



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL REDOX DE GOLGI DE CÉLULAS CHO-hSEAP Y SU
RESPUESTA EN CONDICIONES DE HIPOXIA USANDO LA PROTEÍNA SENSORA DE REDOX
roGFP1-iL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Blga. Stfanny Wendy Meza Soto

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas, Instituto de Biotecnología
Dra. Angélica Meneses Acosta, UAEM

Cuernavaca, Morelos, Agosto, 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.

DEDICATORIA

A mis padres Roger Meza y Belia Soto, por su cariño, apoyo y confianza. Por permitirme perseguir mis sueños, aunque ello implique estar en otro país, lejos de casa. Los llevo siempre en mis pensamientos. A mis hermanos Gsús, Lesly y Miguel por ser cómplices en mis aventuras, por siempre darme sus palabras de aliento y con quienes puedo saber que nunca estaré sola.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Alicia Palomares por haberme aceptado ser mi tutora, por su apoyo, confianza, paciencia y comprensión.

Al Dr. Tonatiuh Ramírez Reivich por haberme permitido ser parte del grupo, por sus consejos en el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Angélica Meneses Acosta y al Dr. Adán Guerrero Cárdenas, miembros de mi comité tutorial, por sus observaciones y consejos durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Takuya Nishigaki Shimizu, al Dr. Iván Martínez Duncker, al Dr. Alfredo Martínez Jiménez, al Dr. Christopher David Wood y a la Dra. Rosana Sánchez, miembros de mi jurado, por sus valiosas observaciones, críticas y sugerencias sobre este trabajo.

Al Dr. Arturo Pimentel, Técnico Académico del LNMA, por su apoyo y asesoría técnica.

A las Técnico Académico M.C. Vanessa Hernández, M.C. Ana Ruth Pastor y M.C. Martha Contreras por su apoyo y enseñanzas durante la realización de mis experimentos. De manera especial mi agradecimiento a Martita por estar constantemente pendiente de los avances de mis experimentos por si necesitaba algo, por ayudarme en la preparación de los medios de cultivo para las células CHO y su apoyo en el manejo de los equipos involucrados en los experimentos de hipoxia.

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

A Gloria Villa y Antonio Bolaños por su atención en la unidad de docencia, por ser tan pacientes y estar siempre dispuestos a ayudar.

A Adrián Vergara Huicochea por llevarnos a nuestras casas de manera segura y siempre de buen ánimo.

A mis compañeros y amigos del grupo Palomares-Ramírez, por su compañía, consejos y apoyo, particularmente a Juan Carlos Rivera, Enrique Paz, Violeta Guadarrama, Arturo Liñan, Michelle Gutiérrez, Alberto Porras, Daniel Barreto, Dubhe Bulte, Yahel López, Ana Alcalá, Jocelyn Uribe y Berenice Sandoval.

A Humberto quien ha sido un gran apoyo para mí, por sus consejos, por su comprensión, paciencia, las risas y por los momentos compartidos.

A mis amigos de generación Jaime, Rubén, Arihel, Mauro, Andrea, Miguel y Raquel, de quienes he aprendido y con quienes he compartido mucho.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de las Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de maestría no. 720621 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT. Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo del Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada. Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, a través del proyecto UNAM-PAPIIT IT-200315 y proyecto SEP-CONACyT 255445.

CONTENIDO

NOMENCLATURA	iii
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Potencial redox intracelular	4
2.2. Disponibilidad de oxígeno en los cultivos celulares	5
2.3. Efecto del oxígeno en los cultivos celulares	7
2.4. Mecanismo de adaptación celular en condiciones de hipoxia	8
2.5. Variación del potencial redox intracelular frente a condiciones de hipoxia	9
2.6. N-glicosilación	9
2.7. Importancia de la N-glicosilación en las proteínas recombinantes terapéuticas	11
2.9. Asociación entre el potencial redox y la N-glicosilación	12
2.10. Proteínas sensoras de redox basadas en la proteína verde fluorescente	12
2.11. Determinación del potencial redox intracelular de Golgi	15
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVOS	17
4.1. Objetivo general	17
4.2. Objetivos particulares	17
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
5.1. Evaluación del potencial redox de la proteína roGFP1-iL	18
5.1.1. Plásmido pQE30-roGFP1-iL	18
5.1.2. Expresión y purificación de la proteína roGFP1-iL	19
5.1.3. Evaluación de la respuesta de la proteína roGFP1-iL bajo diferentes condiciones redox	21
5.1.4. Determinación del potencial redox de la proteína roGFP1-iL	21
5.2. Estrategia para la obtención del baculovirus recombinante roGFP1-iL_{Golgi}	22
5.2.1. Construcción de la secuencia roGFP1-iL_{Golgi}	22
5.2.2. Clonación de la secuencia roGFP1-iL_{Golgi} en el vector pFBGR	25
5.2.3. Producción del bÁcmido recombinante roGFP1-iL_{Golgi}	26
5.2.4. Producción del baculovirus recombinante roGFP1-iL_{Golgi} en células de insecto Sf9	27
5.2.5. Ensayo en placa para el aislamiento del baculovirus roGFP1-iL_{Golgi}	27

5.2.6. Amplificación y titulación del baculovirus recombinante roGFP1-iL _{Golgi}	28
5.3. Expresión de la proteína roGFP1-iL _{Golgi} en células CHO-hSEAP	29
5.3.1. Transducción de células CHO-hSEAP con el baculovirus roGFP1-iL _{Golgi}	29
5.3.2. Verificación de la localización de la proteína roGFP1-iL _{Golgi} en Golgi	29
5.4. Medición del potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP bajo condiciones de normoxia e hipoxia	30
5.4.1. Calibración de sensores de oxígeno PreSens	30
5.4.2. Cultivos celulares bajo condiciones normales de oxígeno	31
5.4.3. Cultivos celulares bajo condiciones de hipoxia	31
5.4.4. Medición del potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
6.1. Expresión y purificación de la proteína roGFP1-iL	34
6.2. Evaluación <i>in vitro</i> de la respuesta de la proteína roGFP1-iL bajo diferentes condiciones redox	35
6.2.1. Mediciones realizadas en el equipo PerkinElmer	35
6.2.2. Mediciones realizadas en el equipo Synergy H1	40
6.2.3. Comparación entre las mediciones realizadas en el equipo PerkinElmer y Synergy H1	41
6.3. Obtención del baculovirus recombinante roGFP1-iL _{Golgi}	42
6.4. Expresión de la proteína roGFP1-iL _{Golgi} en células CHO-hSEAP	47
6.4.1. Localización de la proteína roGFP1-iL _{Golgi} en Golgi de células CHO-hSEAP	48
6.5. Calibración de los sensores de oxígeno PreSens	51
6.6. Medición del potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP cultivadas en condiciones normales de oxígeno e hipoxia	51
6.6.1. Transducción de las células CHO-hSEAP con el baculovirus roGFP1-iL _{Golgi}	51
6.6.2. Cultivos de células CHO-hSEAP en condiciones normales de oxígeno y condiciones de hipoxia	52
6.6.3. Cálculo del oxígeno presente en la fase líquida de los cultivos de células CHO-hSEAP en condiciones normales de oxígeno y de hipoxia	53
6.6.4. Tratamiento de células CHO-hSEAP con <i>N</i> -etilmaleimida	56
6.6.5. Potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP	57
7. CONCLUSIONES	62
8. PERSPECTIVAS	63
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

NOMENCLATURA

Símbolo	Descripción
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BSA	Albúmina sérica bovina (“ <i>bovine serum albumin</i> ”)
CHO	Células de ovario de hámster chino (“ <i>Chinese hamster ovary cells</i> ”)
CHO-hSEAP	Células CHO que producen la hSEAP (“ <i>Chinese hamster ovary cells producing human secreted embryonic alkaline phosphatase</i> ”)
C'_L	Concentración de oxígeno disuelto en la superficie de la fase líquida
C_L	Concentración de oxígeno disuelto en el medio
CMV	Citomegalovirus
CT	Carbono terminal
D	Constante de difusión de oxígeno
DICC50	Dosis infecciosa para el 50 % de la población en cultivo celular
DLCC50	Dosis letal para el 50 % de la población en cultivo celular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DS	Desviación estándar
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (“ <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ”)
EGFP	Proteína verde fluorescente potenciada (“ <i>enhanced green fluorescent protein</i> ”)
EROs	Especies reactivas de oxígeno
GalT-I	Galactosiltransferasa I
GFP	Proteína verde fluorescente (“ <i>green fluorescent protein</i> ”)
GlcNAc	N-acetilglucosamina
Grx	Glutarredoxina
GSH	Glutati3n reducido
GSSG	Glutati3n disulfuro

