LDH, donde *Kim y Lee (2007)* reportaron una disminución en la q_{Lac} entre 21-55 %, o la sobreexpresión de la PYC por *Fogolín et al. (2004)*, quienes alcanzaron reducciones de 15-35 % para el mismo parámetro. Sin embargo, en los trabajos mencionados, el rendimiento lactato/glucosa ($Y_{Lac/Glc}$) se mantiene alto (aproximadamente 1.5 mol_{Lac}/mol_{Glc}) y prácticamente invariable con respecto a las líneas parentales, lo que indica que la reducción en la acumulación de lactato se debió principalmente a una disminución en la tasa de consumo de glucosa y no a una mejor utilización de los recursos energéticos. En contraste, en el presente estudio se alcanzó una reducción de $Y_{Lac/Glc}$ desde 1.8 mol/mol en la línea control, hasta 1.2 mol/mol para CHOmpc1mpc2, lo que indica que la sobreexpresión de MPC mejoró eficazmente el metabolismo energético al canalizar preferencialmente el piruvato a las rutas oxidativas.

Tabla 3. Principales parámetros cinéticos evaluados en cultivos en lote expresando transitoriamente hSEAP como proteína modelo recombinante. Medias y desviaciones estándar relativas a tres réplicas experimentales independientes. ^(†) Valores globales calculados durante la fase de cultivo exponencial. Signos negativos representan consumo.

Parámetros	CHO-EGFP	CHOmpc1mpc2		CHOmpc2mpc1	
	Media ± Desviación	Media ± Desviación	p-valor	Media ± Desviación	p-valor
$X_{v(max)} (10^6 \text{ células/mL})$	11.40 ± 0.210	13.190 ± 0.689	0.012	11.985 ± 0.165	0.019
$\mu_{(max)}(h^{-1})$	0.025 ± 0.000	0.028 ± 0.001	0.013	0.025 ± 0.000	NS
[Proteína] _(max) (µg/mL)	24.650 ± 1.736	34.197 ± 1.215	0.001	30.20 ± 1.389	0.012
IVCD ($10^6 \text{ células h/mL}$) [†]	170.20 ± 6.66	269.04 ± 16.87	0.001	191.68 ± 4.11	0.009
$q_p (10^{-7} \mu\text{g/células h})$ [†]	0.950 ± 0.143	1.057 ± 0.081	NS	0.956 ± 0.002	NS
$Y_{Lac/x} (10^{-9} \text{ mmol}_{Lac}/\text{células})$ [†]	4.877 ± 0.187	2.663 ± 0.304	0.000	3.912 ± 0.104	0.001
$q_{Lac} (10^{-9} \text{ mmol}_{Lac}/\text{células h})$ [†]	0.122 ± 0.004	0.075 ± 0.007	0.001	0.098 ± 0.003	0.002
$Y_{Lac/Glc} (\text{mmol}_{Lac}/\text{mmol}_{Glc})$ [†]	1.827 ± 0.062	1.192 ± 0.084	0.000	1.361 ± 0.009	0.000
$q_{Glc} (10^{-9} \text{ mmol}_{Glc}/\text{células h})$ [†]	-0.067 ± 0.000	-0.063 ± 0.003	NS	-0.072 ± 0.002	0.011
$q_{Gln} (10^{-9} \text{ mmol}_{Gln}/\text{células h})$ [†]	-0.019 ± 0.000	-0.018 ± 0.000	NS	-0.020 ± 0.001	NS

Después de 72 h de cultivo, todas las líneas celulares comenzaron a consumir el lactato previamente producido, correspondiendo la tasa de consumo de lactato más alta a CHOmpc1mpc2, con $0.1 \text{ mmol} \cdot 10^{-6} \text{ cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en comparación con los valores de 0.03 y $0.01 \text{ mmol} \cdot 10^{-6} \text{ cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ obtenidos para CHOmpc2mpc1 y el control, respectivamente. Una mayor tasa de consumo de lactato está directamente relacionada a la capacidad de incorporación del piruvato a la mitocondria, indicativo de la sobreexpresión del MPC. Teniendo en cuenta que el cambio de la producción de lactato, a su consumo, depende básicamente de los gradientes de protones y de concentración de lactato entre el medio citosólico y extracelular (Hartley et al., 2018), las células con mayor capacidad de importe mitocondrial de piruvato, causarán un desplazamiento del equilibrio de protones y lactato, hacia el lado citoplasmático. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en las tasas máximas específicas de consumo de glutamina (q_{Gln}) calculadas durante la fase de crecimiento exponencial (Tabla 2).

La producción de la proteína modelo hSEAP aumentó significativamente en las líneas celulares CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1 en comparación con el control (Figura 14c). Anteriormente se ha reportado el aumento de la producción de proteínas recombinantes como resultado de un metabolismo más eficiente (Altamirano et al.,

2013; Young, 2014; Gupta et al., 2017b). Como se muestra en la tabla 2, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la velocidad específica de producción de proteína (q_p) entre las líneas celulares que sobreexpresan MPC y el control. Sin embargo, se observó un aumento importante de hasta 40 y 25 % en la concentración de hSEAP para CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1, respectivamente, en comparación con la línea control. Este incremento en la concentración del producto puede estar asociado fundamentalmente al efecto sobre el crecimiento celular, como se observa en la tabla 2, que repercute en un aumento de la integral de células viables (IVCD), y por tanto, en la productividad volumétrica. En este estudio, tanto hSEAP y como el AcM, se expresaron transitoriamente y, por lo tanto, solo una fracción de la población total estará produciendo las proteínas modelo. Sin embargo, la expresión transitoria nos brinda, hasta este punto, una primera aproximación sobre el efecto de la sobreexpresión del MPC, para promover un incremento en la producción de proteínas heterólogas.

Sobre la base del mejor desempeño de la línea celular CHOmpc1mpc2 produciendo hSEAP, así como de su mayor expresión del MPC y mejor rendimiento metabólico, se seleccionó esta línea celular para evaluar la producción de una proteína modelo más compleja que represente una mayor carga metabólica. De esta forma, se expresó un AcM tanto en CHOmpc1mpc2 como en la línea celular control previamente utilizada (CHO-EGFP), transfectando transitoriamente con el vector pCHO-AcM. La eficiencia de transfección alcanzada en este caso fue solo de ≈ 30 %, lo cual puede estar determinado por el tamaño del vector utilizado (≈ 15.1 kb), el cual es mucho mayor al de la cinética anterior (≈ 4.6 kb) (Ver plásmidos en Anexo 3).

La figura 15a muestra los perfiles de concentración celular durante los cultivos en lote de las dos líneas evaluadas. De manera similar a los cultivos anteriores, la concentración de células viables máxima y la velocidad específica de crecimiento fueron significativamente más altas para CHOmpc1mpc2 con respecto a la línea control. Aunque la velocidad específica de consumo de glucosa y glutamina (q_{Glc} y q_{Gln}) se mantuvo bastante similar entre las líneas celulares (Tabla 4), se observó una caída más abrupta en la viabilidad (Figura 15b), así como un inicio más temprano de la fase de consumo de lactato (Figura 15d) para CHOmpc1mpc2, al ocurrir un agotamiento anticipado de la glucosa (Figura 15d), glutamina y glutamato (Anexo 7) en comparación con el control. Este comportamiento puede mejorarse fácilmente utilizando una estrategia de alimentación como fue anteriormente discutido.

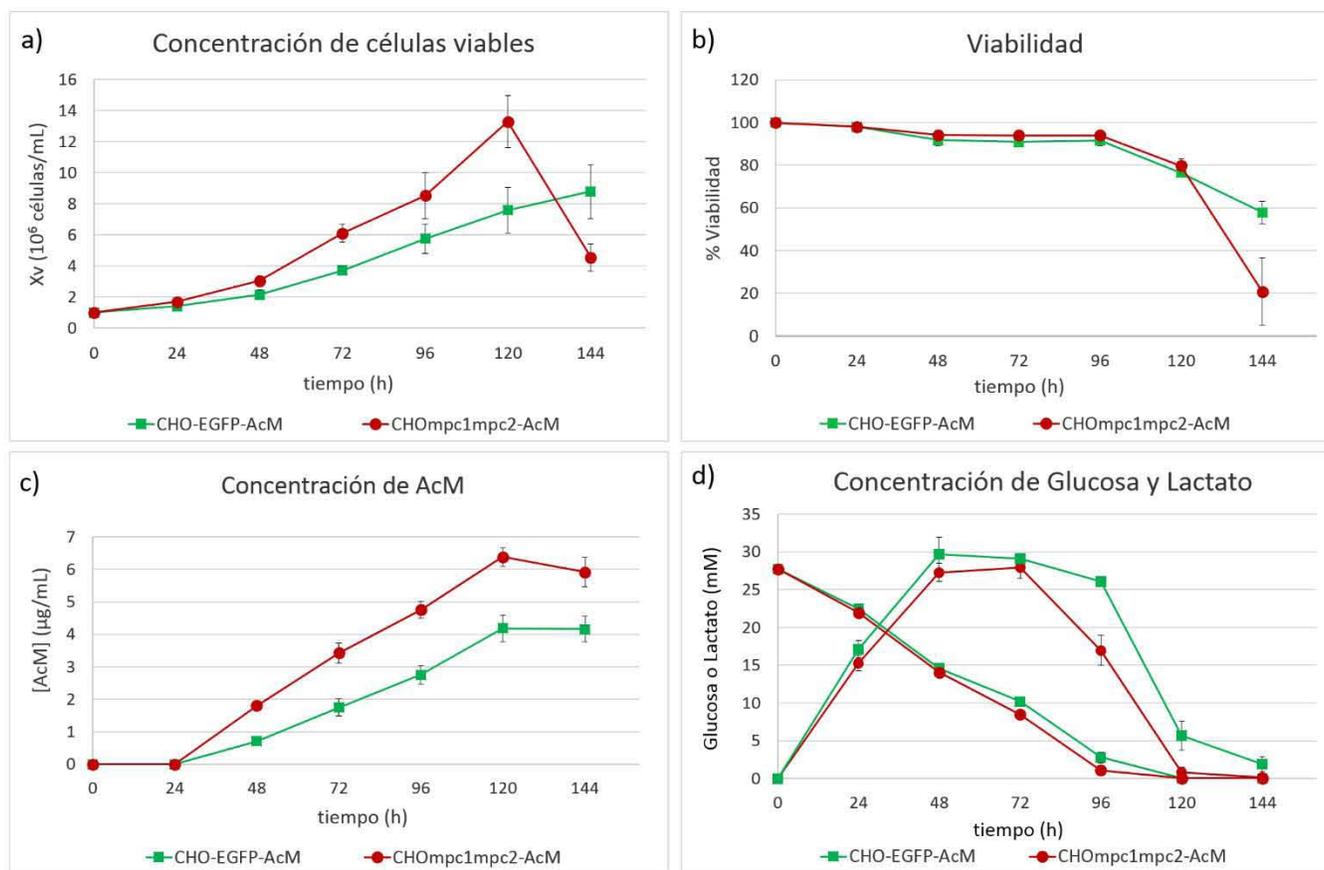


Figura 15. La sobreexpresión del MPC favorece el desempeño cinético y metabólico de CHOmpc1mpc2 produciendo transitoriamente un AcM. a) Concentración de células viables; b) Porcentaje de Viabilidad celular; c) Concentración de AcM; d) Concentración de glucosa y lactato. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar entre triplicados de cultivo.

Por otra parte, en cuanto al comportamiento de la producción de lactato, se obtuvo una reducción de hasta 50 % en $Y_{Lac/Xv}$, y una q_{Lac} aproximadamente 35 % menor para la línea celular que sobreexpresa MPC (Tabla 2). De manera similar a la producción de hSEAP, la concentración del AcM producido y el IVCD también mejoraron significativamente por la sobreexpresión del MPC (Figura 15c y Tabla 4). Estos resultados muestran que la mejora metabólica por la sobreexpresión del transportador es efectiva cuando se produce una glicoproteína multimérica mucho más compleja que hSEAP. A diferencia de hSEAP, la q_p para el AcM, aumentó significativamente en las células que sobreexpresan MPC en comparación con el control. Por lo tanto, en este caso, el aumento de la concentración del producto fue el resultado de un aumento tanto en q_p como en el IVCD.

Tabla 4. Principales parámetros cinéticos evaluados en cultivos en lote expresando transitoriamente AcM como proteína modelo recombinante. Medias y desviaciones estándar relativas a tres réplicas experimentales independientes. ^(†) Valores globales calculados durante la fase de cultivo exponencial. Los signos negativos representan consumo.

Parámetros	CHO-EGFP	CHOmpc1mpc2	
	Media ± Desviación	Media ± Desviación	p-valor
$X_{v(max)} (10^6 \text{ células/mL})$	8.800 ± 1.741	13.300 ± 1.678	0.032
$\mu_{(max)}(h^{-1})$	0.019 ± 0.000	0.025 ± 0.001	0.002
$[Proteína]_{(max)} (\mu\text{g/mL})$	4.591 ± 0.351	6.542 ± 0.279	0.002
IVCD ($10^6 \text{ células h/mL}$) [†]	141.84 ± 12.03	199.44 ± 14.88	0.006
$q_p (10^{-7} \mu\text{g/células h})$ [†]	0.169 ± 0.022	0.227 ± 0.021	0.045
$Y_{Lac/x} (10^{-9} \text{ mmol}_{Lac}/\text{células})$ [†]	10.783 ± 0.818	5.450 ± 0.808	0.001
$q_{Lac} (10^{-9} \text{ mmol}_{Lac}/\text{células h})$ [†]	0.200 ± 0.014	0.134 ± 0.013	0.004
$Y_{Lac/Glc} (\text{mmol}_{Lac}/\text{mmol}_{Glc})$ [†]	1.655 ± 0.051	1.449 ± 0.094	0.030
$q_{Glc} (10^{-9} \text{ mmol}_{Glc}/\text{células h})$ [†]	-0.121 ± 0.011	-0.093 ± 0.006	0.019
$q_{Gln} (10^{-9} \text{ mmol}_{Gln}/\text{células h})$ [†]	-0.036 ± 0.003	-0.031 ± 0.002	NS
$q_{Amm} (10^{-9} \text{ mmol}_{Amm}/\text{células h})$ [†]	0.032 ± 0.001	0.044 ± 0.001	0.049

Llama aquí la atención que, en este caso, se haya alcanzado un incremento significativo en la q_p como consecuencia de la sobreexpresión del MPC, a diferencia de lo observado en la cinética con hSEAP, a pesar de que el peso molecular del AcM es más alto que el de hSEAP (≈ 150 frente a 64 kDa), representando una carga metabólica mayor para las células. Sin embargo, este comportamiento puede encontrarse relacionado con diferencias en el proceso post-traducciona l de estas proteínas. Por un lado, el perfil de glicosilación de un AcM ha sido descrito, en términos generales, como menos complejo que el de hSEAP, predominando la galactosilación terminal (*Serrato et al., 2007; Liu, 2015*), en comparación con las glicofomas altamente sialiladas que han sido observadas en la fosfatasa alcalina (*Lipscomb et al., 2005*). En consecuencia, el mayor incremento en la q_p obtenida para el AcM en comparación con hSEAP, podría estar influenciado por la correlación inversa entre la velocidad de producción y la complejidad del perfil de glicosilación asociado, considerando el tiempo de procesamiento post-traducciona l requerido (*Shelikoff et al., 1994; Santell et al., 1999; Lipscomb et al., 2005; Butler, 2006*).

Por otra parte, debe considerarse que aunque los métodos de transfección transitoria se han adaptado para entregar grandes cantidades de ADN a las células huésped, estas pueden crear limitaciones de velocidad durante la transcripción, traducción, así como en el plegamiento y/o secreción de las proteínas (Mason *et al.*, 2012; Cain *et al.*, 2013; Masterjohn, 2016). En el caso de los vectores utilizados en la terapia génica, se ha mostrado que el exceso de carga de vectores recombinantes administrados y encontrados por la célula puede desencadenar una respuesta de proteínas desplegadas en el RE (Sen *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta, que la eficiencia de transfección fue mucho mayor para el vector pVAX1-hSEAP, podemos esperar que también la cantidad de ADN incorporado por célula sea superior, lo cual se relaciona con una mayor intensidad de fluorescencia observada en las células transfectadas con pVAX1-EGFP (Datos no mostrados). Este hecho podría conducir a una elevada expresión del transgen de *hseap*, que pueda saturar las capacidades de procesamiento del retículo, conllevando a desencadenar una UPR, la cual afectaría la secreción de la proteína, y contribuiría a explicar que la q_p se vea mermada en la cinética de hSEAP, independientemente de la mejora en las capacidades metabólicas aportada por la sobreexpresión del MPC. Dicha hipótesis podría ser demostrada a partir del estudio comparativo del número de copias del transgen en las células satisfactoriamente transfectadas, con los niveles de ARNm, proteína intracelular y proteína secretada; aunque no forma parte del alcance del presente trabajo.