Símbolo	Descripción
hSEAP	Proteína fosfatasa alcalina humana secretada (<i>“human secreted embryonic alkaline phosphatase”</i>)
H	Constante de Henry
HIF-1	Factor 1 inducible por hipoxia (<i>“hypoxic inducible factor 1”</i>)
IgG1	Inmunoglobulina 1
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria Bertani
K_La	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno
Man	Manosa
MES	Ácido 2-etanosulfónico
MOI	Multiplicidad de infección (<i>“multiplicity of infection”</i>)
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolium bromuro
OD	Oxígeno disuelto
OxD	Grado de oxidación
PBS	Tampón fosfato salino (<i>“phosphate buffered saline”</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>“polymerase chain reaction”</i>)
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
pO ₂	Presión parcial de oxígeno
qO ₂	Velocidad específica de consumo de oxígeno celular
RE	Retículo endoplasmático
ROI	Región de interés, <i>“region of interest”</i>
roGFP	Proteína sensible a redox derivada de GFP (<i>“redox sensitive green fluorescent protein”</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (<i>“sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”</i>)
SFB	Suero fetal bovino
ST6Gal	α -2,6-sialiltransferasa
ST3Gal-IV	α -2,3-sialiltransferasa

Símbolo	Descripción
ufp	Unidades formadoras de placa
UPR	Respuesta a proteínas desplegadas, " <i>unfolded protein response</i> "
<i>VCO</i>	Velocidad de consumo de oxígeno
<i>VTO</i>	Velocidad de transferencia de oxígeno
% O ₂ AirSat	Concentración de oxígeno con respecto a la saturación con aire
X	Profundidad del medio

RESUMEN

Dentro de las células se llevan a cabo reacciones de oxidación y reducción entre los pares redox. La capacidad de los pares redox para perder electrones (oxidarse) o recibir electrones (reducirse) y su concentración al interior de la célula determinan el estado redox intracelular. Debido a la alta concentración del par redox glutatión (GSH)/glutatión disulfuro (GSSG) dentro de la célula, su potencial redox es un reflejo del estado redox intracelular. El uso de proteínas sensibles a redox derivadas de la proteína verde fluorescente (roGFPs, “*redox-sensitive green variants of the green fluorescent protein*”) permiten el estudio del potencial redox en los compartimentos celulares. Se han reportado potenciales redox reductores para la mitocondria, núcleo y citoplasma; y potenciales redox oxidantes para el retículo endoplasmático y Golgi, siendo el valor de este último no determinado hasta ahora.

El potencial redox intracelular puede ser alterado por condiciones de estrés como la falta de oxígeno. El oxígeno es un elemento importante para el crecimiento celular. Sin embargo, su disponibilidad en los cultivos celulares se ve afectada por su baja solubilidad en agua. Condiciones de hipoxia se han relacionado con variaciones en el potencial redox del citoplasma y organelos, como la mitocondria, y con cambios en el patrón de *N*-glicosilación de proteínas que no están relacionados con la activación de los factores inducibles por hipoxia (HIF, “*hypoxic inducible factor*”). La *N*-glicosilación es una modificación postraduccional que se lleva a cabo en el aparato de Golgi y que se encuentra en gran parte de las proteínas recombinantes de interés farmacéutico. Dicha modificación podría ser afectada por variaciones en el potencial redox del Golgi asociadas a una limitación de oxígeno.

El estudio del potencial redox de Golgi ha sido abordado previamente en nuestro laboratorio y en otros grupos de trabajo, pero su valor no pudo ser determinado por limitaciones en el rango de medición del sensor utilizado previamente (roGFP2), el cual se encontraba completamente oxidado en el estado basal de Golgi. Debido a la importancia de este compartimento en las modificaciones postraduccionales como la *N*-glicosilación y las condiciones de hipoxia en las que se pueden encontrar sometidos los cultivos celulares, en el presente trabajo se plantea el estudio del potencial redox de Golgi y su variación bajo condiciones de hipoxia usando como sensor a la proteína sensible a redox roGFP1-iL, cuyo rango de medición es más oxidante que el de la proteína roGFP2.

Para tal fin, la proteína roGFP1-iL fue expresada en *E. coli* y purificada mediante cromatografía de afinidad. Se evaluó la respuesta de la proteína purificada en diferentes condiciones redox y se obtuvieron los parámetros necesarios para determinar su potencial redox. Paralelamente, las secuencias que codifican para la proteína roGFP1-iL y el dominio transmembrana de la sialiltransferasa St3GalIV, que es una enzima localizada en la región trans de Golgi, se unieron mediante técnicas de biología molecular. La secuencia resultante roGFP1-iL_{Golgi} fue introducida a células CHO-hSEAP (células CHO que producen la proteína fosfatasa alcalina humana secretada) usando como vector el baculovirus AcMNPV (nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica*). La localización de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} en Golgi se confirmó mediante un ensayo de colocalización con el complejo BSA-BODIPY TR ceramide.

Una vez confirmada la localización de la proteína sensora en Golgi, se continuó con la evaluación del potencial redox de este compartimento en condiciones normales de oxígeno y condiciones de hipoxia. Para ello se transdujeron células CHO-hSEAP con el baculovirus recombinante que contiene la secuencia roGFP1-iL_{Golgi}. Luego de la transducción, todos los cultivos celulares se colocaron en una incubadora con 18.6 % de O₂, 5 % de CO₂ y humedad. Para los experimentos llevados a cabo en condiciones normales de oxígeno, los cultivos se dejaron en la misma incubadora hasta las 48 h postransducción. Para los experimentos llevados a cabo en condiciones de hipoxia, los cultivos fueron colocados desde las 24 h postransducción hasta las 48 h postransducción en cámaras de hipoxia preparadas con bolsas para empaqueo al vacío y una mezcla de gases (N₂, CO₂ y O₂) con 0.79 % de O₂. La concentración de oxígeno respecto a la saturación con aire (% O₂AirSat) presente en la fase gaseosa de los cultivos celulares se midió con el sensor de oxígeno SP-PSt3-YAU-D10-YOP de PreSens. Se obtuvo en promedio 89.1 % O₂AirSat para las condiciones normales de oxígeno y 3.66 O₂AirSat para las condiciones de hipoxia. A las 48 horas postransducción, el potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP cultivadas en condiciones normales de oxígeno con y sin tratamiento de butirato fue de -220 ± 2 mV (n = 3) y -213 ± 2 mV (n = 4), respectivamente. El valor $p < 0.01$ indicó que la diferencia fue significativa entre ambos grupos, mostrando que el butirato (reactivo usado para aumentar la producción de proteínas recombinantes en investigación y a nivel industrial) tiene un efecto en el potencial redox de Golgi. En el caso de las células cultivadas bajo condiciones de hipoxia durante 24 h se obtuvo un potencial redox de Golgi igual a -230 ± 3 mV (n = 3), significativamente menor al obtenido bajo condiciones normales de oxígeno ($p < 0.001$).

El uso de la proteína sensora roGFP1-iL, cuyo rango de potencial redox va desde -265 hasta -195 mV, permitió determinar el potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP, así como su disminución en condiciones de hipoxia y en tratamiento con butirato, volviéndose menos oxidante (más reductor). Se requieren estudios adicionales sobre los mecanismos de regulación del potencial redox de Golgi, para poder comprender los resultados obtenidos. Dada la implicancia que hemos encontrado de las condiciones de hipoxia sobre el potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP, se plantea como perspectiva el estudio del patrón de *N*-glicosilación de la proteína modelo hSEAP producida en las células CHO cultivadas en condiciones de hipoxia.

1. INTRODUCCIÓN

El oxígeno es un sustrato indispensable que regula el metabolismo de las células animales. A partir de esta molécula, se generan especies reactivas de oxígeno (EROs) cuyo adecuado balance es importante en los procesos de diferenciación y señalización celular, mientras que su exceso provoca estrés oxidante que repercute en el potencial redox intracelular (Meneses, 2001). La falta de oxígeno en el ambiente celular, también denominado hipoxia, conlleva a una generación incontrolada de EROs que además de provocar un daño oxidante en las moléculas orgánicas (ácido desoxirribonucleico, lípidos y proteínas), inducen cambios en el potencial redox de los compartimentos celulares como el citoplasma (Waypa et al., 2010). Se han reportado variaciones en el patrón de *N*-glicosilación bajo condiciones de hipoxia y en condiciones con bajo oxígeno, asociadas a Golgi (Hassinen et al., 2019; Kunkel et al., 1998). Además, condiciones reductoras pueden afectar la estructura de las proteínas al desestabilizar los puentes disulfuro, por lo que el potencial redox oxidante de Golgi estaría implicado en mantener estables dichas uniones covalentes (Hassinen et al., 2019; Zúñiga, 2017). La *N*-glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales más comunes de proteínas que se lleva a cabo en el retículo endoplasmático (RE) y Golgi. Si bien esta modificación es importante para el plegamiento y la conformación proteica, cumple también un papel clave en la determinación de las propiedades farmacológicas como estabilidad, solubilidad, actividad biológica, farmacocinética e inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas (Lipscomb et al., 2008). Dada la importancia de esta modificación, la producción de las proteínas terapéuticas recombinantes se lleva a cabo en las células CHO, cuya maquinaria de glicosilación es muy similar a la del humano (Li y D'Anjou, 2009).