Durante la cinética de expresión transitoria del AcM, se pudo evaluar la evolución del amonio, la cual se muestra en la figura 16b. Como se aprecia en el gráfico, las concentraciones de amonio durante la fase exponencial de los cultivos resultaron muy similares para las dos líneas celulares, aunque la velocidad específica de producción de este metabolito (q_{Amn}) fue significativamente menor en las células CHOmpc1mpc2 (Tabla 3). Pese a no haberse encontrado diferencias estadísticamente significativas en la velocidad de consumo de glutamina (q_{Gln}) (Tabla 3), la disminución en la q_{Amn} , resulta indicativa de una reducción en la glutaminólisis como consecuencia de un metabolismo energético mejorado a partir de la sobreexpresión de MPC. Teniendo en cuenta la mayor producción de proteína recombinante por parte de CHOmpc1mpc2, es posible que el consumo de la glutamina en estas células se encuentre, en alguna medida, un poco más asociado a reacciones de transaminación para la síntesis de aminoácidos. Por otra parte, en la figura 16b se observa una caída en la concentración de amonio a las 96h cuando se ha agotado completamente la glutamina, fundamentalmente en la línea CHOmpc1mpc2, lo

que indica que es posible que el amonio se esté además consumiendo en procesos tales como la síntesis de N-acetilglucosamina, precursor requerido en la glicosilación de la proteína recombinante.

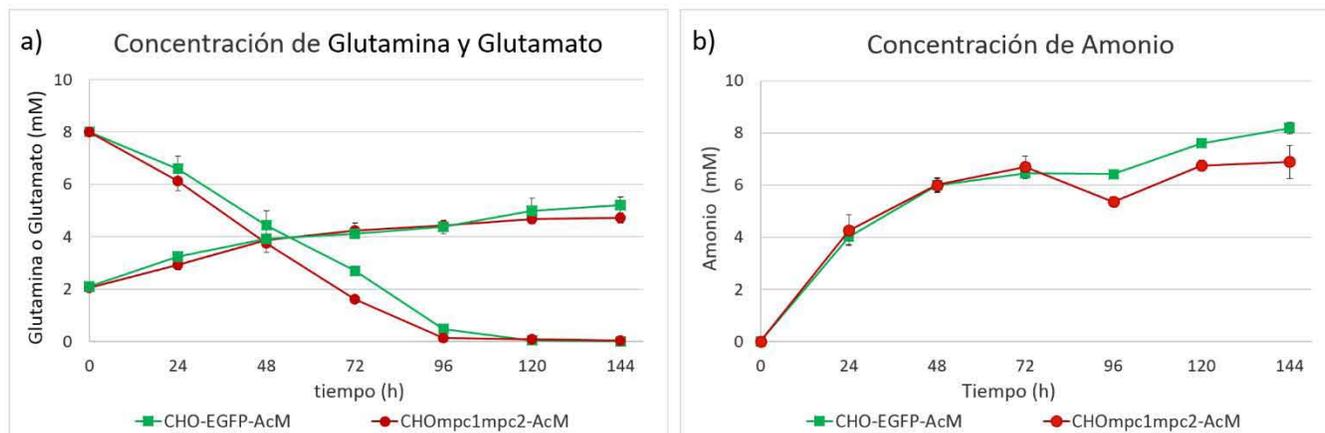


Figura 16. La sobreexpresión del MPC, aunque no afecta el consumo de glutamina (a), favorece una reducción de la producción de amonio en las células CHOmpc1mpc2 produciendo transitoriamente un AcM (b).

Sección B: Generación y evaluación de clonas estables sobreexpresando MPC y Fosfatasa Alcalina (hSEAP) como proteína recombinante modelo.

7.5- Desarrollo de clonas estables que sobreexpresen MPC y fosfatasa alcalina (hSEAP) como proteína recombinante modelo.

Para un mejor análisis del desempeño metabólico de las células MPC recombinantes en la producción de una proteína heteróloga, se consideró de gran utilidad la generación de una línea celular CHO que exprese de forma estable una proteína modelo, adicionalmente a las subunidades *mpc1* y *mpc2* del transportador mitocondrial de piruvato. La proteína modelo seleccionada para este propósito fue la fosfatasa alcalina (hSEAP), cuya expresión estable permitiría además evaluar el efecto de la sobreexpresión del MPC en la calidad de esta glicoproteína, desde el punto de vista de su perfil de glicosilación.

Habiendo anteriormente comprobado, que la línea policlonal estable CHOmpc1mpc2 mostró mayor expresión de las subunidades del transportador MPC, lo que la condujo a un mejor desempeño metabólico, se decidió utilizarla

para la expresión estable de hSEAP mediante la transfección con el vector pMONO-blasti-hSEAP. También fueron transfectadas células CHO-S con este plásmido, para generar una línea celular que pudiera ser utilizada como control en los estudios a desarrollar. A las 48h posteriores a la transfección de las células, se comprobó una eficiencia de transfección del 16%, al transfectar células CHO-S, en paralelo, con el vector p-MONO-blasti-EGFP construido para tal fin. Aunque esta eficiencia resultó bastante baja (probablemente debido al envejecimiento del reactivo), representa un porcentaje suficiente para permitir la proliferación y el predominio de las células positivamente transfectadas durante la selección.

También a las 48h post-transfección se determinó la concentración de hSEAP producida en las líneas recién generadas CHOmpc1mpc2-SEAP y CHO-SEAP, la cual resultó bastante baja en este punto, como se puede observar en la tabla 5. Sin embargo, tras el proceso de selección mediante la adición del antibiótico blasticidina, en concentraciones incrementales de 5 a 20 µg/mL, se logró incrementar la producción de la proteína en casi 2 órdenes de magnitud (Tabla 5). Es de destacar que el plásmido comercial pMONO-blasti-mcs, a partir del cual se construyó el vector de expresión pMONO-blasti-hSEAP, además de presentar un promotor de ferritina compuesto (FerH) que confiere una expresión fuerte y constitutiva del gen de interés (GOI, por sus siglas en inglés) en niveles similares a los del promotor CMV, posee una unidad de transcripción única que impulsa la expresión del transgen y el marcador de selección a través de un sitio interno de unión al ribosoma (IRES), el cual se encuentra contiguo al sitio de clonaje del GOI, seguido del gen de resistencia a blasticidina. Este es un sistema de amplificación altamente eficiente, donde además de lograrse una rápida selección de las células transfectadas en un lapso de 7 días debido al efecto de la blasticidina (*Kumar et al., 2018*), permite la obtención de líneas celulares estables con altos niveles de expresión del gen de interés (*Lai et al., 2013*).

Tabla 5: Incremento de la producción de hSEAP en las líneas celulares estables CHO-SEAP y CHOmpc1mpc2-SEAP, por efecto de la selección con blasticidina.

Línea celular	Concentración de hSEAP (µg/mL)	
	48 horas post-transfección	Selección (20 µg/mL blasticidina)
CHO-SEAP	0.33	12.8
CHOmpc1mpc2-SEAP	0.42	17.9

La selección clonal, resulta sin embargo una opción deseable en aras de seleccionar, para los estudios posteriores, los cultivos con la mayor expresión de las subunidades MPC y mayor grado de homogeneidad en cuanto a esta expresión. De un total de 89 pozos crecidos correspondientes a la línea CHOmpc1mpc2-SEAP, y 25 de CHO-SEAP, se aislaron 38 y 11 clonas respectivamente. La clonalidad fue corroborada mediante la captura de imágenes secuenciales del crecimiento celular con el equipo IncuCyte (Sartorius), que permitieron discernir el origen unicelular de cada clona como se ejemplifica en la figura 17.

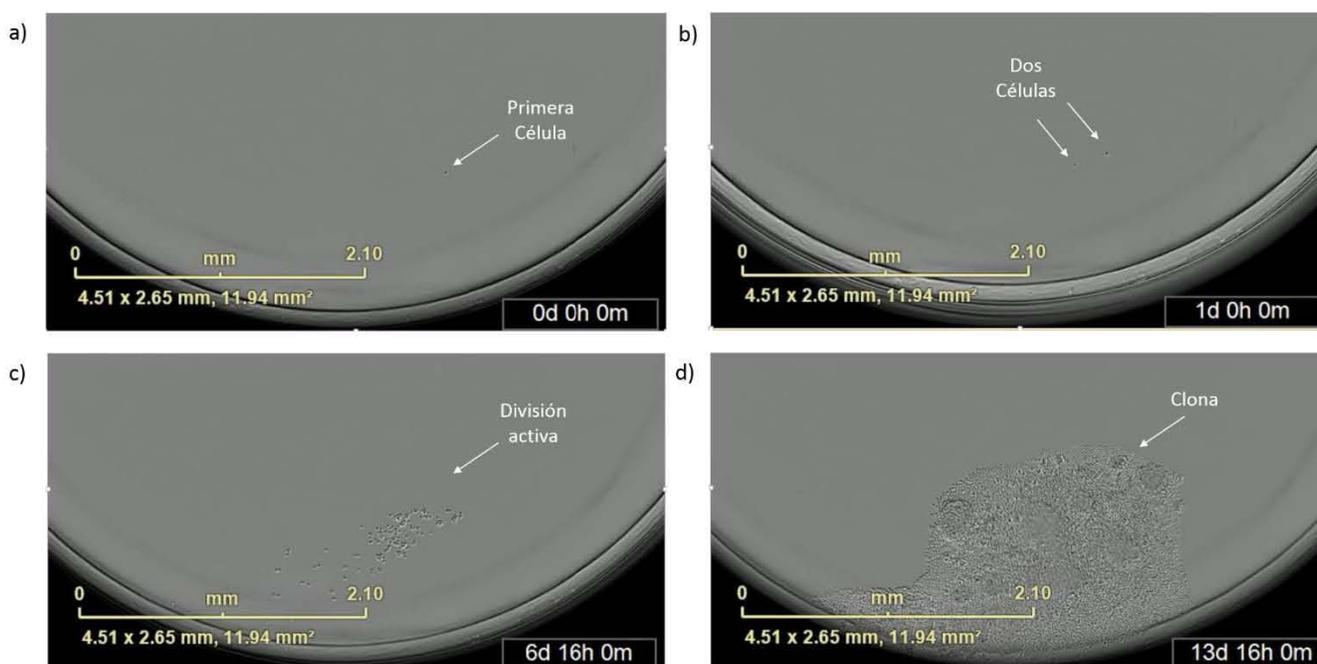


Figura 17: Comprobación de clonalidad mediante microfotografías en vivo del crecimiento celular con el equipo IncuCyte (Sartorius).

Las clonas aisladas fueron evaluadas en cuanto a producción de hSEAP mediante ensayo de actividad enzimática, seleccionándose a partir de aquí, la máxima productora procedente de CHO-SEAP (identificada como D5), y las 8 mejores derivadas de la línea CHOmpc1mpc2-SEAP (A4, A6, B15, B31, B34, B37, C15 y C32). Posteriormente todas ellas fueron analizadas mediante Western blot, con el objetivo de seleccionar, de las clonas MPC recombinantes, las de mayor expresión de las subunidades del transportador, las cuales fueron C15, A6, B15 y B31, como puede apreciarse en la figura 18.

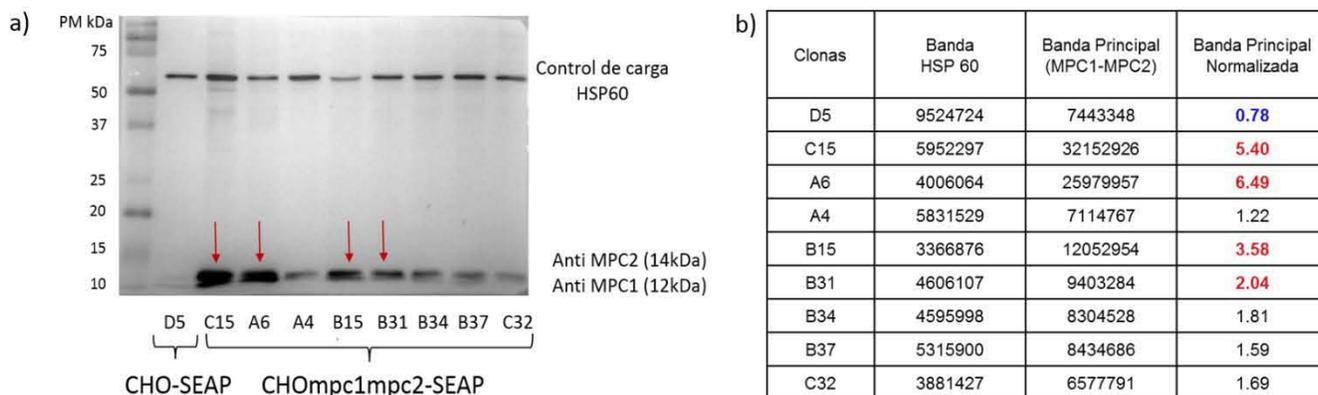


Figura 18: Selección de las 4 clonas de CHOmpc1mpc2-SEAP con mayor expresión de las subunidades MPC1 y MPC2 mediante Western blot. a) Imagen de la membrana de Western blot revelada, b) Análisis de la intensidad de las bandas por densitometría, en azul: clona control CHO-SEAP y en rojo: clonas derivadas de CHOmpc1mpc2-SEAP con mayor expresión de MPC.

7.6- Evaluación del desempeño metabólico de las clonas de CHOmpc1mpc2-SEAP

Las clonas A6, B15, B31 y C15, derivadas de CHOmpc1mpc2-SEAP y previamente seleccionadas como las de mayor expresión de las proteínas MPC, fueron evaluadas en cuanto a su desempeño cinético y metabólico en comparación a la clona D5, derivada de la línea control CHO-SEAP. Para este análisis se llevaron a cabo cinéticas de cultivo en lote alimentado, utilizando como estrategia de alimentación, el mantenimiento de los niveles de glucosa y glutamina por encima de 20 y 2 mM respectivamente.

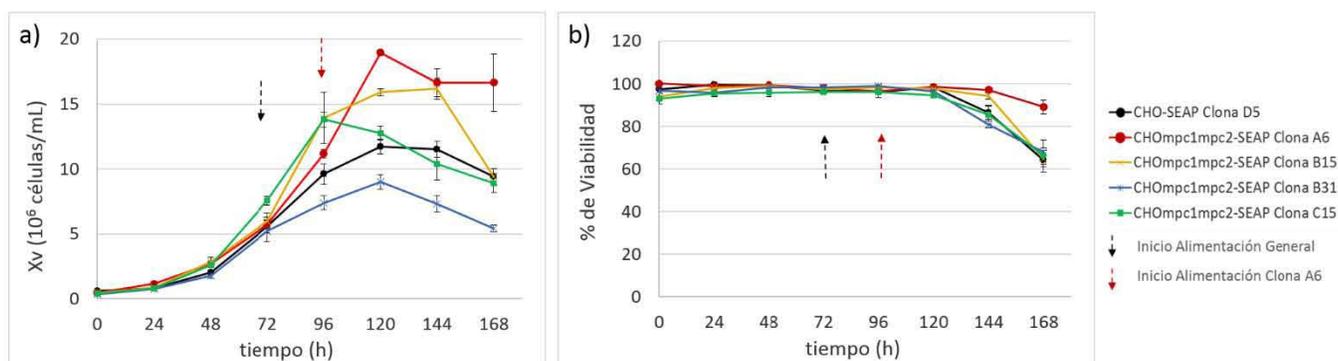


Figura 19. Comportamiento del crecimiento celular y viabilidad de las clonas CHOmpc1mpc2-SEAP con respecto a CHO-SEAP en lote alimentado. a) Concentración celular. b) Viabilidad celular. Alimentación consistente en el ajuste de concentración de glucosa a 20mM y glutamina a 2mM. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar entre tres réplicas de cultivo.

Como se puede observar en la figura 19a, las clonas MPC recombinantes alcanzaron una concentración celular máxima (X_v) entre las 96 y 120 h, la cual resultó, en casi todo los casos, superior a la clona control D5, excepto para la clona B31. Vale destacar que los cultivos de la clona B31 presentaron una morfología característica, con células de tamaño incrementado de $16.51 \pm 2.39 \mu\text{m}$ con respecto al resto de las clonas de $12.31 \pm 1.58 \mu\text{m}$, condición que pudiera estar relacionada con el menor crecimiento alcanzado por esta clona. Hay que tomar en consideración, que la elevada inestabilidad genética intrínseca de CHO, las integraciones azarosas de los genes recombinantes, así como los sistemas de amplificación utilizados durante los procesos de selección, pueden conducir a re-arreglos cromosómicos y re-distribuciones en el genoma de las células (Kim et al., 2001; Jun et al., 2005; Lai et al., 2013; Dahodwala y Lee, 2019). Todos estos cambios suelen conducir a que las propiedades dentro de las clonas derivadas de la misma población celular pueden variar significativamente, algunas de las cuales podrían adquirir determinadas características fenotípicas que no guarden relación necesariamente con la modificación genética promovida por la expresión de los genes recombinantes, lo cual puede ser el caso de la clona 31.

En cuanto a la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}), el comportamiento fue bastante similar entre todas las clonas, siendo solo ligeramente inferior para A6 (Figura 20), a pesar de que esta fue la clona que alcanzó mayor densidad celular con casi 19×10^6 células/mL (Figura 19a). La viabilidad celular también se comportó de forma bastante similar entre las clonas evaluadas (Figura 19b), comenzando a decaer después de las 120h de cultivo, probablemente como consecuencia del agotamiento de aminoácidos u otros nutrientes que no fueron suplementados como parte del esquema de alimentación seguido, y es algo que debe tomarse en cuenta si se desea prolongar por mayor tiempo este tipo de cultivo.

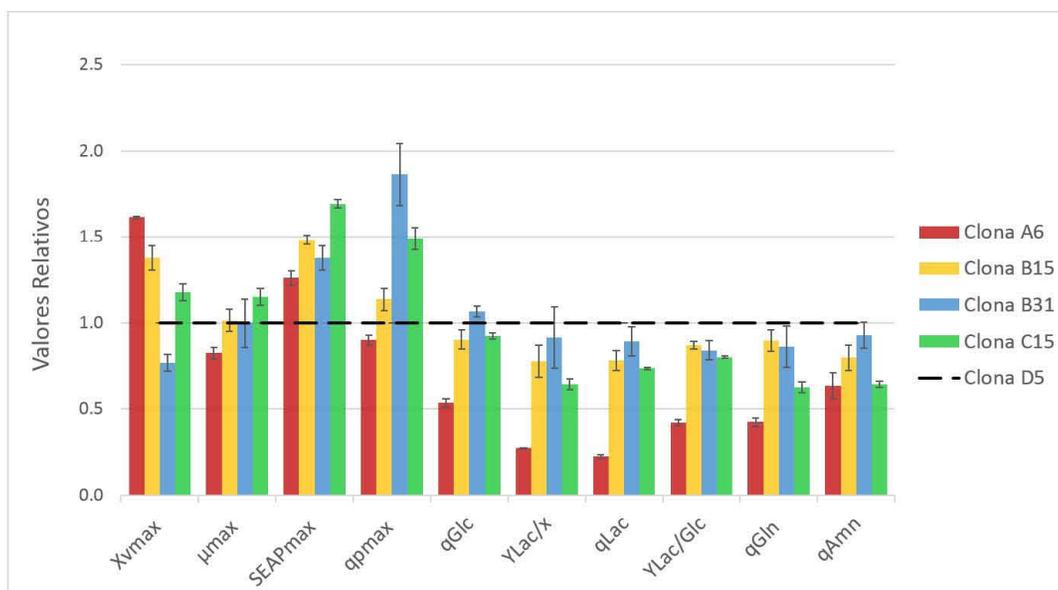


Figura 20. Valores relativos de los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos a partir de los cultivos en lote alimentado de las clonas derivadas de CHOmpc1mpc2-SEAP con respecto a la clona D5 procedente de CHO-SEAP

La clona A6 difirió marcadamente además, en las velocidades de consumo de glucosa y glutamina con respecto al resto de las clonas, en relación con su retraso en el crecimiento anteriormente mostrado (Figuras 21a y 21c). Por este motivo la alimentación en su caso comenzó a las 96h, desfasándose 24h del comienzo de la alimentación general. En cuanto a la producción de lactato, la concentración máxima alcanzada de este metabolito (Figura 21b), así como su velocidad específica de producción (q_{Lac}) calculada durante la fase exponencial del cultivo (Figura 20), fueron menores para todas las clonas que sobreexpresan MPC con respecto al control D5. Este resultado correlaciona con el efecto esperado, producto de la sobreexpresión del transportador, el cual estaría facilitando la entrada de piruvato a la mitocondria para su incorporación al TCA, disminuyendo así la concentración citosólica de piruvato que pueda ser convertido a lactato. También el rendimiento global de lactato/glucosa ($Y_{Lac/Glc}$) disminuyó marcadamente en todas las clonas MPC recombinantes respecto al control, consistentemente con la mayor capacidad de estas células para utilizar de forma más eficiente, las fuentes de carbono (Figura 20).

Por otra parte, todas las clonas comenzaron a consumir el lactato producido poco antes de alcanzar la densidad celular máxima, cercano al comienzo de la fase de desaceleración y coincidiendo con una caída a concentraciones críticas de glucosa y/o glutamina; tal y como se observó anteriormente en las cinéticas

realizadas con las líneas parentales (CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1) y como ha sido descrito en trabajos precedentes (Zagari et al, 2013a; Templeton et al., 2013; Toussaint et al., 2016; Gupta et al., 2017a; Gupta et al., 2017b). Sin embargo, en casi todas las clonas analizadas, se observó un repunte en la acumulación de lactato a partir de las 120 o 144 horas de cultivo, consistente con la caída del número de células viables y de la viabilidad celular. Similares comportamientos pueden ser también encontrados en estudios de diferentes autores al emplear estrategias de lote alimentado, fundamentalmente cuando existe un excedente de glucosa disponible (Toussaint et al., 2016; Gupta et al., 2017a; Gupta et al., 2017b; Karengera et al., 2018), aunque ha sido un aspecto apenas abordado o discutido. Karengera et al. (2017a) al sobreexpresar PYC2 en cultivos de CHO en lote alimentado suplementando con diferentes fuentes de carbono, describieron una segunda fase de producción de lactato, donde el inicio de la misma correlacionaba con el pico de máxima densidad celular y no se encontraba asociado a una caída en la viabilidad, a diferencia de lo observado en el presente trabajo.

Como ha sido previamente reportado en la literatura, el cambio de producción a consumo neto de lactato se encuentra determinado, entre otros factores, por el equilibrio entre la concentración de lactato y protones del medio intracelular y extracelular (Hartley et al., 2018), la regulación negativa de enzimas glicolíticas como la fosfofructoquinasa I por parte del lactato (Costa-Leite et al., 2007; Costa-Leite et al., 2010), así como el agotamiento de la glutamina (Zagari et al, 2013a); aunque el consenso por la mayoría de los autores es que el fenómeno se encuentra en estrecha dependencia del tipo celular y las condiciones de cultivo (Mulukutla et al., 2012; Zagari et al, 2013a; Templeton et al., 2013; Toussaint et al., 2016; Hartley et al., 2018). En el caso del cambio observado hacia el final de las cinéticas de cultivo, en el sentido contrario, de consumo a producción neta de lactato, mecanismos similares a los mencionados pudieran estar sustentándolo. Es decir, una disminución en el lactato acumulado debido al consumo previo, aunado a un exceso de glucosa en la alimentación del cultivo para un número de células que va decreciendo, además de la presencia de la glutamina también alimentada al medio, representan un conjunto de factores que pueden contribuir a desplazar el equilibrio nuevamente hacia la producción de lactato. Sin embargo, este es un comportamiento, que puede ser prevenido mediante un manejo más preciso de las condiciones de alimentación del cultivo.

El mejor desempeño en cuanto a la reducción de la acumulación de lactato fue exhibido por la clona A6 con una disminución de hasta un 78% de q_{Lac} (Figura 20). Este comportamiento podría explicarse al ser ésta la clona que presentó mayores niveles de expresión de MPC1 y MPC2 (Figura 18).

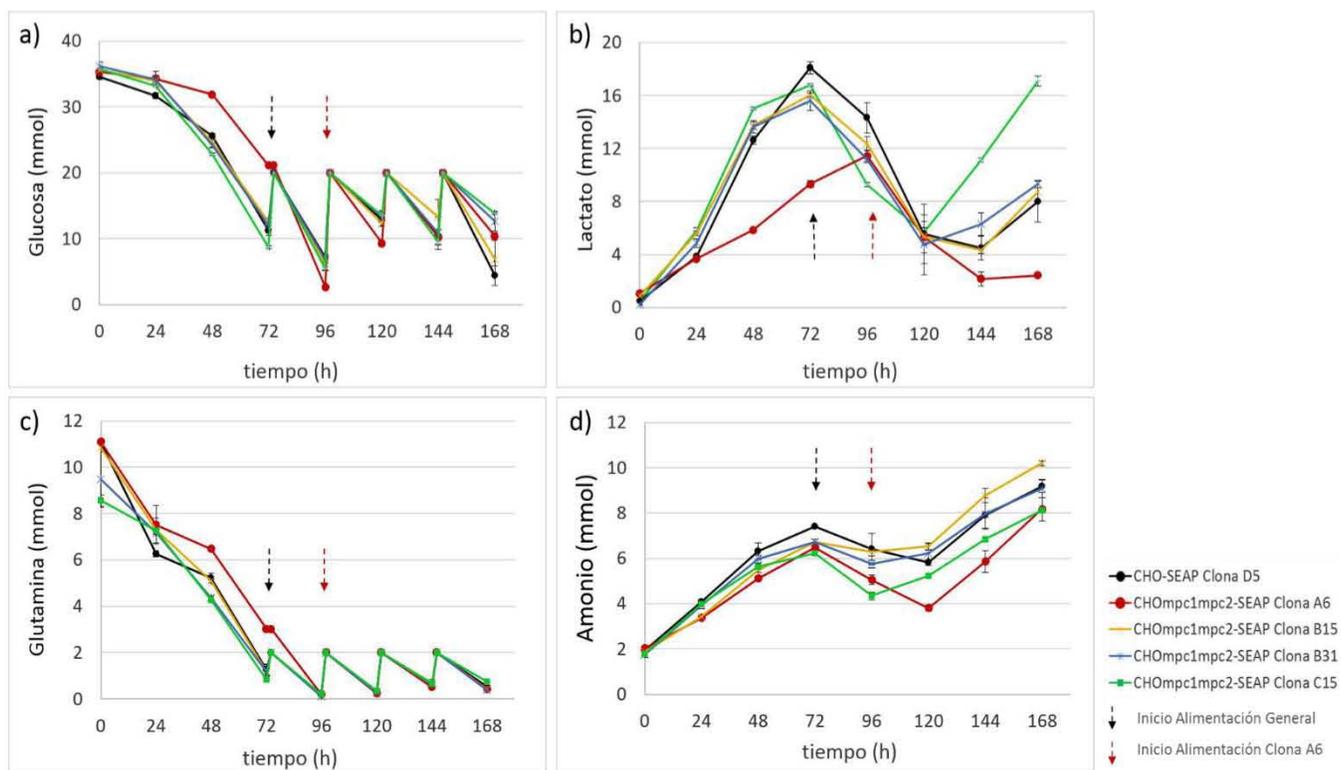


Figura 21. Concentración de los principales metabolitos evaluados durante la cinética en lote alimentado de las clonas CHOmpc1mpc2-SEAP con respecto a CHO-SEAP. a) Concentración de glucosa, b) Concentración de lactato, c) Concentración de Glutamina, d) Concentración de Amonio. Alimentación consistente en el ajuste de concentración de glucosa a 20mM y glutamina a 2mM. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar entre tres réplicas de cultivo.

Teniendo en cuenta las diferencias presentadas entre las diferentes clonas con respecto a la producción de lactato, y conociendo las variaciones existentes en los niveles de expresión de las proteínas MPC entre ellas, se decidió analizar el grado de dependencia entre estas variables. En este sentido, se graficó el conjunto de valores de los rendimientos de lactato ($Y_{Lac/x}$), obtenidos tanto para las clonas (A6, B15, B31 y C15), como para las líneas estables no clonales anteriormente evaluadas en la Sección A de este documento (CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1), versus la expresión de MPC1 y MPC2 (valores obtenidos mediante análisis densitométrico por Western blot). En cada uno de los parámetros a graficar se utilizaron valores relativos, normalizando con

respecto a la línea celular control de cada experimento: la clona D5 (CHO-SEAP) en el caso de las clonas y CHO-S para las líneas no clonales, como se describe en la tabla 6.

Tabla 6: Resumen de los valores utilizados para el análisis de correlación entre Y_{Lac} y expresión de MPC. Los valores relativos a las bandas resultan adimensionales y corresponden a la intensidad de la señal de las mismas obtenidas en las imágenes de Western blot, analizadas mediante el programa *Image Lab*.

Parámetros Evaluados	Clonas					Líneas no clonales		
	Clona CHO-SEAP	Clonas CHOmpc1mpc2-SEAP						
	D5 (Control)	C15	A6	B15	B31	CHO-S (Control)	CHO-mpc1mpc2	CHO-mpc2mpc1
Y_{Lac} (10^{-9} mmol _{Lac} /cel)	3.553	2.287	0.967	2.794	3.005	4.877	2.663	3.912
Bandas MPC1-MPC2	7443348	32152926	25979957	12052954	9403284	1792455.5	10577194	6935615
Bandas HSP60 (Control de carga)	9524724	5952297	4006064	3366876	4606107	3990338.5	4450125	4457662.5
Bandas MPC1-MPC2 Normalizadas	0.78	5.40	6.49	3.58	2.04	0.45	2.38	1.56
Valores relativos con respecto al control								
Y_{Lac}	1.00	0.64	0.27	0.79	0.85	1.00	0.55	0.80
Expresión MPC1-MPC2	1.00	6.91	8.30	4.58	2.61	1.00	5.29	3.46

Como puede observarse en la figura 22, se encontró una correlación negativa con un ajuste lineal aceptable para el tipo de análisis realizado, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.86. Este resultado confirma parte de la hipótesis del presente trabajo en relación al efecto de la sobreexpresión del transportador mitocondrial de piruvato en la reducción de la producción de lactato. Por otra parte, aporta una importante evidencia en cuanto a que la mejora en el metabolismo energético celular, dada por esta estrategia de ingeniería metabólica, depende del nivel de expresión del MPC. Esto significa que, a pesar de que el MPC tiene una influencia directa en la eficiencia del metabolismo de la glucosa, el nivel de este efecto dependerá del grado de expresión de las subunidades. El reducido valor de la pendiente de la ecuación de correlación es indicativo de que se requiere una elevada sobreexpresión del MPC, de al menos 5 veces el nivel basal, para reducir a la mitad la producción de lactato característica de las células CHO-S. La evaluación directa del importe de piruvato por parte de las líneas celulares con diferentes niveles de expresión de MPC, podría aportar elementos más precisos acerca de esta correlación entre el grado de expresión del MPC y su efecto en el metabolismo energético, aunque este queda fuera del alcance del presente trabajo. No obstante, debe tenerse en cuenta la complejidad de la vía central del metabolismo del carbono, donde ha sido además previamente demostrado el papel fundamental de otros puntos de regulación, como las reacciones catalizadas por las enzimas LDH y PDH que han sido

moduladas por otros autores como estrategias para también superar el efecto Warburg (Kim y Lee, 2007; Zhou et al., 2011; Wilkens et al., 2019; Xie et al., 2019).

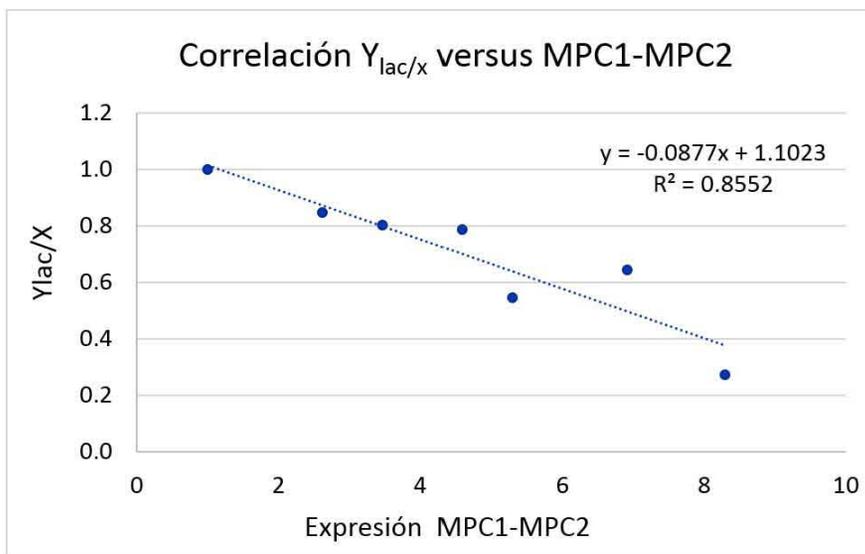


Figura 22. Correlación de la expresión de MPC con respecto al rendimiento de lactato producido por célula ($Y_{Lac/X}$). Los valores de $Y_{Lac/X}$ graficados corresponden a los obtenidos en las cinéticas de crecimiento por las diferentes líneas MPC recombinantes (clonales y no clonales), normalizados respecto al control incluido dentro del propio experimento. Los valores de MPC1-MPC2 se obtuvieron a partir del análisis densitométrico de las imágenes obtenidas por Western blot, para las líneas celulares clonales (figura 18a) y no clonales (figura 8), normalizando en cada caso con respecto al control.

Otros autores, sobreexpresando la piruvato carboxilasa de levadura (PYC2), también han reportado diferencias en el efecto sobre la producción de lactato entre las clonas obtenidas en relación con el grado de expresión de la enzima. *Toussaint et al. (2016)* encontraron un grupo de clonas donde el nivel de expresión de PYC2 era similar a la línea parental, las cuales no fueron capaces de reducir la producción de lactato, mientras que *Gupta et al. (2017a)* también identificaron que las clonas con menor expresión de la enzima manifestaban un menor efecto sobre la concentración de lactato producido. Es de destacar que en ambos trabajos la reducción alcanzada para q_{Lac} en las clonas con mejor desempeño, fue menor a la obtenida en este estudio, con similares condiciones de cultivo en lote alimentado.