El Golgi, además de ser el centro de procesamiento de la *N*-glicosilación, tiene un rol fundamental en el metabolismo celular al participar en la modificación, clasificación y empaquetamiento de las macromoléculas que serán secretadas o usadas dentro de la célula. Pese a la importancia de este compartimiento, poco se sabe sobre su potencial redox y de sus mecanismos de regulación o respuesta ante condiciones de estrés (Hassinen et al., 2019; Z. Jiang et al., 2011). El potencial redox de Golgi en células CHO fue evaluado previamente en nuestro grupo de laboratorio por Zúñiga (2017), usando para ello a la proteína roGFP2 como biosensor. Se identificó un estado basal redox oxidante de Golgi cuyo valor podría estar cercano a -240 mV, este valor no se logró determinar debido a limitaciones en el rango de medición del biosensor. Resultados similares al de Zúñiga (2017) se reportaron en los trabajos realizados por Hassinen et al. (2019) y Hatori et al. (2020). El uso de proteínas sensibles a redox con un rango de potencial redox más oxidante que el de la proteína roGFP2 permitirían medir el potencial redox de Golgi.

Teniendo como base todo lo anterior, el presente trabajo busca determinar el potencial redox de Golgi de células CHO y su respuesta frente a condiciones de hipoxia usando la proteína sensible a redox roGFP1-iL, cuyo rango de medición de potencial redox va desde -265 hasta -195 mV.

2. ANTECEDENTES

2.1. Potencial redox intracelular

El potencial redox es la capacidad de una especie química de transferir o aceptar electrones (oxidarse o reducirse, respectivamente), mientras que el potencial redox intracelular es el balance entre las especies reducidas y oxidadas de los pares redox, siendo el par GSH/GSSG el más importante debido a su elevada concentración dentro de la célula (Martinovich et al., 2005). El potencial redox intracelular se encuentra altamente regulado y compartimentalizado. Está asociado con el ciclo celular, diferenciación, apoptosis y vías de señalización; su desregulación se relaciona al inicio y proliferación de diversas enfermedades (J. Jiang et al., 2014). Como ya se mencionó, el estado redox intracelular es determinado por la contribución de diferentes pares redox, los cuales intercambian electrones (entregándolos o recibéndolos), actuando así como cofactores en reacciones enzimáticas redox y cambiando el valor del potencial redox hacia condiciones oxidantes o reductoras. Los tres sistemas redox más importantes dentro de la célula son: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH/NADP⁺), tiorredoxina (TRX_{red}/TRX_{ox}) y glutatión (GSH/GSSG). Este último se encuentra mayoritariamente en el estado reducido y es considerado el “*buffer redox*”, ya que su concentración (1-10 mM) es entre 500 y 1000 veces más que la de TRX y NADPH, por lo que cambios en las concentraciones del glutatión oxidado/reducido reflejan alteraciones en el ambiente redox intracelular (Filomeni et al., 2002; Mallikarjun et al., 2012).

El glutatión es un trímero conformado por glutamato, cisteína y glicina. Este se encuentra distribuido de manera distinta entre los diferentes compartimentos celulares como el citosol, la mitocondria, retículo endoplasmático y núcleo (Circu y Aw, 2010). Está presente bajo la forma reducida (GSH), forma oxidada (GSSG) y formando un enlace disulfuro con grupos tioles de proteínas (GS-R). Las dos últimas formas pueden ser reducidas hasta GSH mediante la acción de la glutatión reductasa dependiente de NADPH y el sistema TRX/glutarredoxina, respectivamente. En presencia de un estímulo oxidante, la relación GSH:GSSG comienza a disminuir y en respuesta a ello, la célula mantiene el estado redox del glutatión aumentando la actividad de la glutatión reductasa, eliminando el exceso de GSSG o sintetizando GSH (Filomeni et al., 2002).

Se conoce que las condiciones redox son reguladas independientemente en los diferentes compartimentos subcelulares. En el citoplasma, el núcleo y la mitocondria el potencial redox es reductor; mientras que en el retículo endoplasmático y Golgi es oxidante (Smith et al., 2017). El citoplasma y mitocondria de células HeLa tienen un potencial de -315 mV (Dooley et al., 2004) y -360 mV (Hanson et al., 2004), respectivamente; mientras que en el retículo endoplasmático de células HT1080 el potencial es de -231 mV (Lith et al., 2011). El potencial redox de Golgi no ha sido determinado hasta ahora para ningún tipo celular, aunque se esperaría que fuera más oxidante que el del RE (Hassinen et al., 2019; Hatori et al., 2020).

Resultados previos de nuestro grupo de laboratorio, en los que se usó la proteína sensora de redox roGFP2, indicaron que el potencial redox basal de Golgi estaría cercano a -240 mV. Dicho valor se encuentra en el límite del potencial redox oxidante de la proteína roGFP2 que cuenta con un rango de medición desde -320 hasta -240 mV. Por lo tanto, no se pudo determinar el potencial redox de este organelo (Zúñiga, 2017).

2.2. Disponibilidad de oxígeno en los cultivos celulares

El oxígeno es un de las moléculas más importantes en el crecimiento celular, su papel como aceptor final de electrones durante la fosforilación oxidativa permite la formación de adenosín trifosfato (ATP, “*adenosine triphosphate*”), molécula que almacena energía; sin embargo, también puede formar radicales libres que dañan a los componentes celulares (Lin y Miller, 1992). En un medio líquido en equilibrio con la atmósfera, el oxígeno disuelto (OD) es el 100 %, mientras que la concentración del oxígeno disuelto variará según la presión y temperatura, por ejemplo a 27° el 100 % de OD = 0.256 mmol/L. Es importante recalcar que el OD se reporta en porcentaje respecto a la saturación con aire.

La relación entre la presión parcial del oxígeno y su concentración en la fase líquida puede ser determinada mediante la ley de Henry:

$$P_g = H * C_d$$

En donde:

P_g = presión parcial del gas en la fase gaseosa (mmHg).

H = constante de Henry que en solución varía de acuerdo con la temperatura y la fuerza iónica (mmHg/mM).

C_d = concentración del gas disuelto en la fase líquida (mM).

El valor para H a 37 °C, considerando una fuerza iónica de 0.157 mM en el medio de cultivo, es de 771.65 mmHg/mM. Por lo tanto, bajo condiciones de cultivo (37 °C, 100 % de humedad y 5 % de CO₂) en donde la presión atmosférica es de 760 mmHg y la pO_2 es de 141 mmHg, la concentración de oxígeno en el medio será de 0.181 mM (Place et al., 2017). Cabe resaltar que altas densidades celulares o una excesiva cantidad de medio pueden afectar la disponibilidad de oxígeno en el cultivo, provocando un déficit de oxígeno o incluso condiciones de anoxia (Al-Ani et al., 2018).

Una aproximación más cercana acerca del oxígeno disponible para las células en cultivo puede hacerse usando la primera ley de Fick:

$$F = D * \Delta C / \Delta X$$

Esta ley nos indica que la tasa de difusión (F) del gas a través del medio es inversamente proporcional a la profundidad del medio (X) y directamente proporcional a la diferencia de concentraciones del gas (C) (figura 1). La constante de difusión de oxígeno (D) en una solución salina isotónica (concentración de sales similar a la presente en un cultivo celular) a 37 °C y a una presión de 1 atm es igual a 2.84×10^{-5} cm²/s (Place et al., 2017), si bien este valor varía con respecto a la presión atmosférica, dicha variación sería insignificante entre 0 y 2 atm (Xing et al., 2014).

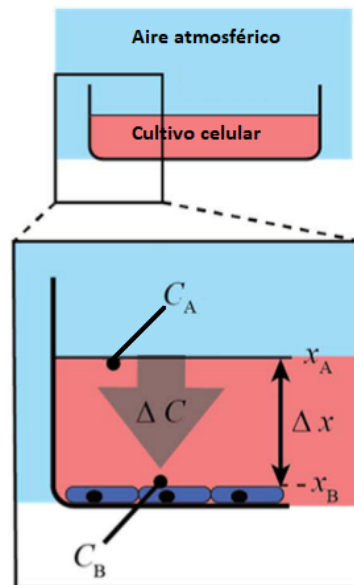


Figura 1: Representación de las variables implicadas en la primera ley de Fick en cultivos celulares. Gráfico modificado de Place et al., 2017.

En la figura 1 el C_A hace referencia a la concentración del oxígeno disuelto en la superficie del medio cuando se alcanza el equilibrio con el oxígeno gaseoso, el valor de C_A es determinado mediante la ley de Henry previamente descrita.