El amonio es otro metabolito de desecho que se produce debido a una glutaminólisis exacerbada, como consecuencia del desbalance del metabolismo citosólico y mitocondrial. Es un metabolito que resulta importante controlar debido a su potencial efecto negativo sobre la calidad de las glicoproteínas. En este caso, la velocidad

de producción de amonio durante la fase exponencial del cultivo (q_{Amn}) fue inferior en todas las clonas MPC con respecto al control (Figura 21d). A partir de las 120h se encontró una tendencia al incremento en la producción del amonio, de forma similar a la observada en el caso del lactato. Este resulta un comportamiento comúnmente manifestado en muchos estudios donde se alimentan los cultivos con glutamina (Vallée et al., 2014; Toussaint et al., 2016; Karenguera et al., 2017a; Karenguera et al., 2017b; Karenguera et al., 2018), y una estrategia muy válida propuesta por algunos autores para abordar este inconveniente, consiste en la sustitución de la glutamina por el dipéptido Gln-Ala, o por glutamato en el caso de que se cuente con el sistema de la glutamino-sintetasa. Por otra parte, el comienzo del incremento en la acumulación de amonio en nuestro caso, se relaciona directamente con la entrada en senescencia del cultivo, la cual es una condición que puede mejorarse mediante el control de las concentraciones de metabolitos suplementados y la adición de otros nutrientes que se encuentran limitando el crecimiento celular.

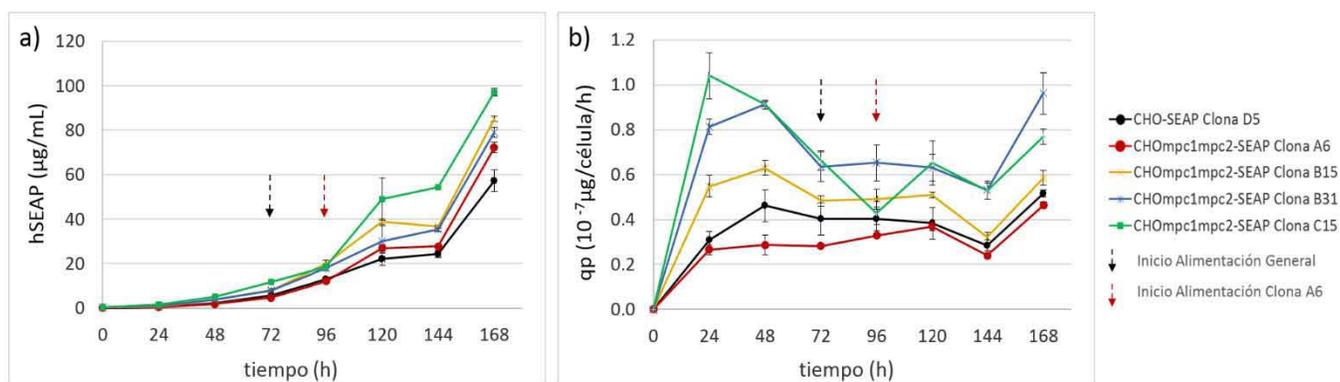


Figura 23. Producción de hSEAP por clonas CHOmpc1mpc2-SEAP con respecto a CHO-SEAP durante la cinética en lote alimentado. a) Concentración de hSEAP, b) Velocidad específica de producción de hSEAP. Alimentación consistente en el ajuste de concentración de glucosa a 20mM y glutamina a 2mM. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar entre tres réplicas de cultivo.

En cuanto a la producción de la proteína recombinante hSEAP, casi todas las clonas que sobreexpresan el transportador incrementaron la velocidad específica de producción (q_p) con respecto a D5, excepto A6 que tuvo un comportamiento muy similar al control (Figura 20 y 23b). Es posible que en el caso específico de la clona A6 se pueda encontrar exhibiendo un menor número de copias del transgen *hseap*, lo cual la ponga en desventaja desde el punto de vista productivo. Sin embargo, la q_p ligeramente más baja de esta clona, se compensa en gran medida por el aumento de la densidad celular máxima y la extensión del tiempo de cultivo que puede ser mayor al resto, teniendo en cuenta los niveles de X_v y viabilidad celular que mantenía esta clona al momento que se

finalizó la cinética. Esto se traduce en una mayor acumulación de hSEAP y por tanto, en una ganancia neta de productividad volumétrica.

En la literatura podemos encontrar resultados mixtos y contrastantes con respecto al efecto de diferentes estrategias de ingeniería metabólica, sobre la producción de proteína recombinante. Si bien varios de los trabajos que han apostado por la regulación negativa de la LDH (*Chen et al., 2001; Kim y Lee, 2007; Wilkens et al., 2019*), los efectos combinados con el silenciamiento de la PDHK (*Zhou et al., 2011*), o la sobreexpresión de la PYC (*Fogolín et al., 2004; Gupta et al., 2007b*) han reportado un incremento en la productividad específica de las clonas recombinantes; otros siguiendo también esta última estrategia, no han encontrado un impacto beneficioso directo sobre este parámetro, aunque en muchos casos se alcanza un incremento en el título de proteína como resultado del efecto promovido por el crecimiento celular y la extensión del cultivo (*Elias et al., 2003; Wilkens y Gerdtsen, 2015; Toussaint et al., 2016; Karenguera et al., 2017b*). *Wilkens y Gerdtsen (2015)* propusieron que la disminución en la productividad específica puede ser debido a un cambio en el estado redox de la célula que afecta el ensamblaje de las proteínas multiméricas, sin embargo, esto no explica el fenómeno de muchos casos donde se presenta una disminución de la q_p en estudios donde se expresan proteínas de solo 1 cadena polipeptídica. En general, el comportamiento de la q_p parece estar más relacionado con el tipo celular, las variaciones entre clonas y las condiciones de cultivo.

Como puede constatarse en las figuras 20 y 23a, en términos de productividad volumétrica referida en este caso como la cantidad de hSEAP acumulada al finalizar el cultivo, todas las clonas MPC recombinantes superaron al control CHO-SEAP (D5), alcanzando una concentración máxima de la enzima significativamente mayor, lo cual pone de manifiesto la ventaja metabólica que aporta la sobreexpresión del transportador mitocondrial de piruvato, favoreciendo tanto el crecimiento celular como la productividad específica de la proteína modelo.

7.7- Análisis del perfil de glicosilación de hSEAP producida en células que sobreexpresan MPC

Aunque el desarrollo de los procesos de cultivo celular y las principales estrategias de ingeniería metabólica, se han centrado fundamentalmente en incrementar los títulos de proteína recombinante, garantizar su calidad y la consistencia de la misma, es un aspecto esencial en el establecimiento de los bioprocesos industriales. La N-glicosilación de las proteínas de interés terapéutico se considera un atributo de calidad crítico debido a sus

efectos esenciales sobre la eficacia *in vivo*, la inmunogenicidad y la vida media en el suero (Sinclair y Elliott, 2005; Butler, 2006). Por esta razón, es importante asegurar que las estrategias desarrolladas para mejorar el rendimiento de la producción de proteínas recombinantes promuevan el mantenimiento o incluso un incremento en la calidad del producto.

En tal sentido, para analizar la influencia de la sobreexpresión del transportador mitocondrial de piruvato sobre la calidad de las proteínas recombinantes, se analizó el perfil de N-Glicosilación de la proteína fosfatasa alcalina expresada de manera estable en una de las clonas mejores productoras de la enzima (B15) proveniente de la línea celular CHOmpc1mpc2-SEAP (nombrada en lo adelante como CHO-mpc-SEAP) y la clona D5 (CHO-SEAP) como control. Se realizaron 6 cultivos en lote donde la proteína hSEAP fue cosechada y purificada a las 120h en cada caso, comprobándose la pureza mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida como puede corroborarse en la figura 24.

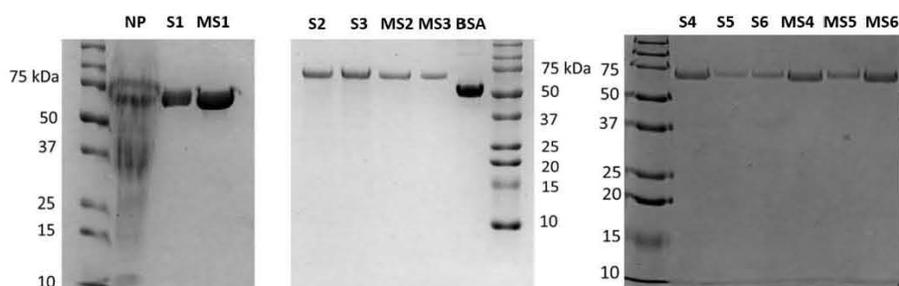


Figura 24: Pureza de hSEAP evaluada mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 12%. NP: muestra de hSEAP sin purificar, S1, S2, S3, S4, S5 y S6: muestras de hSEAP purificada a partir de cultivos de CHO-SEAP, MS1, MS2, MS3, MS4, MS5 y MS6: muestras de hSEAP purificada a partir de cultivos de CHO-mpc-SEAP, BSA: muestra de BSA comercial cargada como control.

La mezcla de oligosacáridos obtenidos por digestión enzimática a partir de las muestras de hSEAP purificada, fueron analizados por HPLC en fase normal con gradiente de acetonitrilo. El perfil típico obtenido se muestra en figura 25.

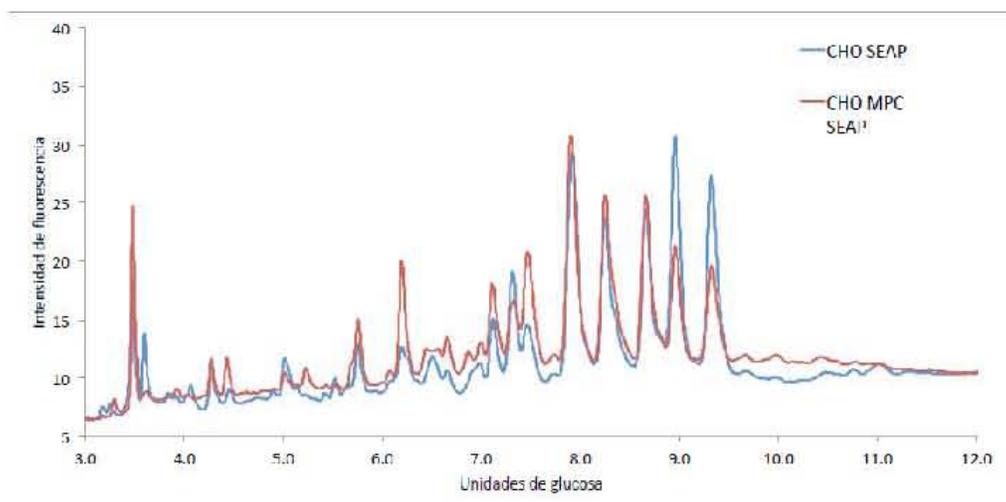


Figura 25: Cromatograma tipo de los N-glicanos de hSEAP a partir de los cultivos de las líneas celulares CHO-SEAP (azul) y CHO-mpc-SEAP (rojo), separados por HILIC.

Las unidades de glucosa fueron asignadas de acuerdo a un estándar de homopolímero de glucosa (D-3818, Sigma) y ajustando los datos del cromatograma estándar a una ecuación polinomial como fue descrito por *Guile et al. (1997)*. Como puede observarse en el cromatograma mostrado (Figura 25), la mayoría de los picos correspondientes a las diferentes estructuras de glicanos, coinciden para las dos líneas celulares analizadas, variando solamente en la abundancia de las mismas.

Las estructuras para cada pico fueron propuestas sobre la base de su tiempo de migración (en unidades de glucosa) y su susceptibilidad a digestiones individuales de exoglicosidasas (previamente descritas en el capítulo de Materiales y Métodos); tomando además como referencia las estructuras que se encuentran previamente reportadas en la literatura para esta proteína (*Lipscomb et al., 2005*). Posteriormente se pudo determinar el porcentaje de abundancia relativa de cada una de las especies identificadas, a partir de la integración del área bajo la curva de cada uno de los picos (Tabla 7).

Para un mejor análisis, las estructuras identificadas se agruparon según su composición en 7 grupos como: altos en manosa (más de tres residuos de manosa), biantenarios G0 (complejo, sin residuos de galactosa adheridos), biantenarios G1 (complejo, con un residuo de galactosa), biantenarios G2 (complejo, con dos residuos de galactosa), tri o tetrantenarios y formas sialiladas. De esta manera, en la figura 26 se muestra la abundancia relativa de los diferentes grupos de glicanos para cada una de las líneas celulares estudiadas.

Tabla 7: Abundancia relativa de las estructuras de N-glicanos propuestas para los diferentes picos obtenidos por HPLC de las muestras de hSEAP. La cantidad relativa de cada glicano se indica como porcentaje de la cantidad total detectada excluyendo el área del pico del patrón interno (maltosa). Fucosa (F), galactosa (G), manosa (M), N-acetilglucosamina (N) y ácido siálico (S). Los números que siguen a estas abreviaturas se refieren a unidades repetidas. (A) se utiliza para el complejo N2M3 (núcleo de quitobiosa) seguida de un número indica cantidad de antenas conectadas y se indican las terminaciones de G y S. Número dentro de paréntesis indica la posición de la antena en la que se encuentra la G terminal con respecto al núcleo de quitobiosa. (Ver Anexo 8).

Unidades de Glucosa	Estructura propuesta	Cultivo 1		Cultivo 2		Cultivo 3		Cultivo 4		Cultivo 5		Cultivo 6	
		CHO-SEAP	CHOmpcSEAP										
1.77	Estandar Interno												
4.86	N2FM3N	3.35	1.18	0.61	0.42	2.06	1.47	0.55	0.64	1.33	1.58	2.70	1.01
5.57	A2	3.53	3.34	1.81	1.92	2.46	1.59	3.05	1.49	1.49	1.26	3.40	1.68
6.00	A2F	1.23	4.91	3.82	3.60	1.19	1.73	0.97	2.76	1.09	3.90	0.80	3.47
6.23	N2M5	3.83	2.90	2.33	3.04	2.91	1.97	3.98	1.55	3.49	2.43	3.57	1.99
6.34	N2M5	1.15	1.33	0.84	0.76	1.61	2.37	1.37	2.80	3.00	2.22	2.33	1.29
6.44	A2G1(1,3)	1.66	1.98	1.28	1.87	1.54	1.13	1.11	1.61	1.78	1.17	1.03	1.33
6.70	A2FG1(1,6)	1.00	1.09	1.54	1.23	1.46	1.07	1.11	0.31	1.63	1.02	1.93	0.41
6.75	A2FG1(1,3)	2.27	1.20	1.66	1.44	4.55	1.35	4.98	0.89	5.83	1.91	3.82	1.38
6.88	A3FG1	4.67	5.37	2.98	4.75	6.14	6.44	7.37	8.90	5.90	9.90	8.91	7.14
7.09	A2G1S1	7.80	13.07	6.02	13.60	9.02	14.99	7.76	17.85	8.02	17.11	8.06	15.20
7.25	A2G2	5.36	9.51	5.91	9.91	3.84	16.24	8.63	18.72	9.60	17.07	7.53	16.52
7.68	A2G2F	19.63	17.89	20.73	19.11	28.31	15.60	18.53	17.38	16.07	15.46	17.89	18.16
8.04	A4G2	11.11	12.89	12.97	15.33	11.36	15.40	20.26	11.43	19.18	11.53	19.27	13.76
8.44	A3G3	8.41	10.43	9.01	11.91	6.60	15.95	3.67	8.99	2.40	9.53	1.35	12.35
8.79	A2G2S2	11.22	6.37	11.78	2.75	4.19	0.80	1.77	0.39	1.83	0.67	1.67	0.88
9.15	A3FG3	10.84	4.22	12.30	3.22	7.52	0.66	5.44	0.98	6.17	0.83	5.33	0.36
9.57	A3G3S1	0.20	0.30	0.47	1.70	1.75	0.50	2.67	1.59	3.17	1.08	3.57	1.50
9.74	A4G4	1.41	0.39	3.11	1.19	1.91	0.32	4.23	1.45	5.40	1.02	3.99	1.29
10.24	A3G3S2	0.43	0.41	0.56	1.65	0.85	0.41	1.33	0.27	0.81	0.30	1.19	0.31
10.85	A3G3S2	0.89	1.21	0.28	0.61	0.73	0.00	1.21	0.00	1.84	0.00	1.66	0.00
	Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

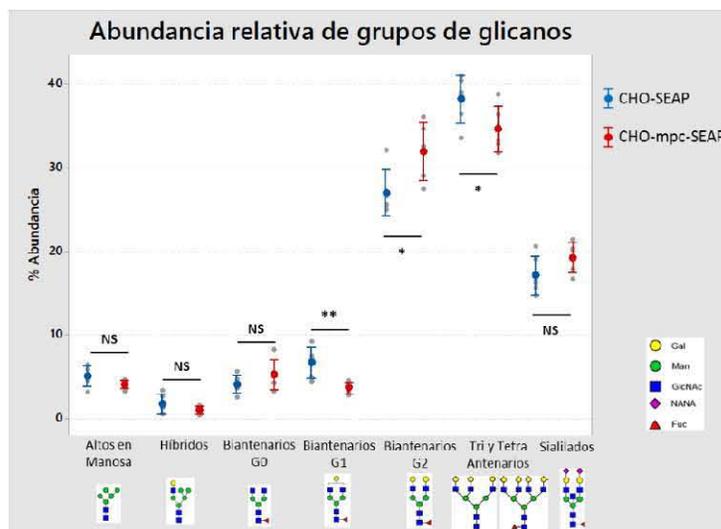


Figura 26: Porcentaje de abundancia los diferentes grupos de N-glicanos unidos a hSEAP para cada una de las líneas celulares. (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$ y (NS) No significativo. Se muestran estructuras representativas para cada grupo.