El balance de oxígeno en la fase líquida de cultivos celulares, principalmente llevados a cabo en biorreactores, es determinado por la siguiente ecuación:

$$dC_L/dt = VTO - VCO = K_L a (C'_L - C_L) - qO_2 \cdot X$$

En donde:

dC_L/dt = variación de la concentración de oxígeno disuelto a través del tiempo.

VTO = velocidad de transferencia de oxígeno.

VCO = velocidad de consumo de oxígeno.

$K_L a$ = coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h^{-1}).

C'_L = concentración de oxígeno disuelto en la superficie de la fase líquida y es determinado mediante la ley de Henry (mmol/L).

C_L = concentración de oxígeno disuelto en el medio y se mide empleando un sensor de oxígeno disuelto (mmol/L).

qO_2 = velocidad específica de consumo de oxígeno celular ($\text{mmol célula}^{-1}\text{h}^{-1}$).

X = concentración celular (células/mL).

2.3. Efecto del oxígeno en los cultivos celulares

Cultivos celulares con OD entre ≈ 10 y 100 % son considerados como cultivos en condiciones normales de oxígeno (normoxia), en donde el rango óptimo para la producción de anticuerpos recombinantes va desde 20 hasta 70 % de OD y el rango óptimo para el crecimiento celular va desde 10 hasta 50 % de OD, siendo este último rango similar al oxígeno fisiológico (15 - 45 % de OD) (Rao et al., 2003). En el caso de cultivos continuos de hibridoma murino, se ha visto una mayor concentración de células viables entre ≈ 30 % y 5 % de OD, aumentando la viabilidad conforme disminuye el OD, lo cual se debería a un menor daño oxidante de los componentes celulares; mientras que la producción específica de anticuerpos es máxima a 50 % de OD (Miller et al., 1987).

Las células tienen una velocidad específica de consumo de oxígeno (qO_2) que es constante cuando el oxígeno disuelto está sobre un valor de OD crítico (OD_{crit}). Debajo de este OD_{crit} el qO_2 depende de la cantidad de oxígeno disponible (figura 2) (Lin y Miller, 1992). Esta condición, en la que el OD es menor al OD_{crit} , es considerada como hipoxia (Al-Ani et al., 2018). De esta manera, el oxígeno se vuelve un sustrato limitante debajo del OD_{crit} . Muchos cultivos celulares, como el de hibridoma murino, tienen un OD_{crit} del 10 % (Miller et al., 1987); mientras que para células CHO se ha reportado un OD_{crit} de ≈ 5 % (Lin y Miller, 1992). En condiciones de hipoxia se lleva a cabo la activación del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1, “*hypoxic inducible factor 1*”) que tiene como blanco genes implicados en el metabolismo anaeróbico, lo que conlleva a un aumento en la producción de lactato (Rao et al., 2003).

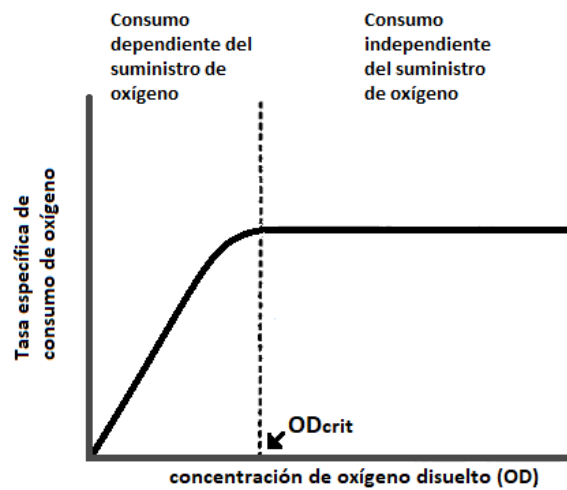


Figura 2: Consumo de oxígeno en relación al oxígeno disuelto. Gráfico modificado de Lin y Miller (1992).

2.4. Mecanismo de adaptación celular en condiciones de hipoxia

Ante la falta de oxígeno, dentro del ambiente intracelular se llevan a cabo mecanismos de adaptación que impactan en la síntesis de proteínas, el metabolismo energético, la respiración mitocondrial, metabolismo de carbonos y lípidos, así como en el consumo nutrientes. El mecanismo de adaptación en respuesta a hipoxia mejor estudiado es el que involucra a los factores inducibles por hipoxia (HIF), pero también hay respuestas que involucran cambios en el epigenoma, ARNs no codificantes, metaboloma, vías de señalización, reacciones bioquímicas, entre otros (Lee et al., 2020).

Dentro del grupo de HIF, el HIF-1 es el más conocido debido a que se encarga de regular la expresión de muchos genes implicados en la respuesta adaptativa. Esta proteína heterodimérica está compuesta de una subunidad HIF-1 β que es expresada constitutivamente y una subunidad HIF-1 α que es regulada por el O₂. Bajo condiciones normales de oxígeno, HIF-1 α es sintetizada, hidroxilada, ubiquitinizada y finalmente degradada por el proteosoma. Sin embargo, bajo condiciones de hipoxia, no se puede llevar a cabo la hidroxilación debido a la disminución del O₂ que es usado como sustrato, y/o por la producción de EROs que inhiben la acción de las hidroxilasas. Como consecuencia, aumenta la estabilidad de la HIF-1 α y su dimerización con HIF-1 β , de esta manera HIF-1 se une a su secuencia de reconocimiento en sus sitios objetivo (Duranteau et al., 1998; Semenza, 2009). HIF-1 α dirige el aumento del consumo de glucosa y del flujo glicolítico mediante la activación de genes que codifican para los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT2, la hexoquinasa 1 y 2, la fosfoglicerato quinasa 1, la lactato deshidrogenasa A y la piruvato deshidrogenasa quinasa 1. Esta última inactiva a la piruvato deshidrogenasa encargada de convertir el piruvato en acetil-CoA, provocando una disminución en la respiración celular (Roy et al., 2020). El aumento de los niveles de expresión de los transportadores de

glutamina, mediado por HIF-1 α , permite que las células continúen produciendo intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico como el citrato que podrá ser usado para la síntesis de lípidos (Lee et al., 2020).

2.5. Variación del potencial redox intracelular frente a condiciones de hipoxia

Se han observado variaciones del potencial redox en el citoplasma y mitocondria de células de músculo liso sistémico y de pulmón cultivadas en hipoxia (1.5 % O₂). Estos cambios se evaluaron usando la proteína sensible a redox derivada de GFP (roGFP, “*redox sensitive green fluorescent protein*”), encontrándose una disminución del potencial redox en la matriz mitocondrial y un aumento en el potencial redox tanto del citoplasma como del espacio intermembrana de la mitocondria. La disminución podría estar siendo causada por la acción de las reductasas de la matriz sobre las proteínas ditiolos, mientras que el aumento se debería básicamente por la formación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Waypa et al., 2010). Este último es una ERO, formada a partir del O₂, que puede penetrar rápidamente la membrana lipídica y además inactivar directamente a algunas enzimas, generalmente por la oxidación de sus grupos tioles esenciales (-SH) (Circu y Aw, 2010; Smith et al., 2017). La glutatión peroxidasa controla los niveles de H₂O₂ al catalizar la oxidación de GSH a GSSG a expensas del peróxido de hidrógeno; influyendo de esta manera en el potencial redox intracelular (Meneses, 2001).

2.6. N-glicosilación

La N-glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales más comunes en las proteínas. Tiene funciones principales en los mecanismos de señalización, respuesta inmune, plegamiento de proteínas, entre otros. Esta modificación, que inicia en el RE y finaliza en Golgi, cuenta con la participación de diversas enzimas glicosiltransferasas que están bajo la forma de homómeros y heterodímeros, dichas enzimas se encuentran localizadas específicamente en los diferentes compartimentos del organelo y tienen acción muy específica (Hassinen et al., 2011). El procesamiento del glicano en el RE es el mismo en levaduras, plantas, células de insecto y células de mamífero, dando lugar a una estructura común que al entrar a Golgi es modificada de manera distinta, dependiendo de la actividad y presencia de las glicosidasas y glicosiltransferasas en cada organismo (Goochee et al., 1991).

La formación del N-glicano comienza en el RE con la transferencia del oligosacárido Glc₃Man₉GlcNAc₂ al sitio consenso (Asn-x-Ser/Thr) de la proteína naciente y su posterior procesamiento por una serie de manosidasas y glucosidasas hasta obtener la estructura Man₈GlcNAc₂. La glicoproteína es transportada a Golgi para la modificación de los glicanos mediante la acción de las enzimas N-acetilglucosaminiltransferasas (GlcNAcT) que se encargan de catalizar la transferencia de un residuo de GlcNAc a la manosa del N-glicano. En la cara *cis* de Golgi se eliminan 3 manosas del N-glicano, formándose así la Man₅GlcNAc₂; ya en la cara media de Golgi, la N-acetilglucosaminatransferasa I agrega

un residuo de GlcNAc, dando lugar a la primera ramificación del *N*-glicano. Seguidamente, se remueven dos residuos de manosa y la *N*-acetilglucosaminatransferasa II adiciona un residuo de GlcNAc generando un *N*-glicano biantenario, adicionalmente pueden ser agregados residuos de fucosa. Los *N*-glicanos con tres o cuatro antenas pueden formarse al actuar la *N*-acetilglucosaminatransferasa IV y la *N*-acetilglucosaminatransferasa V sobre los carbonos 4 y 6 de la manosa, respectivamente. Finalmente, la adición de residuos monosacáridos, tales como GlcNAc, galactosa y ácido siálico, se lleva a cabo en la cara *trans* de Golgi a través de una serie de glicosiltransferasas (figura 3) (Vervecken et al., 2007). Muchas de las glicosiltransferasas son proteínas de membrana de tipo II que cuentan con un dominio transmembranal (con una pequeña cola citoplasmática), una región tallo y un dominio catalítico. Se ha identificado que las *N*-glicosiltransferasas forman complejos homo y heteroméricos (GalT-I/ST6Gal-I y GalT-I/ST3Gal-III) a través de la interacción entre sus dominios catalíticos o transmembranales (Hassinen et al., 2011).

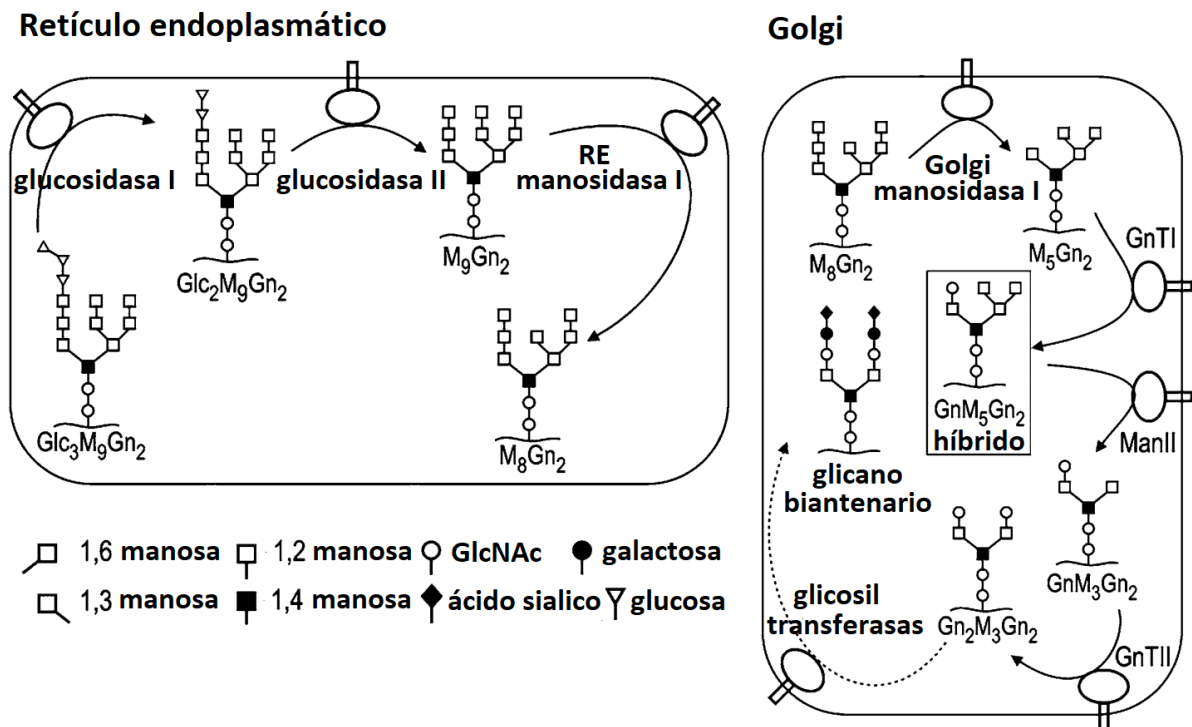


Figura 3: Esquema de la vía de *N*-glicosilación. Glucosa (Glc), manosa (M), *N*-acetilglucosamina (Gn), manosidasa II (ManII), *N*-acetilglucosaminatransferasa I (GnTI). Modificado de Vervecken et al. (2007).

2.7. Importancia de la *N*-glicosilación en las proteínas recombinantes terapéuticas

Las proteínas recombinantes, además de ser usadas como herramientas para la investigación básica, también son usadas como medicamentos para el tratamiento de diversas enfermedades. Proteínas como las interleucinas, hormonas, factores de crecimiento, factores de coagulación, enzimas para el tratamiento contra el cáncer y la diabetes, entre otros, han revolucionado el tratamiento de enfermedades (Pham, 2018). Cerca del 60-70% de ellas son producidas en las células de mamíferos (Wurm, 2004), y más de las dos terceras partes son proteínas glicosiladas, también llamadas glicoproteínas (Li y D'Anjou, 2009).

La *N*-glicosilación sirve como un mecanismo de control de calidad en el RE para prevenir el mal plegamiento de las proteínas. Su inhibición o supresión resulta en la agregación y/o mal plegamiento proteico. Se ha demostrado que remover el *N*-glicano de una proteína ya plegada no afecta su actividad, pero si se ven afectadas su estabilidad y cinética de plegamiento (Mitra et al., 2006).

La *N*-glicosilación se encuentra en muchas de las proteínas recombinantes terapéuticas contribuyendo a su actividad, estabilidad, farmacocinética e inmunogenicidad (Zhou y Qiu, 2019). El interferón β humano producido en células de ovario de hámster chino, cuenta con un *N*-glicano biantenarico completamente sialilado y fucosilado; su desglicosilación provoca la formación de agregados insolubles de la proteína y aumenta su sensibilidad a la desnaturalización térmica; asimismo, un gran porcentaje de la proteína agregada se observa en su contraparte sin glicosilar producida en *E. coli*, que además presenta una actividad específica diez veces menor (Runkel et al., 1998). La eliminación de los residuos de galactosa presentes en los *N*-glicanos de la eritropoyetina producida en células CHO provoca una disminución de la estabilidad conformacional de la proteína, bajo condiciones desnaturalizantes (Toyoda et al., 2002).

La farmacocinética, mencionada previamente, hace referencia al tiempo de vida media de la proteína recombinante en el suero, así como el volumen del plasma que queda libre del fármaco por unidad de tiempo (aclaramiento) (Lipscomb et al., 2008). Los *N*-glicanos asialilados, con galactosa o *N*-acetilglucosamina terminales, son reconocidos por los receptores de asialoglicoproteínas presentes en hepatocitos, mientras que las manosas terminales son reconocidas por receptores específicos presentes en las células endoteliales y macrófagos en hígado, estos últimos presentes también en intestino. Las glicoproteínas, con las estructuras mencionadas, son endocitadas y eliminadas vía lisosoma provocando el rápido aclaramiento de la proteína terapéutica, disminuyendo su tiempo de vida media en sangre y con ello su actividad específica (Goochee et al., 1991).

2.8. Variación del patrón de *N*-glicosilación en condiciones de hipoxia

En cultivos celulares de hibridomas de linfocitos B sometidos a un 10 % de OD se ha observado una disminución en la galactosilación de la IgG1 secretada. Esto podría deberse a una disminución de la disponibilidad del azúcar nucleotídico UDP-Gal o de su transporte desde el citoplasma hasta Golgi, o

también por alteraciones en la vía de formación de puentes disulfuro entre las cadenas pesadas del anticuerpo que estaría impidiendo la agregación del residuo de galactosa por la galactosiltransferasa. La disminución de la galactosa en la estructura del glicano estaría causando la disminución de las estructuras sialiladas, ya que el ácido siálico es transferido a la galactosa del glicano por la acción de la sialiltransferasa (Kunkel et al., 1998).

Se ha observado también una disminución en el grado de fucosilación de la eritropoyetina producida en cultivos de células CHO bajo condiciones de 3 y 10 % de OD, probablemente debido a una disminución de la actividad de la fucosiltransferasa, un incremento en el flujo de glicoproteínas a través de Golgi, una alteración de los azúcares nucleotídicos activados o la alteración del sustrato de la fucosiltransferasa (Restelli y Butler, 2006).

2.9. Asociación entre el potencial redox y la N-glicosilación

Hassinen et al. (2019) observaron la disminución del potencial redox de Golgi, así como la disminución de glicanos sialilados, en células COS7 cultivadas en 24 % de OD durante 24 h. En estas condiciones también se observó una disminución de la formación del heterodímero entre la galactosiltransferasa I (GalT-I) y la α -2,6-sialiltransferasa (ST6Gal-I). La disminución del potencial redox y de la formación del heterodímero también se observaron cuando las células fueron cultivadas en presencia de ditioneitol (DTT) 10 mM. Cambiar las cisteínas presentes en el sitio catalítico de la ST6Gal-I por alaninas (C353A, C406A) también provocó una disminución de la formación del heterodímero. Se concluye de este trabajo que el potencial redox al ser más reductor (menos oxidante) estaría afectando la formación de puentes disulfuro en el sitio catalítico de la ST6Gal-I, disminuyendo considerablemente la formación del heterodímero GalT-I/ST6Gal-I y su actividad enzimática (Hassinen et al., 2019). Resultados parecidos fueron obtenidos en el trabajo realizado, previamente en el laboratorio, por Zúñiga (2017), en donde se describe que bajo condiciones reductoras *in vitro* simuladas con DTT 10 mM, hay una disminución de la sialilación, aunque no se define si esto podría ser debido a una afección de la actividad de la sialiltransferasa o por variaciones en la estructura terciaria del sustrato aceptor.