De la distribución de grupos de glicanos presentes en la hSEAP producida por ambas líneas celulares, solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al porcentaje de abundancia relativa para los grupos de glicanos biantenarios no sialilados G1 y G2, así como para los tri y tetra antenarios no sialilados. Como puede apreciarse en la figura 26, para los cultivos procedentes de la línea celular CHO-mpc-SEAP, se obtuvo un incremento en los glicanos biantenarios G2 a expensas de la disminución en la proporción de las formas G1. Este hecho se traduce en una mayor capacidad de esta línea celular para llevar a cabo galactosilaciones más completas, lo cual constituye una ventaja para la producción de proteínas recombinantes donde este tipo de glicofomas sean deseables. Tal es el caso de los anticuerpos monoclonales, molécula de enorme interés biofarmacéutico, cuando se requiere promover una respuesta de tipo CDC (citotoxicidad dependiente del complemento, del inglés: *complement-dependent cytotoxicity*) como función efectora (Hodoniczky et al., 2005; Reusch y Tejada, 2015).

Cabe destacar que Gupta et al. (2017a) reportaron también un incremento en la galactosilación como consecuencia de la sobreexpresión de PYC2 para reducir la producción de lactato. Este favorecimiento en la galactosilación constituye un resultado a esperar, cuando se emplean estrategias de ingeniería metabólica que promuevan un metabolismo más eficiente, capaces de conducir a mayor disponibilidad de precursores de la glicosilación como UDP-Gal. Como se ha mostrado anteriormente, la sobreexpresión del MPC conlleva a un mejor aprovechamiento de la glucosa como fuente de carbono sin limitar el flujo glicolítico y con ello, puede dar lugar a una mayor disponibilidad de los intermediarios de esta vía, que se requieren para la síntesis de los azúcar-nucleótidos (McAtee et al., 2014; Zhang et al., 2019). A su vez, en el análisis de flujos metabólicos desarrollado para las nuestras líneas MPC recombinantes no clonales (Bulté et al., 2020) mediante un enfoque de modelo dinámico desarrollado por Martínez et al. (2020), mostró, para la línea celular CHOmpc1mpc2 de la cual derivó CHO-mpc-SEAP, un incremento de los flujos a través de la vía de las pentosas fosfatos, la cual juega un papel fundamental en la contribución a la síntesis de los precursores azúcares activados de la glicosilación.

Por otra parte, ha sido ampliamente reportada, la influencia negativa del amonio en la actividad de la galactosil- y sialil-transferasa por el incremento del pH en Golgi (Hossler et al., 2009; Rivinoja et al.; 2009; Pacis et al., 2011), sin embargo, para la línea celular CHO-mpc-SEAP, se encontró una reducción de la producción de amonio con respecto al control CHO-SEAP (Figura 21d), lo cual puede estar además promoviendo la mayor galactosilación

observada en la línea MPC recombinante, y adicionalmente un ligero favorecimiento de la sialilación aunque no se encontraran diferencias estadísticamente significativas para este grupo.

El otro grupo de glicanos donde se obtuvieron diferencias significativas entre las dos líneas celulares, fueron las glicoformas tri y tetra-antenarias, donde se encontró una tendencia a la disminución de la abundancia de estas formas más complejas en el caso de los cultivos de CHO-mpc-SEAP. Este hecho pudiera encontrarse relacionado con un menor tiempo de residencia de la glicoproteína en Golgi, como consecuencia de una mayor velocidad específica de producción por parte de estas células, dependencia que ha sido abordada por varios autores (*Shelikoff et al., 1994; Santell et al., 1999; Andersen et al., 2000; Butler, 2006*). También se debe tener en cuenta, que las células CHO-mpc-SEAP, han transitado por dos procesos de transfección y selección para la expresión de las proteínas recombinantes, por lo cual la expresión de las enzimas de la glicosilación como las N-acetil-glucosaminil-transferasas IV y V, relacionadas con la adición de antenas, pueden estar sujetas a los fenómenos estocásticos de reordenamientos genéticos experimentados por las células. Adicionalmente se ha reportado que la disponibilidad del precursor UDP-GlcNAc, está estrechamente relacionada con las concentraciones de amonio (*Nyberg et al., 1999; Valley et al., 1999*), las cuales se encontraron incrementadas para la línea CHO-SEAP, por lo que cabe esperar el ligero incremento en este grupo de glicanos multi-antenarios.

Sin embargo, la mayor velocidad de producción de hSEAP por parte de CHO-mpc-SEAP no condujo a una disminución del grado de sialilación para esta línea celular. Este resultado es similar al obtenido por *Lipscomb et al. (2005)* al incrementar la producción de esta misma proteína hSEAP, mediante la amplificación con promotor inducible y el uso de diferentes estrategias de cultivo, en células CHO. Es de destacar, que comparativamente, la proporción de formas con manosa terminal producidas por nuestras células, resultó mucho menor que las reportadas en el trabajo de *Lipscomb et al. (2005)* para esta proteína en condiciones similares de cultivo.

De manera general, el perfil de glicosilación de la proteína heteróloga hSEAP producida en la línea celular CHO-mpc-SEAP, no se vio sustancialmente afectado por el efecto de la sobreexpresión del MPC; y los cambios promovidos que fueron encontrados por este trabajo pueden resultar ventajosos para la utilización de estas células como sistema de expresión de glicoproteínas recombinantes de interés biofarmacéutico.

VIII. CONCLUSIONES

- El transportador mitocondrial de piruvato fue satisfactoriamente sobreexpresado en las líneas celulares estables no clonales CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1, como fue corroborado a partir de los mayores niveles de transcrito y concentración de proteína de las subunidades, comparado con las células control.
- La correcta localización mitocondrial de las subunidades MPC1 y MPC2 recombinantes del transportador permitió la formación adecuada del heterodímero funcional, que condujo a un mayor flujo de consumo de piruvato, como fue corroborado a partir del incremento de la OCR máxima en las líneas que sobreexpresan el MPC.
- La sobreexpresión del MPC conlleva a una utilización más eficiente de la glucosa como fuente de carbono, resultando en una disminución de la acumulación de amonio y una reducción significativa de la tasa de producción de lactato, fenotipo metabólico que favorece un mayor crecimiento y producción de proteína recombinante.
- El efecto alcanzado sobre el metabolismo energético celular como consecuencia de la sobreexpresión del MPC, puede depender del grado de expresión de las subunidades del transportador.
- El cultivo en lote alimentado mostró ser una estrategia conveniente para el crecimiento y producción de las líneas celulares MPC recombinantes con un manejo adecuado de las condiciones de alimentación para su uso industrial.
- La sobreexpresión del MPC puede favorecer la galactosilación de glicoproteínas recombinantes, sin afectar significativamente la proporción de otros grupos de glicanos que repercutan en la función de la proteína recombinante expresada en este sistema.

IX. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de la sobreexpresión del MPC sobre la distribución de flujos metabólicos de la vía central del carbono mediante Análisis de Flujos Metabólicos en las células MPC recombinantes, utilizando espectrometría de masas y marcaje con C¹³.
- Desarrollar un análisis transcriptómico para evaluar principales genes diferencialmente expresados en el fenotipo MPC recombinante, lo cual podría conducir al hallazgo de nuevas dianas metabólicas a regular para maximizar la eficiencia energética y la productividad de estas células.
- Combinar el efecto de la sobreexpresión del MPC con el silenciamiento mediante CRISPR-Cas, del MCT1 (transportador de lactato), estrategia metabólica que puede ejercer un importante efecto en el desplazamiento del equilibrio de la enzima LDH hacia la conversión de lactato a piruvato y así favorecer su incorporación a las vías oxidativas.
- Desarrollar cinéticas de cultivo en biorreactor para evaluar el desempeño de las clonas MPC recombinantes en condiciones de limitación de oxígeno disuelto, y así caracterizar la capacidad de este fenotipo metabólico para enfrentar el estrés hidrodinámico de las producciones a mayor escala.
- Sobreexpresar MPC en una clona productora de una proteína recombinante de interés biotecnológico (Ej: un AcM).
- Caracterizar el perfil de glicosilación de hSEAP en clonas MPC recombinantes con diferentes niveles de expresión de MPC.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aghamohseni, H.; Ohadi, K.; Spearman, M.; Krahn, N.; Moo-Young, M.; Scharer, J.M.; Butler, M. and Budman, H.M. (2014). Effects of nutrient levels and average culture pH on the glycosylation pattern of camelid-humanized monoclonal antibody. *Journal of Biotechnology* 186, 98-109. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.05.024

Andersen D.C., Bridges T., Gawlitzek M. and Hoy C. 2000. Multiple cell culture factors can affect the glycosylation of Asn-184 in CHO-produced tissue-type plasminogen activator. *Biotechnology and Bioengineering* 70, 25-31. doi: 10.1002/1097-0290(20001005)70:1<25::AID-BIT4>3.0.CO;2-Q

Ahn, W. S. and Antoniewicz, M. R. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metabolic Engineering* 13, 598-609. doi:10.1016/j.ymben.2011.07.002

Altamirano, C.; Berrios, J.; Vergara, M.; Becerra, S. (2013). Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. *Electronic Journal of Biotechnology* 16(3), 1-14. doi: 10.2225/vol16-issue3-fulltext-2

Altamirano, C.; Illanes, A.; Becerra, S.; Cairó, J.; Gòdia, F. (2006). Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *Journal of Biotechnology* 125(4), 547-556. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.03.023

Altamirano, C.; Paredes, C.; Cairó, J. and Gòdia, C. (2000). Improvement of CHO cell culture medium formulation: Simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnology Progress* 16(1), 69-75. doi:10.1021/bp990124j

Altamirano, C.; Paredes, C.; Illanes, A.; Cairó J. and Gòdia, F. (2004). Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. *Journal of Biotechnology* 110, 171-179. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.02.004

Bader, D.A.; Hartig, S.M.; Putluri, V.; Foley, C.; Hamilton, M.P.; Smith, E.A.; Saha, P.K.; Panigrahi, A.; Walker, C.; Zong, L.; Martini-Stoica, H.; Chen, R.; Rajapakshe, K.; Coarfa, C.; Sreekumar, A.; Mitsiades, N.; Bankson, J.A.; Ittmann, M.M.; O'Malley, B.W.; Putluri, N. and McGuire, S.E. (2019). Mitochondrial pyruvate import is a metabolic vulnerability in androgen receptor-driven prostate cancer. *Nature Metabolism* 1, 70-85. doi: 10.1038/s42255-018-0002-y

Bahnmann, J.; Kayo, S.; Wahrheit, J.; Heinzle, E.; Pörtner, R. and Zeng AP. (2014). In search of an effective cell disruption method to isolate intact mitochondria from Chinese hamster ovary cells. *Engineering in Life Science* 14, 161–169. doi: 10.1002/elsc.201200182

Bandaranayake, A. D. and Almo, S. C. (2014). Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Letters* 588(2), 253–260. doi: 10.1016/j.febslet.2013.11.035

Barnes, L.M.; Bentley, C.M. and Dickson, A. (2003). Stability of protein production from recombinant mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering* 81(6), 631-638. doi: 10.1002/bit.10517

Barnes, L.M.; Bentley, C.M.; Moy, N. and Dickson, A.J. (2007). Molecular analysis of successful cell line selection in transfected GSNS0 myeloma cells. *Biotechnology and Bioengineering* 96, 337–348. doi: 10.1002/bit.21119

Bender, T. and Martinou, J.C. (2016). The mitochondrial pyruvate carrier in health and disease: To carry or not to carry? *Biochimica et Biophysica Acta* 1863, 2436–2442. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.01.017

Bender, T.; Pena, G. and Martinou, J.C. (2015). Regulation of mitochondrial pyruvate uptake by alternative pyruvate carrier complexes. *The EMBO Journal* 34, 911–924. doi:10.15252/embj.201490197

Berger, M.; Kaup, M. and Blanchard, V. (2012). Protein glycosylation and its impact on biotechnology. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 127, 165-85. doi: 10.1007/10_2011_101

Blondeel, E.J.M. and Aucoin, M.G. (2018). Supplementing glycosylation: A review of applying nucleotide-sugar precursors to growth medium to affect therapeutic recombinant protein glycoform distributions. *Biotechnology Advances* 36, 1505–1523. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.06.008

Bricker, D. K., Taylor, E. B., Schell, J. C., Orsak, T., Boutron, A., Chen, Y., Cox, J., Cardon, C.M.; Van Vranken, J.G.; Dephoure, N.; Redin, C.; Boudina, S.; Gygi, S.P.; Brivet, M.; Thummel, C.S. and Rutter, J. (2012). A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in Yeast, *Drosophila*, and humans. *Science* 337(6090), 96–100. doi:10.1126/science.1218099

Buchsteiner, M.; Quek, L-E.; Gray, P. and Nielsen, L.K. (2018). Improving culture performance and antibody production in CHO cell culture processes by reducing the Warburg effect. *Biotechnology and Bioengineering* 115(9), 2315-2327 doi:10.1002/bit.26724.

Bulté, D.B.; Palomares, L.A.; Gómez, C.; Martínez, J.A.; Contreras, M.A.; Noriega, L.G. and Ramírez, O.T. (2020). Overexpression of the mitochondrial pyruvate carrier reduces lactate production and increases

recombinant protein productivity in CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering* 117(9), 2633-2647. doi: 10.1002/bit.27439

Butler, M. (2006). Optimization of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology* 50(1-3), 57-76. doi: 10.1007/s10616-005-4537-x

Butler, M. and Spearman, M. (2014). The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 107–112. doi: 10.1016/j.copbio.2014.06.010

Cain, K.; Peters, S.; Hailu, H.; Sweeney, B.; Stephens, P.; Heads, J.; Sarkar, K.; Ventom, A.; Page, C. and Alan Dickson. (2013). A CHO Cell Line Engineered to Express XBP1 and ERO1-La Has Increased Levels of Transient Protein Expression. *Biotechnology Progress*. 29(3), 697-706. doi: 10.1002/btpr.1693

Chen, K.; Liu, Q.; Xie, L.; Sharp, P.A. and Wang, D.I.C. (2001). Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering* 72(1), 55-61. doi: 10.1002/1097-0290(20010105)72:1<55::aid-bit8>3.0.co;2-4

Chong, W.P.K.; Reddy, S.G.; Yusufi, F.N.K.; Lee, D.Y.; Wong, N.S.C.; Heng, C.K.; Yap, M.G.S. and Ho, Y.S. (2010). Metabolomics-driven approach for the improvement of Chinese hamster ovary cell growth: overexpression of malate dehydrogenase II. *Journal of Biotechnology* 147, 116-121. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.03.018.

Costa, A.R.; Rodrigues, M.E.; Henriques, M.; Oliveira, R. and Azeredo, J. (2013). Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production. *Critical Review in Biotechnology* 34(4), 281-299. doi: 10.3109/07388551.2013.793649

Costa-Leite, T.; Coelho, R.G.; Da Silva, D.; Coelho, W.S.; Marinho-Carvalho, M.M. and Sola-Penna, M. (2010). Lactate downregulates the glycolytic enzymes hexokinase and phosphofructokinase in diverse tissues from mice. *FEBS Letters* 585, 92–98. doi: 10.1016/j.febslet.2010.11.009

Costa-Leite, T.; Da Silva, D.; Coelho, R.G.; Zancan, P. and Sola-Penna, M. (2007). Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis. *Biochemical Journal* 408(1), 123–130. doi: 10.1042/BJ20070687.

Cruz, H.J.; Freitas, C.M.; Alves, P.M.; Moreira, J.L. and Carrondo, M.J.T. (2000). Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme and Microbial Technology* 27(1-2), 43-52. doi:10.1016/S0141-0229(00)00151-4

Dahodwala, H. and Lee, K.H. (2019). The fickle CHO: a review of the causes, implications, and potential alleviation of the CHO cell line instability problem. *Current Opinion in Biotechnology* 60,128–137. doi:10.1016/j.copbio.2019.01.011

Davis, T.R.; Munkenbeck, K.; Granados, R.R. and Wood, H.A. (1992). Baculovirus expression of alkaline phosphatase as a reporter gene for evaluation of production, glycosylation and secretion. *Biotechnology* 10, 148-150. doi: 10.1038/nbt1092-1148

Dutton, R.L.; Scharer, J.M.; Moo-Young, M. (1999). Hybridoma growth and productivity: effects of conditioned medium and of inoculum size. *Cytotechnology* 29, 1–10. doi: 10.1023/A:1008060802286

Elias, C.; Carpentier, E.; Durocher, Y.; Bisson, L.; Wagner, R. and Kamen A. (2003). Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and *Trichoplusia ni* insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. *Biotechnology Progress* 19, 90-97. doi: 10.1021/bp025572x

Fan, Y.; Del Val, I.; Müller, C.; Wagtberg, J.; Rasmussen, S.K.; Kontoravdi, C.; Weilguny, D. and Andersen, M.R. (2015). Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation. *Biotechnology and Bioengineering* 112(3), 521-535. doi:10.1002/bit.25450

Fischer, S; Handrick, R. and Otte, K. (2015). The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnology Advances* 33, 1878–1896. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.10.015

Fogolín, M.B.; Wagner, R.; Etcheverrigaray, M.; and Kratje R. (2004). Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *Journal of Biotechnology* 109, 179–191. doi:10.1016/j.jbiotec.2003.10.035

Freeman, J. (2016). Heading for a CHO Revolution: The need for cell line engineering to improve manufacturing cell lines. *BioProcess International* 14(1), 30-35.