2.10. Proteínas sensoras de redox basadas en la proteína verde fluorescente

Las roGFPs son proteínas sensoras de redox, derivadas de la proteína verde fluorescente (GFP, “*green fluorescent protein*”), que permiten cuantificar de manera no invasiva el equilibrio GSH/GSSG y de esta forma el potencial redox. El estado redox de la roGFP se obtiene midiendo los cambios rápidos y reversibles de la relación de las intensidades de fluorescencia a dos longitudes de ondas de excitación, siendo dicha medición independiente de la concentración del sensor (Hanson et al., 2004). El cromóforo de la GFP silvestre está conformado por la ciclación intramolecular de tres aminoácidos S65/Y66/G67, esta proteína presenta dos picos de excitación que reflejan el estado de protonación del

grupo fenol de la Y66 dentro del cromóforo, siendo el máximo a 395 nm correspondiente a la forma protonada neutral (estado oxidado) y a 465 nm correspondiente a la forma aniónica no protonada (estado reducido). En ambos casos el pico de emisión máximo es de 509 nm, que es causado por el proceso denominado transferencia de protón del estado excitado. La desprotonación del cromóforo se favorece cuando S65 es reemplazado por la treonina, es así como mediante la mutación S65T se obtiene la GFP potenciada (EGFP, “*enhanced green fluorescent protein*”) con un pico máximo de excitación de 488 nm. Las mutaciones S147C y Q204C en la GFP y EGFP dan lugar a las proteínas roGFP1 y roGFP2 respectivamente, con picos máximos de excitación a 405 y 488 nm para roGFP2 (figura 4), mientras que para la roGFP1 se mantienen los picos máximos de excitación de la GFP. El potencial redox medio de la roGFP1 y roGFP2 es de -291 mV y -280 mV respectivamente, esto causa limitaciones en la medición del potencial redox en ambientes muy oxidantes (Meyer y Dick, 2010). Como una solución a esta limitante, encontramos a la proteína sensora roGFP1-iL que cuenta con la inserción de una leucina adyacente al residuo C147, esto le permite tener un potencial redox medio de -229 mV con un rango de potencial redox desde -265 hasta -195 mV, y dos longitudes máximas de excitación a 395 y 465 nm (figura 5) (Lohman y Remington, 2008).

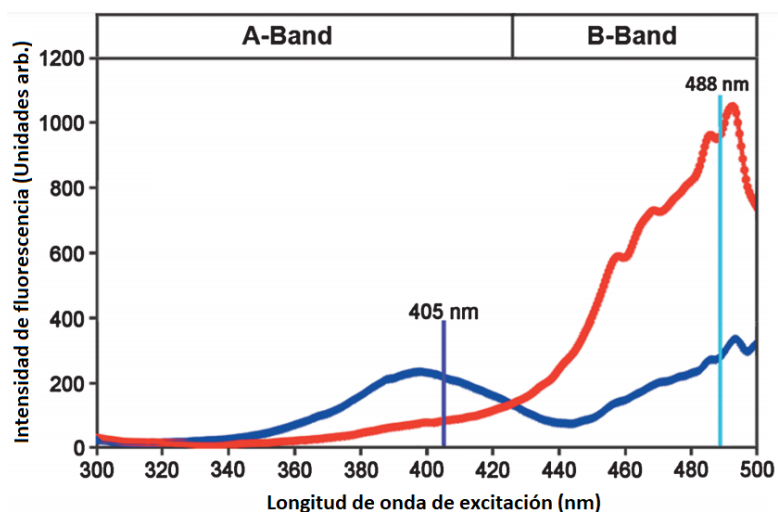


Figura 4: Espectro de excitación de la proteína roGFP2 dependiente del estado redox. La curva roja representa el estado completamente reducido de la proteína, mientras la curva azul, el estado completamente oxidado (Meyer y Dick, 2010).

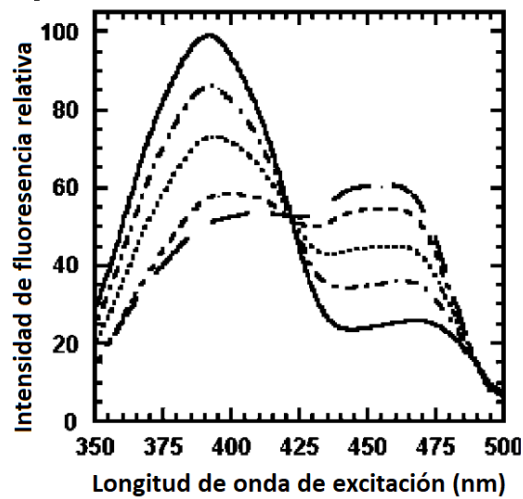


Figura 5: Espectro de excitación de la proteína roGFP1-iL dependiente del estado redox. La línea discontinua larga representa el estado completamente reducido de la proteína, mientras que la línea sólida, el estado completamente oxidado (Lohman y Remington, 2008).

Las proteínas roGFPs se encuentran predominantemente equilibradas con el par redox GSH/GSSG, por lo que su potencial redox puede ser predicho por la ecuación de Nernst ($E_{\text{GSH}} = E_{\text{roGFP}}$) que describe el intercambio de electrones entre el glutatión y la roGFP (figura 6) (Meyer y Dick, 2010).

a)

$$OxD_{roGFP} = \frac{R - R_{red}}{\left(\frac{I_{480ox}}{I_{480red}}\right) (R_{ox} - R) + (R - R_{red})}$$

b)

	Reducción completa	Oxidación completa	Medida de la muestra
Intensidad a 390 nm	I390red	I390ox	I390
Intensidad a 480 nm	I480red	I480ox	I480
Relación correspondiente	$R_{red}=I_{390red}/I_{480red}$	$R_{ox}=I_{390ox}/I_{480ox}$	$R=I_{390}/I_{480}$

c)

$$E_{roGFP} = E'_{roGFP} - \frac{RT}{2F} \ln \frac{1 - OxD_{roGFP}}{OxD_{roGFP}}$$

Figura 6: Ecuaciones y variables usadas para calcular el potencial redox de la proteína sensora roGFP. a) Ecuación para calcular el grado de oxidación de la proteína roGFP. b) Cálculo de las variables R_{red} , R_{ox} y R usadas en la ecuación para estimar en grado de oxidación de la proteína roGFP. C) Ecuación de Nernst usada para calcular el potencial redox de la proteína roGFP. $R = 8.315 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$, $T = \text{temperatura absoluta (K)}$, $F = 96485 \text{ Cmol}^{-1}$. Modificado de Meyer y Dick (2010).

En el inciso a de la figura 6 se indica la ecuación para calcular el grado de oxidación de la proteína roGFP, en dicha ecuación el término R indica la razón de las intensidades de fluorescencia en los picos máximos de excitación de la proteína (390 y 480 nm). El término R_{ox} y R_{red} hacen referencia a la razón de las intensidades de fluorescencia en los picos máximos de excitación de la proteína completamente oxidada y reducida, respectivamente. Los términos $I_{480_{ox}}$ e $I_{480_{red}}$ corresponden a las intensidades de fluorescencia a 480 nm de excitación para la proteína completamente oxidada y reducida, respectivamente. Cabe recalcar que los picos máximos de excitación varían entre las distintas variantes de la roGFP, tal como se muestra en las figuras 4 y 5.

2.11. Determinación del potencial redox intracelular de Golgi

En el trabajo realizado por Zúñiga (2017) se establece un potencial redox basal oxidante para Golgi muy cercano a -240 mV (figura 7). En ese estudio se usó como sensor a la proteína roGFP2, cuyas características fueron previamente mencionadas, y cuyo rango de medición va desde -320 hasta -240 mV (Meyer y Dick, 2010). De la misma forma, usando la proteína roGFP2, los estudios realizados por Hassinen et al. (2019) y Hatori et al. (2020) reportan de manera cualitativa un potencial redox de Golgi menos reductor que el del retículo endoplasmático (-231 mV). En ninguno de estos estudios se pudo determinar el valor del potencial redox de Golgi, ya que la proteína sensora roGFP2 se encontraba completamente oxidada en dicho compartimento y por tanto fuera del límite de su rango de medición. Para conocer el potencial redox de Golgi es necesario el uso de un sensor con un rango de potencial más oxidante. Una alternativa es la proteína roGFP1-iL, que tiene un rango de medición de potencial redox desde -265 hasta -195 mV (Lohman y Remington, 2008), rango que es más oxidante al de otras proteínas sensoras (figura 8).

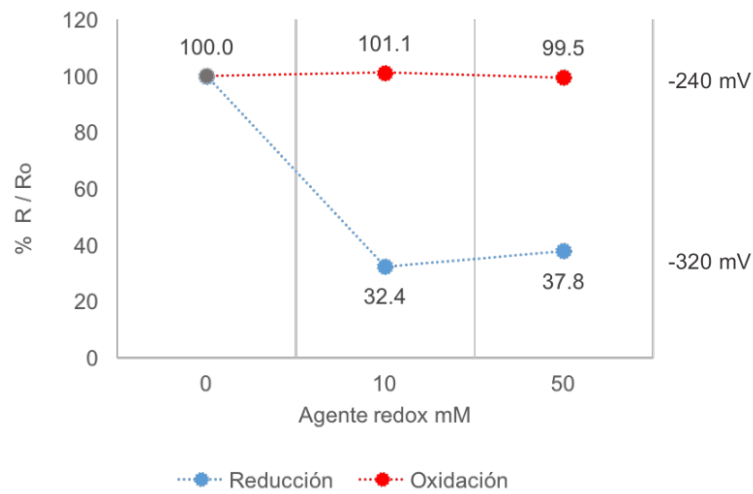


Figura 7: Gráfica que muestra el potencial redox basal de Golgi cercano a -240 mV, cuya variación está sujeta a la adición de DTT (agente reductor), mientras que se mantiene casi invariable ante la adición del agente oxidante H₂O₂. R y R₀ corresponden a la razón de las intensidades de fluorescencia en los picos máximos de excitación de la proteína roGFP2 sin agente redox (basal) y con agente redox, respectivamente (Zúñiga, 2017).

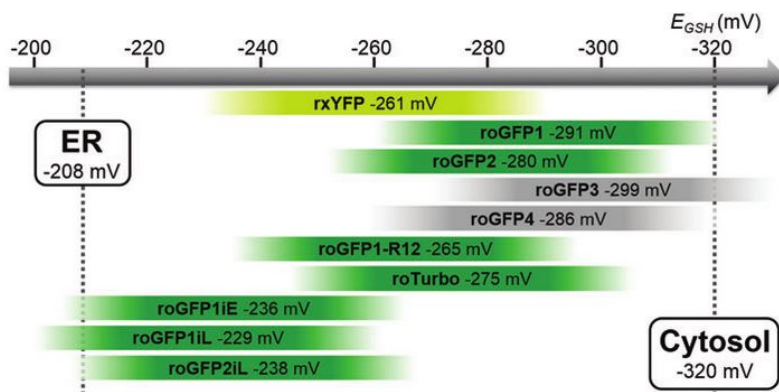


Figura 8: Rango de medición de potencial redox de las diferentes proteínas sensoras derivadas de GFP (Schwarzländer et al., 2015).

Con base en lo ya mencionado y dada la importancia de la N-glicosilación en las propiedades de las proteínas recombinantes terapéuticas, resulta importante conocer más acerca del ambiente redox de Golgi y su respuesta frente a condiciones de hipoxia que pueden estar presente en los cultivos celulares debido a la baja solubilidad del oxígeno. Por ello, se presenta en este trabajo el estudio del potencial redox de Golgi de células CHO y su respuesta frente a condiciones de hipoxia, usando para ello la proteína sensora de redox roGFP1-iL.

3. HIPÓTESIS

La proteína sensora de redox roGFP1-iL permitirá la medición del potencial redox de Golgi y su respuesta frente a condiciones de hipoxia.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar el potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP y su variación bajo condiciones de hipoxia.

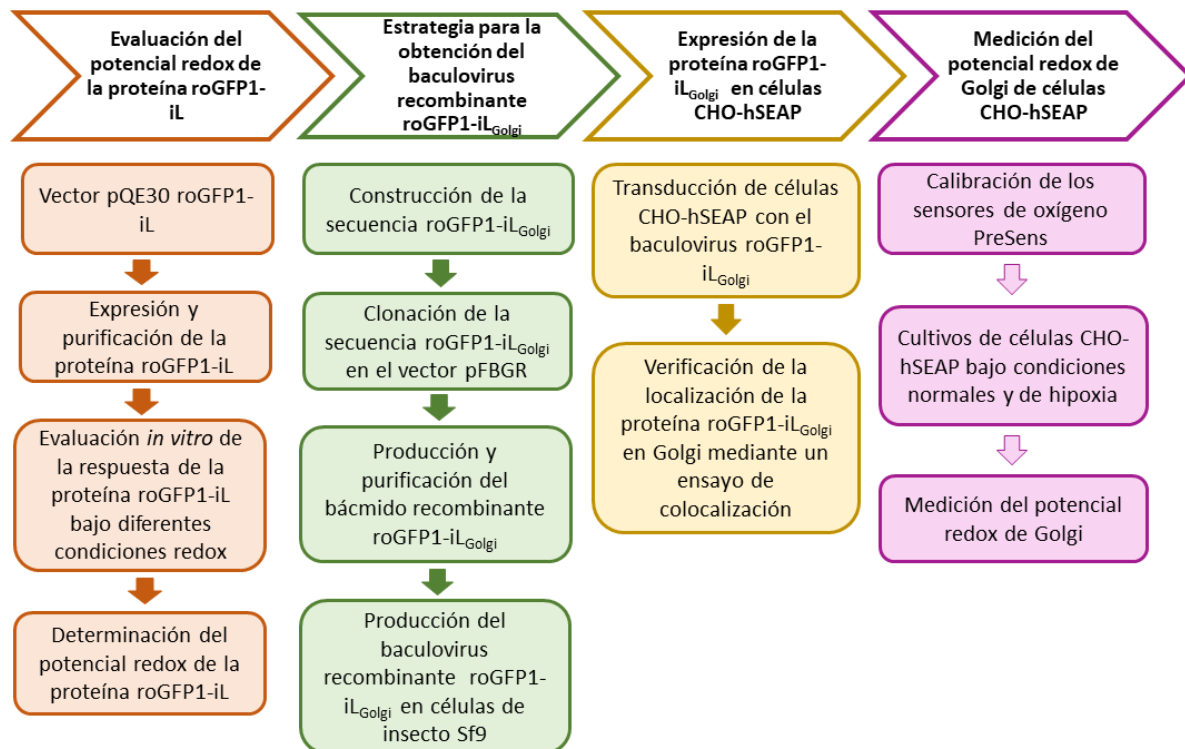
4.2. Objetivos particulares

Evaluar la respuesta del potencial redox de la proteína roGFP1-iL purificada bajo diferentes condiciones redox.

Construir el biosensor roGFP1-iL unido a un péptido señal que permita dirigir la proteína sensora al compartimento de Golgi de células CHO-hSEAP.

Medir la respuesta del potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP en condiciones normales y condiciones de hipoxia.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



5.1. Evaluación del potencial redox de la proteína roGFP1-iL

5.1.1. Plásmido pQE30-roGFP1-iL

El vector pQE30-roGFP1-iL contiene la secuencia que codifica para la proteína sensora roGFP1-iL. Este vector, proporcionado por S. James Remington (Addgene plasmid # 83313; <http://n2t.net/addgene:83313>; RRID:Addgene_83313), cuenta con un tamaño de 4180 pb y un gen de resistencia a ampicilina. La transcripción de la secuencia roGFP1-iL se encuentra bajo el promotor T5 y su expresión se lleva a cabo unida a una etiqueta de seis histidinas (6xHis) en su extremo *N*-terminal, lo cual permite su purificación por cromatografía de afinidad.

Se transformaron bacterias *E. coli* DH5- α con el plásmido pQE30-roGFP1-iL y se seleccionaron las colonias positivas sembrando las bacterias en placas con medio Luria Bertani (LB) con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se amplificó el plásmido en cultivos de 5 mL de LB con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se purificó usando el kit Zyppy plasmid Miniprep (Zymo Research), según las indicaciones del proveedor. La elución del plásmido se realizó en agua y su cuantificación en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000

(Thermo Scientific). La identidad del plásmido se verificó mediante digestiones dobles usando las enzimas BamHI y HindIII de NEB. El análisis de la digestión se hizo mediante electroforesis en gel agarosa al 1 %, usando como marcador de peso molecular el DNA ladder 1 kb (NEB).

Para la amplificación del gen *roGFP1-iL*, se mandaron a sintetizar, en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del IBt, los oligos mostrados en el cuadro 2. Para el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, “*polymerase chain reaction*”) se usó la enzima Phusion High-Fidelity DNA polymerase (NEB) y 10 ng del plásmido. Las condiciones usadas fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 30 s a 98 °C, seguida por 30 ciclos conformados por una desnaturalización a 98 °C por 10 s, una hibridación a 61 °C durante 30 s y una extensión a 72 °C por 30 s, finalmente una extensión a 72 °C durante 5 min.