Fu, T.; Zhang, C.; Jing, Y.; Jiang, C.; Li, Z.; Wang,S.; Ma, K.; Zhang, D.; Hou, S.; Dai, J.; Kou, G. and Wang, H. (2016). Regulation of cell growth and apoptosis through lactate dehydrogenase C over-expression in Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 5007-5016. doi: 10.1007/s00253-016-7348-4

Gambhir, A.; Korke, R.; Lee, J.; Fu, P.C.; Europa, A. and Hu, W.S. (2003). Analysis of cellular metabolism of hybridoma cells at distinct physiological states. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95(4), 317-327. doi:10.1016/S1389-1723(03)80062-2

Gawlitzek, M.; Ryll, T.; Lofgren, J. and Sliwkowski, M.B. (2000). Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: Degradative versus biosynthetic mechanisms. *Biotechnology and Bioengineering* 68(6), 637-643. doi: 10.1002/(sici)1097-0290(20000620)68:6<637::aid-bit6>3.0.co;2-c.

Golabgir, A.; Gutierrez, J.M.; Hefzi, H.; Li, S.; Palsson, B.O.; Herwig, C. and Lewis, N.E. (2016). Quantitative feature extraction from the Chinese hamster ovary bioprocess bibliome using a novel meta-analysis workflow. *Biotechnology Advances* 34, 621–633. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.02.011

Gómez, M.C. (2017). Sobreexpresión del transportador mitocondrial de piruvato en células CHO-S para favorecer la proliferación celular. Trabajo de Tesis para optar por el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas. IBT. UNAM.

Grammatikos, S.I.; Valley, U.; Nimtz, M.; Conradt, H.S. and Wagner, R. (1998). Intracellular UDP-N-acetylhexosamine pool affects n-glycan complexity: A mechanism of ammonium action on protein glycosylation. *Biotechnology Progress* 14, 410-419. doi: 10.1021/bp980005o

Guile, G. R.; Rudd, P. M.; Wing, D. R. and Dwek, R. A. (1997). HPLC strategies for profiling and sequencing oligosaccharides. In *A Laboratory Guide to Glycoconjugate Analysis*; Jackson, P., Gallagher, J. T., Eds.; Birkhauser Verlag: Basel, Switzerland (9), 199-234.

Gupta, S.K.; Sharma, A.; Kushwaha, H. and Shukla, P. (2017a). Over-expression of a codon optimized yeast cytosolic pyruvate carboxylase (PYC2) in CHO cells for an augmented lactate metabolism. *Frontiers in Pharmacology* 8(463), 1-11. doi: 10.3389/fphar.2017.00463

Gupta, S.K.; Srivastava, S.K.; Sharma, A.; Nalage, V.H.H.; Salvi, D.; Kushwaha, H.; Chitnis, N.B. and Shukla, P. (2017b). Metabolic engineering of CHO cells for the development of a robust protein production platform. *PLoS ONE* 12(8), 1-23. doi: 10.1371/journal.pone.0181455

Ha, T.K. and Lee, M. (2015). Glutamine substitution: the role it can play to enhance therapeutic protein production. *Pharm Bioprocess* 3, 249-261. doi: 10.4155/PBP.15.6

Halestrap, A.P. (1975). The Mitochondrial Pyruvate Carrier kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochemical Journal* 148, 85-96. doi: 10.1042/bj1480085

Hartley, F.; Walker, T.; Chung, V. and Morten, K. (2018). Mechanisms driving the lactate switch in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering* 115, 1890–1903. doi: 10.1002/bit.26603

Hassinen, A. and Kellokumpu, S. (2014). Organizational interplay of Golgi N-glycosyltransferases involves organelle microenvironment-dependent transitions between enzyme homo- and heteromers. *Journal of Biological Chemistry* 289, 26937-26948. doi:10.1074/jbc.M114.595058.

Herzig, S.; Raemy, E.; Montessuit, S.; Veuthey, J.; Zamboni, N.; Westermann, B.; Kunji, E.R. and Martinou, J.C. (2012). Identification and Functional Expression of the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *Science* 337, 93-96. doi: 10.1126/science.1218530

Hills, A.E.; Patel, A.; Boyd, P. and James, D.C. (2001). Metabolic control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation in GS-NS0 cells. *Biotechnology and Bioengineering* 75(2), 239-51. doi: 10.1002/bit.10022

Hodoniczky, J.; Zheng, Y.Z. and James, C.D. (2005). Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro. *Biotechnology Progress* 21(6), 1644-52. doi: 10.1021/bp050228w

Hong, J.K.; Cho, S.M. and Yoon, S.K. (2010). Substitution of glutamine by glutamate enhances production and galactosylation of recombinant IgG in Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88(4), 869-876. doi: 10.1007/s00253-010-2790-1

Hossler, P.; Khattak, S.F. and Li, Z.J. (2009). Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology* 19(9), 936-949. doi:10.1093/glycob/cwp079

Hussain, H.; Maldonado-Agurto, R. and Dickson, A.J. (2014). The endoplasmic reticulum and unfolded protein response in the control of mammalian recombinant protein production. *Biotechnology Letters* 36, 1581-1593. doi: 10.1007/s10529-014-1537-y

Irani, N.; Wirth, M.; Van den Heuvel, J. and Wagner, R. (1999). Improvement of the Primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnology and Bioengineering* 66(4), 238-246. doi: 10.1002/(sici)1097-0290(1999)66:4<238::aid-bit5>3.0.co;2-6

Jayapal, K.P.; Wlaschin, K.F.; Hu, W.S. and Yap, M. (2007). Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 Years and counting. *Chemical Engineering Progress* 103(10), 40-47.

Jeong, D.W.; Kim, T.S.; Lee, J.W.; Kim, T.K.; Kim, H.J.; Kim, I.H. And Kim, I.Y. (2001). Blocking of acidosis-mediated apoptosis by a reduction of lactate dehydrogenase activity through antisense mRNA expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289(5), 1141-1149. doi:10.1006/bbrc.2001.6091

Jun, S.C.; Kim, M.S.; Baik, J.Y.; Hwang, S.O. and Lee, G.M. (2005). Selection strategies for the establishment of recombinant Chinese hamster ovary cell line with dihydrofolate reductase-mediated gene amplification. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69, 162–169. doi: 10.1007/s00253-005-1972-8

Karengera, E.; Durocher, Y.; De Crescenzo, G. and Henry, O. (2017a). Combining metabolic and process engineering strategies to improve recombinant glycoprotein production and quality. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, 7837-7851. doi: 10.1007/s00253-017-8513-0.

Karengera, E.; Robotham, A.; Kelly, J.; Durocher, Y.; De Crescenzo, G. and Henry, O. (2017b). Altering the central carbon metabolism of HEK293 cells: impact on recombinant glycoprotein quality. *Journal of Biotechnology* 242, 73-82 doi: 10.1016/j. jbiotec.2016.12.003.

Karengera, E.; Robotham, A.; Kelly, J.; Durocher, Y.; De Crescenzo, G. and Henry, O. (2018). Concomitant reduction of lactate and ammonia accumulation in fed-batch cultures: Impact on glycoprotein production and quality. *Biotechnology Progress* 34(2), 494-504. doi: 10.1002/btpr.2607.

Kelly, P.S.; Alarcon, A.; Alves, C. and Barron, N. (2018). From media to mitochondria—rewiring cellular energy metabolism of Chinese hamster ovary cells for the enhanced production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Chemical Engineering* 22, 71–80. doi: 10.1016/j.coche.2018.08.009

Kim, N.S.; Byun, T.H. and Lee, G.M. (2001). Key Determinants in the Occurrence of Clonal Variation in Humanized Antibody Expression of CHO Cells during dihydrofolate reductase mediated gene amplification. *Biotechnology Progress* 17, 69-75. doi: 10.1021/bp000144h

Kim, S. and Lee, G. (2007). Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 152–159. doi: 10.1007/s00253-006-0654-5

Kim, S.J. and Lee, J.M. (1999). Cytogenetic analysis of chimeric antibody-producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. *Biotechnology and Bioengineering* 64(6), 741-749. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19990920)64:6<741::AID-BIT14>3.0.CO;2-X

Koh, E.; Kim, Y.K.; Shin, D. and Kim, K.S. (2018). MPC1 is essential for PGC-1 α -induced mitochondrial respiration and biogenesis. *Biochemical Journal* 475, 1687–1699. doi:10.1042/BCJ20170967

Ku, S.C.; Toh, P.C.; Lee, Y.Y.; Chusainow, J.; Yap, M.G. and Chao, S.H. (2009). Regulation of XBP-1 signaling during transient and stable recombinant protein production in CHO cells. *Biotechnology Progress* 26, 517–526. doi: 10.1002/btpr.322

Kumar, P.; Nagarajan, A. and Uchil, P.D. (2018). Selective agents for stable transfection. *Cold Spring Harbor Laboratory Protocol*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi:10.1101/pdb.top096230

Lai, T.; Yang, Y. and Kong, S. (2013). Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals* 6, 579-603. doi: 10.3390/ph6050579

Lao, M.S. and Toth, D. (1997). Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology Progress* 13(5), 688-691. doi: 10.1021/bp9602360.

Le, H.; Vishwanathan, N.; Kantardjieff, A.; Doo, I.; Srienc, M.; Zheng, X.; Somia, N. and Hu, W. (2013). Dynamic gene expression for metabolic engineering of mammalian cells in culture. *Metabolic Engineering* 20, 212-220 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2013.09.004>

Li, S.; Gao, X.; Peng, R.; Zhang, S.; Fu, W. and Zou, F. (2016). FISH-Based analysis of clonally derived CHO cell populations reveals high probability for transgene integration in a terminal region of chromosome 1 (1q13). *PLoS ONE* 11(9), 1-15. doi:10.1371/journal.pone.0163893.

Lim, Y.; Wong, N.S.; Lee, Y.Y.; Ku, S.C.; Wong, D.C. and Yap, M.G. (2010). Engineering mammalian cells in bioprocessing—current achievements and future perspectives. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 55,175–189. doi: 10.1042/BA20090363

Lipscomb, M.L.; Palomares, L.A.; Hernández, V.; Ramírez, O.T. and Kompala, D.S. (2005). Effect of production method and gene amplification on the glycosylation pattern of a secreted reporter protein in CHO cells. *Biotechnology Progress* 21, 40-49. doi: 10.1021/bp049761m

Liu, L. (2015). Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 104, 1866–1884. doi: 10.1002/jps.24444

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262

Locasale, J. W. and Cantley, L. C. (2011). Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metabolism* 14(4), 443–451. doi:10.1016/j.cmet.2011.07.014

Martinelle, K.; Doverskog, M.; Jacobsson, U.; Chapman, B.E.; Kuchel, P.W. and Häggström, L. (1998). Elevated glutamate dehydrogenase flux in glucose-deprived hybridoma and myeloma cells: Evidence from ¹H/¹⁵N NMR. *Biotechnology and Bioengineering* 60(4), 508-517. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19981120)60:4<508::AID-BIT13>3.0.CO;2-D

Martínez, J.A.; Bulté D.B.; Contreras M.A.; Palomares L.A. and Ramírez O.T. (2020). Dynamic modeling of CHO cell metabolism using the hybrid cybernetic approach with a novel elementary mode analysis strategy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8, 279. doi: 10.3389/fbioe.2020.00279

Martínez, V.S.; Dietmair, S.; Quek, L.; Hodson, M.P.; Gray, P. and Nielsen, L.K. (2013). Flux Balance Analysis of CHO cells before and after a metabolic switch from lactate production to consumption. *Biotechnology and Bioengineering* 110(2), 660-666. doi: 10.1002/bit.24728

Mason, M.; Sweeney, B.; Cain, K.; Stephens, P. and Sharfstein, S.T. (2012). Identifying bottlenecks in transient and stable production of recombinant monoclonal-antibody sequence variants in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Progress* 28(3), 846-855. doi: 10.1002/btpr.1542

Masterjohn, E. (2016). Evaluation of cellular mechanisms involved in recombinant antibody expression in transiently Transfected Chinese Hamster Ovary Cells. Master's thesis, Harvard Extension School. <http://nrs.harvard.edu/urn-3:HUL.InstRepos:33797315>

McAtee, A.G.; Templeton, N. and Young, J.D. (2014). Role of Chinese hamster ovary central carbon metabolism in controlling the quality of secreted biotherapeutic proteins. *Pharmaceutical Bioprocessing* 2(1), 63–74. doi:10.4155/PBP.13.65

Mohan, C.; Kim, Y.G.; Koo J. and Lee, G.M. (2008). Assessment of cell engineering strategies for improved therapeutic protein production in CHO cells. *Biotechnology Journal* 3, 624–630. doi: 10.1002/biot.200700249

Molina, M.A.; Segura, J.C.; Aledo, J.; Medina, M.A.; Nunez De Castro, I. and Marquez, J. (1995). Glutamine transport by vesicles isolated from tumour-cell mitochondrial inner membrane. *Biochemical Journal* 308(2), 629–633. doi: 10.1042/bj3080629

Mulukutla, B.C.; Gramer, M. and Hu, WS. (2012). On metabolic shift to lactate consumption in fed-batch culture of mammalian cells. *Metabolic Engineering* 14, 138–149. doi:10.1016/j.ymben.2011.12.006

Nagampalli, R.S.K.; Neciosup, J.E.; Adamoski, D.; Islam, Z.; Birch, J.; Sebinelli, H.G.; Moreira, R.M.; Rodrigues, C.F.; Fala, A.M.; Alves, B.; Consonni, S.R.; Ferreira, J.; Teixeira, A.C.; Gomes, K.; Franco, A.; Silber,

A.M.; Ciancaglini, P.; Moraes, I.; Gomes, S.M. and Berteli, A.L. (2018). Human mitochondrial pyruvate carrier 2 as an autonomous membrane transporter. *Nature* 8, 3510. doi: 10.1038/s41598-018-21740-z

Nallet, S.; Wurm, F.M. and Hacker, D.L. (2008). Recombinant protein production yields from mammalian cells: past, present, and future. *BioPharm International* 21(5), S6–S14.

Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7th Edition, W.H. Freeman, New York, 1328.

Nyberg, G.B.; Balcarcel, R.R.; Follstad, B.D.; Stephanopoulos, G. and Wang, D.I.C. (1999). Metabolic effects on recombinant Interferon-g glycosylation in continuous culture of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering* 62(3), 336-347. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990205)62:3<336::AID-BIT10>3.0.CO;2-N

Pacis, E.; Yu, M.; Autsen, J.; Bayer, R. and Li, F. (2011). Effects of cell culture conditions on antibody N-linked glycosylation—what affects high mannose 5 glycoform. *Biotechnology and Bioengineering* 108(10), 2348–2358. doi:10.1002/bit.23200

Paredes, C.; Prats, E.; Cairo, J.J.; Azorín, F.; Cornudella, L.I. and Gódia, F. (1999). Modification of glucose and glutamine metabolism in hybridoma cells through metabolic engineering. *Cytotechnology* 30(1-3), 85-93. doi: 10.1023/A:1008012518961

Patel, M. S. and Korotchkina L. G. (2001). Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: complexity of multiple phosphorylation sites and kinases. *Experimental and Molecular Medicine* 33(4), 191-197. doi: 10.1038/emm.2001.32

Pereira, S.; Kildegaard, H.F. and Andersen, M.R. (2018). Impact of CHO metabolism on cell growth and protein production: An overview of toxic and inhibiting metabolites and nutrients. *Biotechnology Journal* 13, 1700499. doi: 10.1002/biot.201700499

Puck, T.T.; Cieciura, S.J. and Robinson, A. (1958). Genetics of somatic mammalian cells III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *Journal of Experimental Medicine* 108(6), 945–956. doi: 10.1084/jem.108.6.945

Reusch, D. and Tejada, M.L. (2015). Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology* 25(12), 1325–1334. doi: 10.1093/glycob/cwv065

Rivinoja, A.; Hassinen, A.; Kokkonen, N.; Kauppila, A. and Kellokumpu, S. (2009). Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *Journal of Cellular Physiology* 220(1), 144-54. doi:10.1002/jcp.21744

Rodríguez, M. (2014). Estudio de la internalización en células de mamífero de nanotubos formados por la proteína VP6 de rotavirus: explorando el camino hacia un nuevo sistema de entrega de material genético. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas. IBT. UNAM.

Rouvinski, A., Guardado-Calvo, P., Barba-Spaeth, G., Duquerroy, S., Vaney, M.-C., Kikutj, C. M.; Navarro, M.E.; Dejnirattisai, W.; Wongwiwat, W.; Haouz, A.; Girard-Blanc, C.; Petres, S.; Shepard, W.E.; Desprès, F.; Arenzana-Seisdedos, F.; Dussart, P.; Mongkolsapaya, J.; Screaton, G.R. and Rey, F.A. (2015). Recognition determinants of broadly neutralizing human antibodies against dengue viruses. *Nature*, 520, 109. doi: 10.1038/nature14130

Ruas, J.S.; Siqueira-Santos, E.S.; Amigo, I.; Rodrigues-Silva, E.; Kowaltowski, A.J. and Castilho, R.F. (2016). Underestimation of the maximal capacity of the mitochondrial electron transport system in oligomycin-treated cells. *PLoS ONE* 11(3), e0150967. doi:10.1371/journal.pone.0150967

Sanfeliu, A.; Paredes, C.; Cairó, J.J. and Gòdia, F. (1997). Identification of key patterns in the metabolism of hybridoma cells in culture. *Enzyme and Microbial Technology* 21(6), 421-428. doi: 10.1016/S0141-0229(97)00015-X

Santell, L.; Ryll, T.; Etcheverry, T.; Santoris, M.; Dutina, G.; Wang, A.; Gunson, J.; Warner, T. G. (1999). Aberrant metabolic sialylation of recombinant proteins expressed in Chinese hamster ovary cells in high productivity cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 258, 132-137. doi: 10.1006/bbrc.1999.0550

Schell, J.C.; Olson, K.A.; Jiang, L.; Hawkins, A.J.; Van Vranken, J.G.; Xie, J.; Egnatchik, R.A.; Earl, E.G.; DeBerardinis, R.J and Rutter, J. (2014). A Role for the Mitochondrial Pyruvate Carrier as a repressor of the Warburg effect and colon cancer cell growth. *Molecular Cell* 56, 400–413. doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.026

Schneider, M.; Marison, I.W. and Von Stockar, U. (1996). The importance of ammonia in mammalian cell culture. *Journal of Biotechnology* 46(3), 161-185. doi: 10.1016/0168-1656(95)00196-4

Sen, D.; Balakrishnan, B. and Jayandharan, G.R. (2014). Cellular unfolded protein response against viruses used in gene therapy. *Frontiers in Microbiology* 5, 1-16. doi: 10.3389/fmicb.2014.00250

Serrato, J.A.; Hernández, V.; Estrada-Mondaca, S.; Palomares, L. A. and Ramírez, O.T. 2007. Differences in the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by hybridomas cultured in serum-supplemented, serum-free or chemically defined media. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 47, 113–124. doi: 10.1042/BA20060216

Shelikoff, M.; Sinskey, A. J.; Stephanopoulos, G. (1994). The effect of protein synthesis inhibitors on the glycosylation site occupancy of recombinant human prolactin. *Cytotechnology* 15, 195–208. doi: 10.1007/BF00762394

Sinclair, A.M. and Elliott, S. (2005). Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94, 1626–1635. doi: 10.1002/jps.20319

Strovas, T.J.; McQuaide, S.C.; Anderson, J.B.; Nandakumar, V.; Kalyuzhnaya, M.G.; Burgess, L.W.; Holl, M.R.; Meldrum, D.R. and Lidstrom, M.E. (2010). Direct measurement of oxygen consumption rates from attached and unattached cells in a reversibly sealed, diffusionally isolated sample chamber. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 5(5), 398–408. doi:10.4236/abb.2010.15053

Sun, Y.; Zhao, L.; Ye, Z.; Fan, L.; Xping, L. and Tan, W.S. (2013). Development of a fed-batch cultivation for antibody-producing cells based on combined feeding strategy of glucose and galactose. *Biochemical Engineering Journal* 81, 126–135. doi: 10.1016/j.bej.2013.10.012

Tavoulari, S.; Thangaratnarajah, Ch.; Mavridou, V.; Harbour, M.E.; Martinou, J.C. and Kunji, E. (2019). The yeast mitochondrial pyruvate carrier is a hetero-dimer in its functional state. *The EMBO Journal* 38, 1–13. doi: 10.15252/embj.2018100785

Templeton, N. and Young, J.D. (2018). Biochemical and metabolic engineering approaches to enhance production of therapeutic proteins in animal cell cultures. *Biochemical Engineering Journal* 136, 40–50. doi:10.1016/j.bej.2018.04.008

Templeton, N.; Dean, J.; Reddy, P. and Young, J.D. (2013). Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture. *Biotechnology and Bioengineering* 110(7), 2013–2024. doi:10.1002/bit.24858

Torres, M.; Altamirano, C. and Dickson, A.J. (2018). Process and metabolic engineering perspectives of lactate production in mammalian cell cultures. *Current Opinion in Chemical Engineering* 22, 184–190. doi:10.1016/j.coche.2018.10.004

- Toussaint, C.; Henry, O. and Durocher, I. (2016). Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology* 217, 122–131. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.11.010
- Vacanti, N. M.; Divakaruni, A. S.; Green, C. R.; Parker, S. J.; Henry, R. R.; Ciaraldi, T. P.; Murphy, A.N. and Metallo, C. M. (2014). Regulation of substrate utilization by the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *Molecular Cell* 56(3), 425–435. doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.024
- Vallée, C.; Durocher, Y. and Henry, O. (2014). Exploiting the metabolism of PYC expressing HEK293 cells in fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology* 169, 63–70. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.11.002
- Valley, U.; Nimtz, M.; Conradt, H.S. and Wagner, R. (1999). Incorporation of ammonium into intracellular UDP-activated N-acetylhexosamines and into carbohydrate structures in glycoproteins. *Biotechnology and Bioengineering* 64, 401–417. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990820)64:4<401::AID-BIT3>3.0.CO;2-M.
- Vander, H., M. G.; Cantley, L. C. and Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033. doi: 10.1126/science.1160809
- Vanderperre, B.; Bender, T.; Kunji, E.R.S. and Martinou, J-C. (2015). Mitochondrial pyruvate import and its effects on homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology* 33, 35–41. doi: 10.1016/j.ceb.2014.10.008.
- Vergara, M.; Becerra, S.; Julio, A. D.; Berrios, J. and Altamirano C. (2012). Simultaneous environmental manipulations in semi-perfusion cultures of CHO cells producing rh-Tpa. *Electronic Journal Biotechnology* 15, 1–9. doi: 10.2225/vol15-issue6-fulltext-2
- Wahrheit, J.; Niklas, J. and Heinzle, E. (2014). Metabolic control at the cytosol – mitochondria interface in different growth phases of CHO cells. *Metabolic Engineering* 23, 9–21. doi: 10.1016/j.ymben.2014.02.001
- Walsh, G. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology* 36(12), 1136–1145. doi: 10.1038/nbt.4305
- Wang, L.; Xu, M.; Qin, J.; Lin, SC.; Lee, HJ.; Tsai, SY. and Ming-Jer Tsai. (2016). MPC1, a key gene in cancer metabolism, is regulated by COUP-TFII in human prostate cancer. *Oncotarget* 7(12), 14673-14683. doi: 10.18632/oncotarget.7405
- Wilkens, C.; Vishwanathan, N.; Baltés, N.J.; Lucero, A.T.; Hu, W. and Gerdtsen, Z.P. (2019). An LDHa single allele CHO cell mutant exhibits altered metabolic state and enhanced culture performance. *Chemical Technology and Biotechnology* 94(5), 1488-1498. doi: 10.1002/jctb.5906

Wilkens, C.A. and Gerdtzen, Z.P. (2015). Comparative metabolic analysis of CHO cell clones obtained through cell engineering, for IgG productivity, growth and cell longevity. *PLoS One* 10, 1-15 doi: [10.1371/journal.pone.0119053](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119053)

Wilkens, C.A.; Altamirano, C. and Gerdtzen, Z.P. (2011). Comparative metabolic analysis of lactate for CHO cells in glucose and galactose. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16(4), 714-724. doi: [10.1186/1753-6561-5-S8-P120](https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S8-P120)

Wilson, C.; Bellen, H.J. and Gehring, W.J. (1990). Position effects on eukaryotic gene expression. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 6, 679–714. doi: [10.1146/annurev.cb.06.110190.003335](https://doi.org/10.1146/annurev.cb.06.110190.003335)

Wong, N.S.; Wati, L.; Nissom, P.M.; Feng, H.T.; Lee, M.M. and Yap, M.G. (2010). An investigation of intracellular glycosylation activities in CHO cells: effects of nucleotide sugar precursor feeding. *Biotechnology and Bioengineering* 107(2), 321-36. doi: [10.1002/bit.22812](https://doi.org/10.1002/bit.22812)

Wurm, F.M. (2013). CHO Quasispecies—Implications for Manufacturing Processes. *Processes* 1, 296-311. doi: [10.3390/pr1030296](https://doi.org/10.3390/pr1030296)

Xiao, B.; Fan, Y.; Ye, M., Lv, S.; Xu, B.; Chai, Y.; Wu, M. and Zhu, X. (2018). Downregulation of COUP-TFII inhibits glioblastoma growth via targeting MPC1. *Oncology Letters* 15, 9697-9702. doi: [10.3892/ol.2018.8601](https://doi.org/10.3892/ol.2018.8601)

Xie, L.; Miao, J.; Li, X.; Yi, X. and Chu, J. (2019). Regulation of the pyruvate metabolism node by monogene and polygene engineering of HEK-293 cells. *RSC Adv.* 9, 35760–35770. doi: [10.1039/c9ra07418j](https://doi.org/10.1039/c9ra07418j)

Yang, C.; Ko, B.; Hensley, C. T.; Jiang, L.; Wasti, A. T.; Kim, J.; Sudderth, J.; Calvaruso, M.A.; Lumata, L.; Mitsche, M.; Rutter, J.; Merritt, M.E. and DeBerardinis, R.J. (2014). Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. *Molecular Cell* 56(3), 414–424. doi: [10.1016/j.molcel.2014.09.025](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.025)

Yang, C.; Sudderth, J.; Dang, T.; Bachoo, R. G.; Jeffrey, G. and Deberardinis, R. J. (2009). Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling. *Cancer Research* 69(20), 7986–7993. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-09-2266](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2266)

Yang, M. and Butler, M. (2002). Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms. *Biotechnology Progress* 18(1), 129-138. doi: [10.1021/bp0101334](https://doi.org/10.1021/bp0101334)

Young, J.D. (2014). ¹³C MFA of recombinant expression hosts. *Current Opinion in Biotechnology* 30, 238–245. doi: [10.1016/j.copbio.2014.10.004](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.10.004)

Zagari, F.; Jordan, M.; Stettler, M.; Broly, H. and Wurm, F.M. (2013a). Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *New Biotechnology* 30(2), 238-245. doi:10.1016/j.nbt.2012.05.021

Zagari, F.; Stettler, M.; Baldi, L.; Broly, H.; Wurm, F. M. and Jordan, M. (2013b). High expression of the aspartate–glutamate carrier Aralar1 favors lactate consumption in CHO cell culture. *Pharmaceutical Bioprocessing* 1(1), 19–27. doi: 10.4155/PBP.13.5

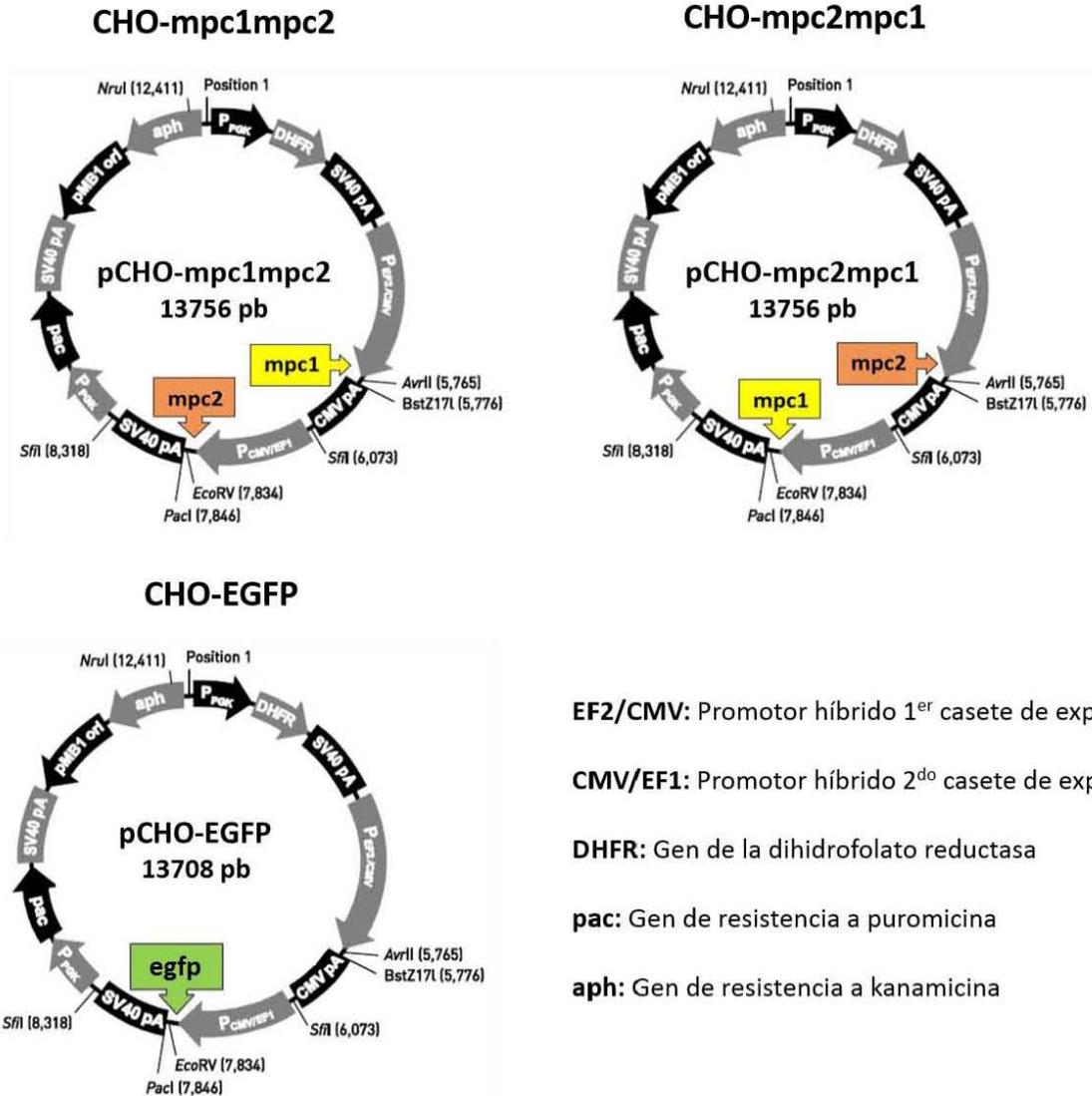
Zamorano, F.; Vande-Wouwer, A. and Bastin, G. (2010). A detailed metabolic flux analysis of an underdetermined network of CHO cells. *Journal of Biotechnology* 150(4), 497-508. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.09.944

Zhang, L.; Castan, A.; Stevenson, J.; Chatzissavidou, N.; Vilaplana, F. and Chotteau, V. (2019). Combined effects of glycosylation precursors and lactate on the glycoprofile of IgG produced by CHO cells. *Journal of Biotechnology* 289, 71–79. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.11.004

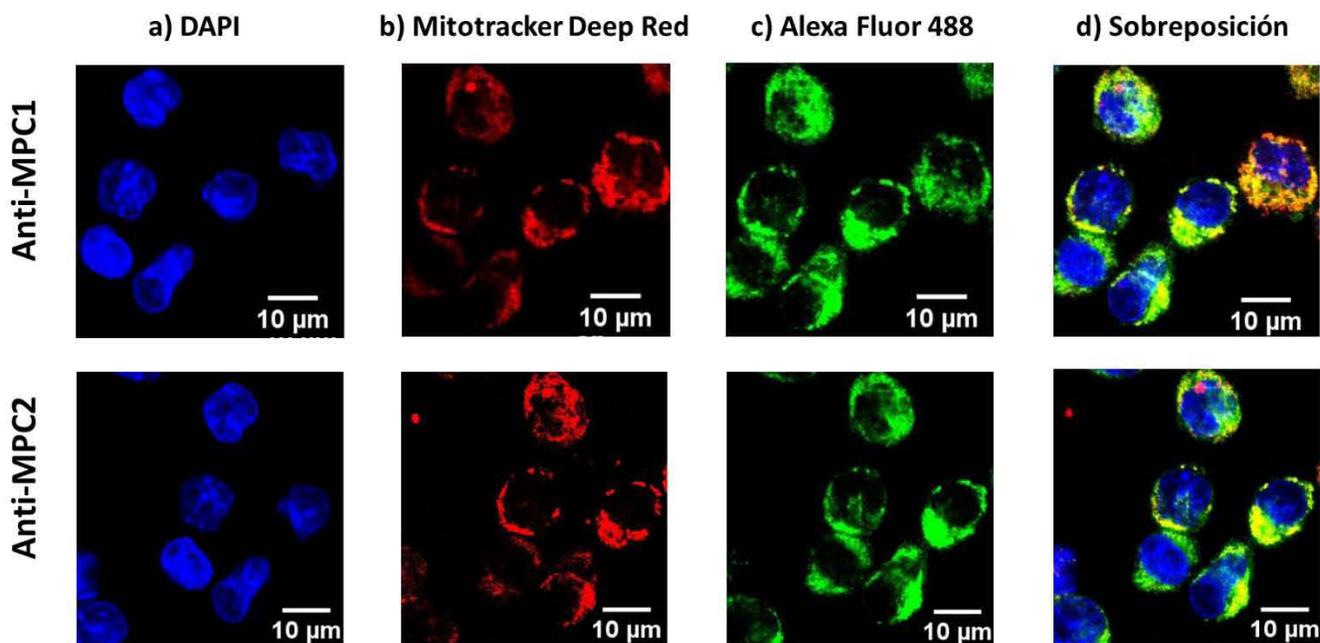
Zhou, M.; Crawford, Y.; Ng, D.; Tunga, J.; Pynna, A.; Meiera, A.; Yuka, I.H.; Vijayasankaranb, N.; Leacha, K.; Jolya, J.; Snedecora, B. and Shen, A. (2011). Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese hamster ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. *Journal of Biotechnology* 153(1–2), 27–34. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.03.003

ANEXOS

Anexo 1: Construcciones del vector pCHO 1.0 que fueron empleadas en la obtención de las líneas estables no clonales CHOmpc1mpc2, CHOmpc2mpc1 y CHO-EGFP.

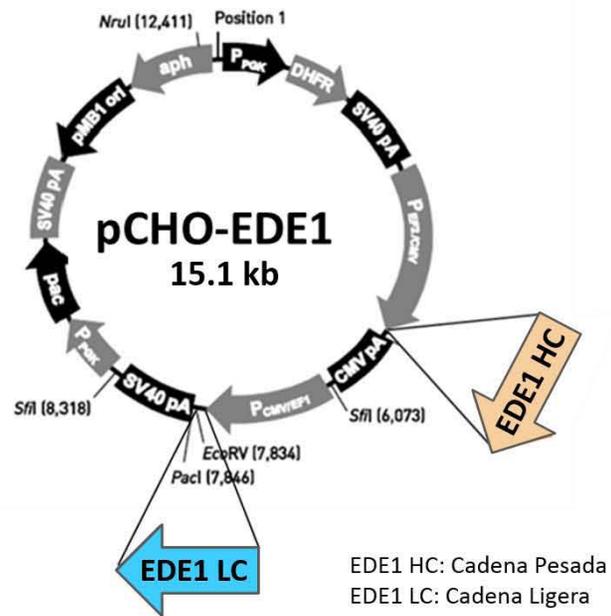
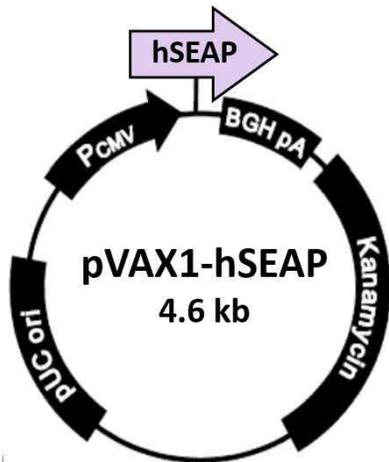


Anexo 2: Localización mitocondrial de MPC1 y MPC2 recombinantes en células CHOmpc2mpc1 por inmunofluorescencia y microscopía confocal.



Las imágenes representan la proyección de máxima intensidad de 16 Z-stacks de 0,49 μm de espesor con un aumento de 60X.

Anexo 3: Construcciones utilizadas para la expresión transitoria de las proteínas modelo hSEAP y el AcM

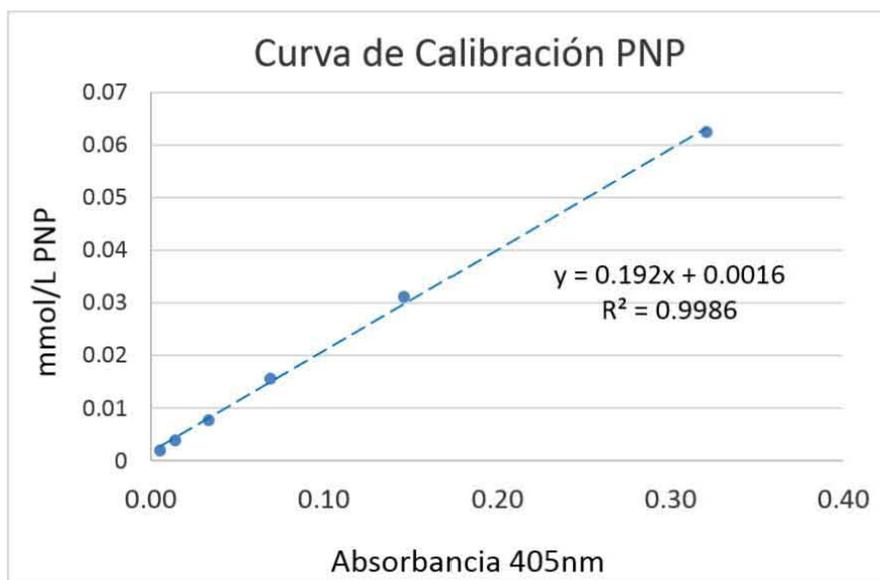


Anexo 4: Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de secuencias de interés en la construcción de los vectores utilizados.

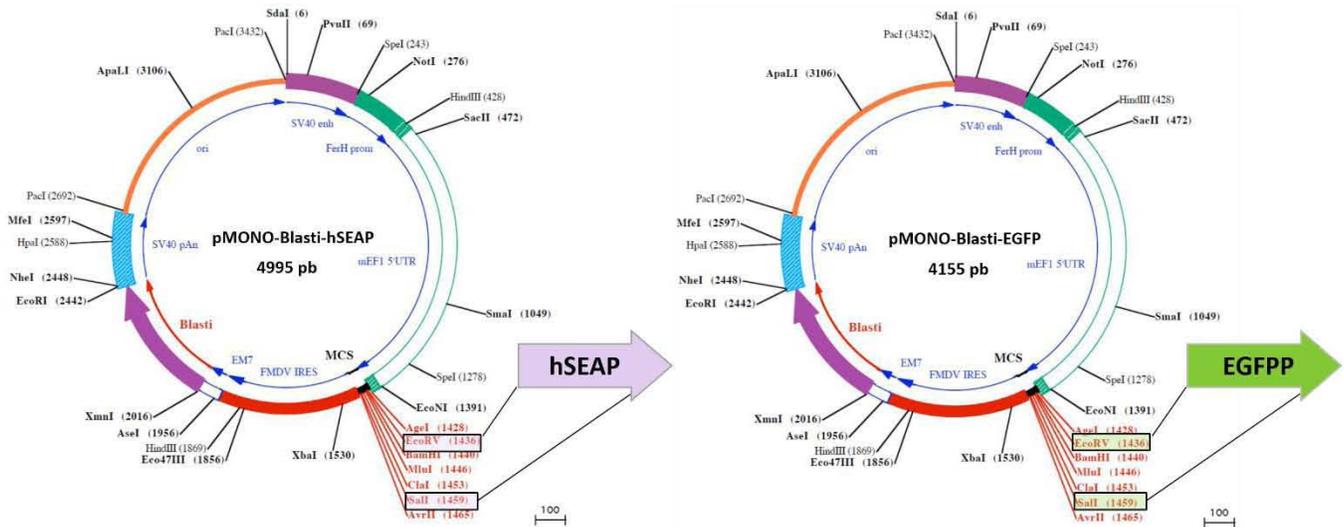
Nombre	Secuencia	Tamaño
HindIII-hSEAP-Fwd	CTT GAA AGC TTC GCC CAC CAT GCT GC	26pb
XhoI-hSEAP-Rev	GCC GCT TCG AGC AGA CAT GAT ACC TCG AGA CCA G	34pb
EcoRV-hSEAP-Fwd	ATT TTG ATA TCC CGC CAC CAT GCT G	31pb
Sall-hSEAP-Rev	CCA AAG TCG ACG TAT CAT GTC TGC TCG AAG CGG	33pb
EcoRV-EGFP-Fwd	ATT TTG ATA TCG CCA TGG TGA GCA AGG G	31pb
Sall-EFGP-Rev	CCT TTC GTC GAC CGC TTT ACT TGT ACA GCC	30pb

Anexo 5: Construcción de la Curva de Calibración de PNP para la determinación de la concentración de hSEAP mediante el ensayo de actividad enzimática.

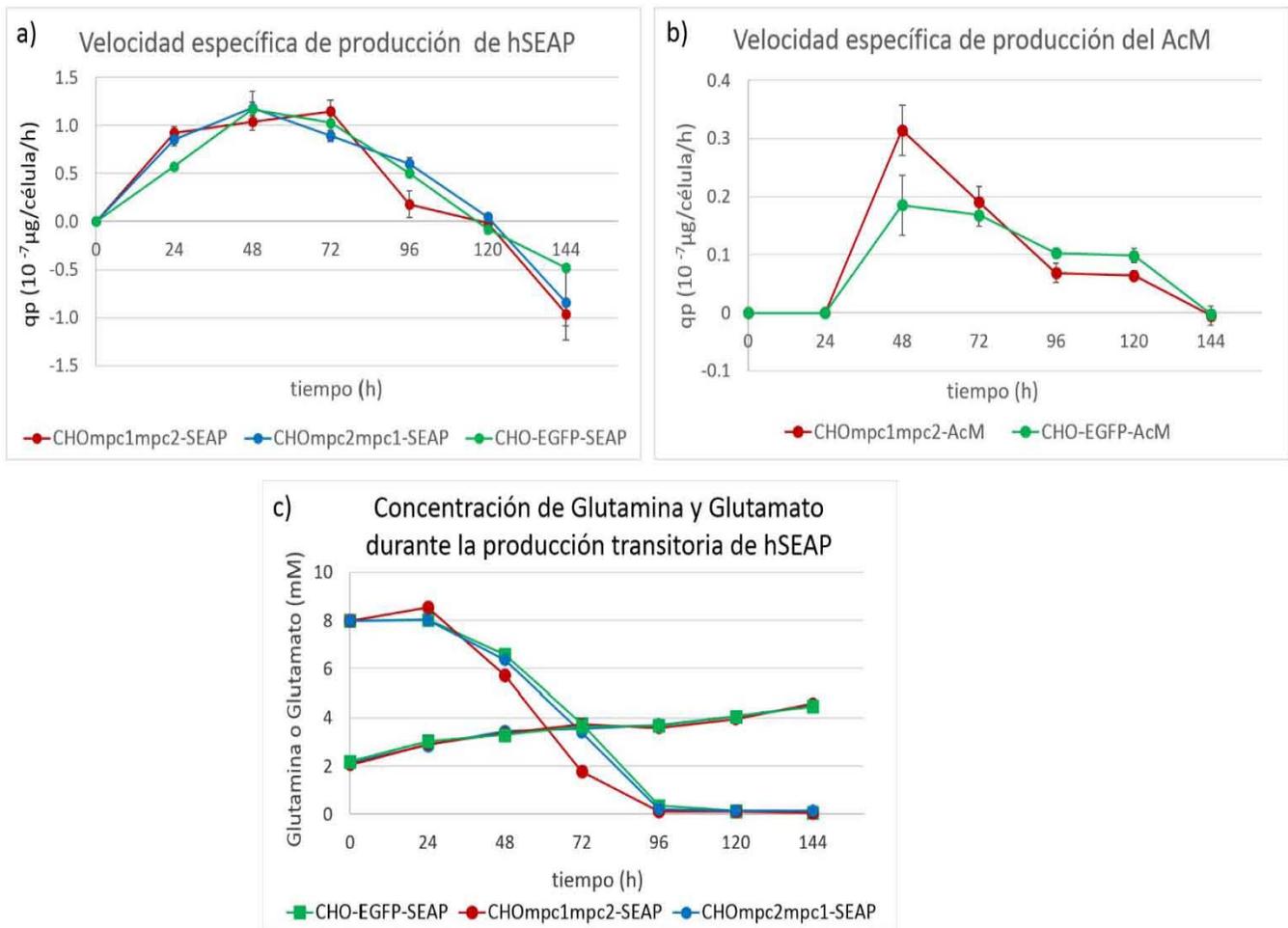
Absorbancia 405nm					Valores graficados	
Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	Desviación	Ajuste con el Blanco	PNP (mmol/L)
0.040	0.041	0.041	0.041	0.001	0.000	0.0000
0.045	0.046	0.047	0.046	0.001	0.005	0.0020
0.054	0.055	0.055	0.055	0.001	0.014	0.0039
0.072	0.075	0.075	0.074	0.002	0.033	0.0078
0.110	0.111	0.109	0.110	0.001	0.069	0.0156
0.189	0.187	0.186	0.187	0.002	0.147	0.0313
0.360	0.360	0.365	0.362	0.003	0.321	0.0625



Anexo 6: Construcciones de vectores a partir del plásmido comercial pMONO-Blasti, utilizados para la expresión estable de hSEAP.

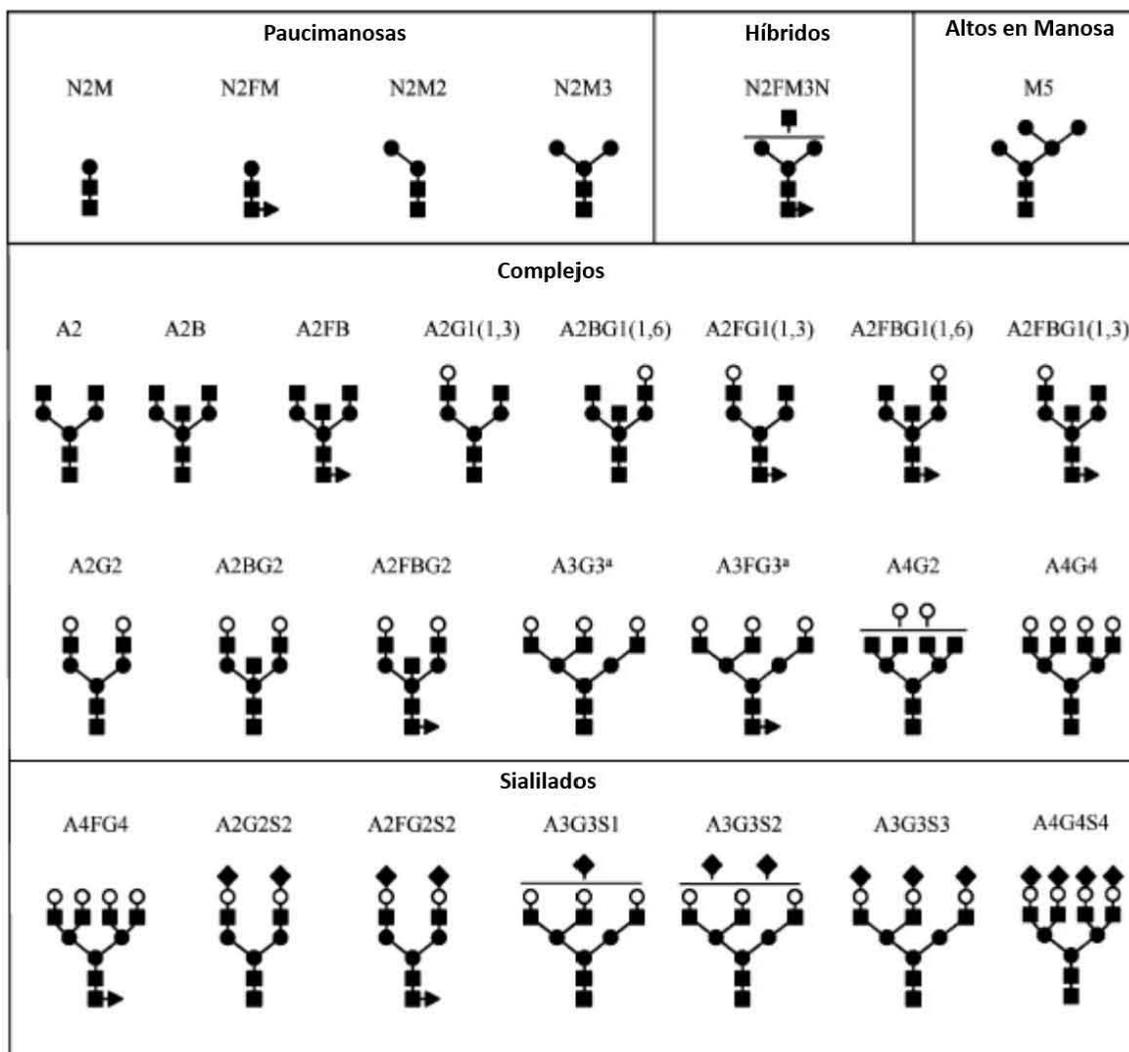


Anexo 7: Comportamiento de la velocidad específica de producción (q_p) durante las cinéticas de producción transitoria de hSEAP y el AcM (a, b) y de las concentraciones de glutamina y glutamato durante la cinética de producción transitoria de hSEAP (c).



Anexo 8: Representación esquemática de las estructuras de glicanos aisladas de muestras de hSEAP.

(Adaptado de *Lipscomb et al., 2005*)



- ◆ Ácido siálico
- Galactosa
- N-acetil glucosamina
- Manosa
- ▶ Fucosa