Cuadro 2: Oligos usados en la amplificación de la secuencia *roGFP1-iL*.

Nombre	Secuencia (5'→ 3')	Descripción
CTD-Golgi-roGFP1	TCC ATC TCC GGC AGC AGC CCC AGA ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT G	Fragmento CT del dominio transmembranal de la sialiltransferasa con unión al extremo NT de la <i>roGFP1-iL</i>
<i>roGFP1-XhoI</i>	AACTGA CTCGAG AT TTA TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC	Fragmento CT de la <i>roGFP1-iL</i> con la adición del sitio de restricción <i>XhoI</i> para clonar la secuencia en el vector pFBGR

Se mandó a secuenciar el gen *roGFP1-iL* a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del IBt, usando los oligos *roGFP1-XhoI* y CTD-Golgi-*roGFP1*.

5.1.2. Expresión y purificación de la proteína *roGFP1-iL*

Se transformaron bacterias *E. coli* SHuffle con el vector pQE30-*roGFP1-iL*, se sembraron las bacterias en placas con medio LB con ampicilina 100 µg/mL, y se dejó incubando a 37 °C toda la noche. A partir de las colonias resistentes se prepararon cultivos líquidos de 100 mL de LB con ampicilina 100 µg/mL y con una densidad óptica (DO) inicial de 0.05. Estos cultivos se incubaron a 30 °C en agitación (300 rpm) y cuando alcanzaron una DO de 1.5 se agregó isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM. El cultivo se dejó incubando en agitación (300 rpm) a 30 °C durante 18 h.

La biomasa se colectó mediante centrifugación y se lisó con solución de lisis conformada por tampón fosfato salino (PBS, “*phosphate buffered saline*”) 1X y lisozima 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La biomasa obtenida de un cultivo de 100 mL se lisó durante 30 min a temperatura ambiente en 5 mL de solución de lisis, se le agregó MgCl_2 1 mM y 0.5 μL de benzonasa, y se dejó incubar durante 10 min más. El lisado total fue sonicado usando el equipo Qsonica Q700 y posteriormente alicuotado en tubos de 1.5 mL que se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes fueron recolectados en un tubo que se colocó en hielo para continuar con el paso de purificación.

La proteína roGFP1-iL se purificó mediante cromatografía de afinidad usando la resina de agarosa Ni-NAT His-Bind Superflow Resin (Merck Millipore). Al sobrenadante obtenido en el paso anterior se le agregó NaCl 300 mM e imidazol 30 mM. En una columna se colocaron 2 mL de la resina de agarosa, esta se lavó con 20 mL de agua y se equilibró con 10 mL de solución de lavado (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 30 mM). Se pasó por la resina todo el sobrenadante y luego se lavó con 10 mL de la solución de lavado. La elución se realizó con 2 mL de la solución de elución (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM), se colectaron tres fracciones de volúmenes 750, 600 y 650 μL . Se cuantificó la cantidad de proteína obtenida en cada etapa de la purificación (sonicación, no unido, lavado y elución) usando el NanoDrop ND-1000. La segunda fracción (600 μL) de elución, en donde hubo la mayor cantidad de proteína, fue dializada durante toda la noche entre 4-8 °C y en agitación. Para este procedimiento se usó un tubo de membrana de diálisis Spectra/Por (12-14 kDa) y 1 L de solución MES pH 6.5 compuesta por ácido 2-etanosulfónico (MES) 20 mM, NaCl 125 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, “*ethylenediaminetetraacetic acid*”) 1 mM.

El análisis del proceso de purificación se realizó mediante electroforesis en gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE, “*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*”) al 12 %, se cargó en el gel 5 μg de proteína por muestra (etapa de purificación) y se usó como marcador de peso molecular el BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder. Para calcular el volumen de muestra con 5 μg de proteína, se usaron las cuantificaciones obtenidas en el NanoDrop ND-100. Después de correr las muestras en el gel, este fue teñido con azul de Coomassie y luego fotodocumentado en el equipo ChemiDoc de Bio-Rad. El peso molecular de la proteína roGFP1-iL 6xHis es de 28.2 kDa, esto de acuerdo con la información obtenida en la plataforma ProtParam ExPASy con base en su secuencia de aminoácidos. A partir de la imagen obtenida se determinó el porcentaje de pureza de la proteína roGFP1-iL usando el programa Image Lab 6.0.1 BIORAD, aplicando sobre el carril de interés el método de punto flotante (disk size = 1 mm) para sustraer el ruido de fondo. Asimismo, se cuantificó la proteína total presente en la segunda fracción de elución dializada, mediante el método de Bradford usando como patrón estándar una curva de calibración realizada con albúmina sérica bovina (BSA, “*bovine serum albumin*”), y usando el porcentaje de pureza de la proteína roGFP1-iL se determinó la concentración de la proteína roGFP1-iL.

5.1.3. Evaluación de la respuesta de la proteína roGFP1-iL bajo diferentes condiciones redox

Como se observa en su espectro de excitación (figura 5), la proteína sensora roGFP1-iL tiene dos longitudes de onda de máxima excitación a 395 y 465 nm (Lohman y Remington, 2008) en su estado oxidado y reducido, respectivamente. La evaluación del espectro de excitación de esta proteína, bajo diferentes condiciones redox, se realizó inicialmente en el espectrofluorímetro PerkinElmer Ls55 a una temperatura controlada de 37 °C obtenida con el recirculador de agua LAUDA A6. Se prepararon diferentes concentraciones de DTT (500, 250, 100, 75, 50, 25, 10, 5, 4, 3, 2, 1.75 y 1 mM) en solución MES pH 6.5. Se colocó 200 μ L de la solución DTT 500 mM en la cubeta de cuarzo de 10 mm PerkinElmer, se obtuvo el espectro de excitación haciendo un barrido de excitación desde 300 hasta 500 nm, con intervalos de 0.5 nm, y fijando la emisión a 505 nm. Se agregó 1.62 μ M de la proteína roGFP1-iL purificada y se volvió a obtener el espectro de excitación. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada una de las concentraciones de DTT mencionadas y para la solución MES pH 6.5 sin el agente reductor.

Dado que posteriormente la proteína roGFP1-iL_{Golgi} expresada en células CHO-hSEAP no podía ser detectada por el equipo PerkinElmer, pero si en el lector de microplacas Synergy H1; se usó este equipo para medir nuevamente los espectros de excitación de la proteína roGFP1-iL bajo distintas condiciones redox. Se usaron diferentes concentraciones de DTT (500, 100, 50, 25, 10 y 5 mM) y ácido lipoico (2 y 5 mM) preparados en la solución MES pH 6.5. Se colocaron 100 μ L de la solución con DTT 500 mM por triplicado, en una placa negra de 96 pozos de poliestireno Corning. Se obtuvo el espectro de excitación haciendo un barrido de excitación desde 350 hasta 500 nm, con intervalos de 5 nm y fijando la emisión a 510 nm. Se agregó 0.32 μ M de la proteína y se volvió a obtener el espectro de excitación. Este procedimiento se repitió para las concentraciones restantes de DTT, ácido lipoico y solución MES pH 6.5. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 37 °C.

5.1.4. Determinación del potencial redox de la proteína roGFP1-iL

Los espectros de excitación de la proteína roGFP1-iL completamente oxidada y completamente reducida, obtenidos en el punto anterior, se usaron para determinar los valores de R_{ox} y R_{red} tal como se describe en el inciso b de la figura 6, considerando las dos longitudes de onda de máxima excitación. Se determinó el valor R para cada muestra en las diferentes condiciones redox, y se usó conjuntamente con los valores de R_{ox} y R_{red} , para determinar el grado de oxidación (inciso a de la figura 6) de la proteína roGFP1-iL en la muestra evaluada. Finalmente se determinó el potencial redox mediante la ecuación de Nernst (inciso c de la figura 6) considerando el potencial redox estándar en el equilibrio (E°) de la proteína roGFP1-iL igual a -229 mV, valor que fue determinado por Lohman y Remington (2008).

5.2. Estrategia para la obtención del baculovirus recombinante roGFP1-iL_{Golgi}

Dado que el uso de baculovirus es una excelente alternativa para entregar transgenes en células de mamíferos. Se producirá el baculovirus recombinante que contiene a la secuencia que codifica para la proteína roGFP1-iL_{Golgi}, y con este se transducirán células CHO-hSEAP para la expresión de la proteína roGFP1-iL_{Golgi}.

5.2.1. Construcción de la secuencia roGFP1-iL_{Golgi}

En la figura 9 se muestra un esquema general del procedimiento que se siguió para obtener la secuencia roGFP1-iL_{Golgi}. La descripción detallada de cada paso del procedimiento se describe en los siguientes puntos.

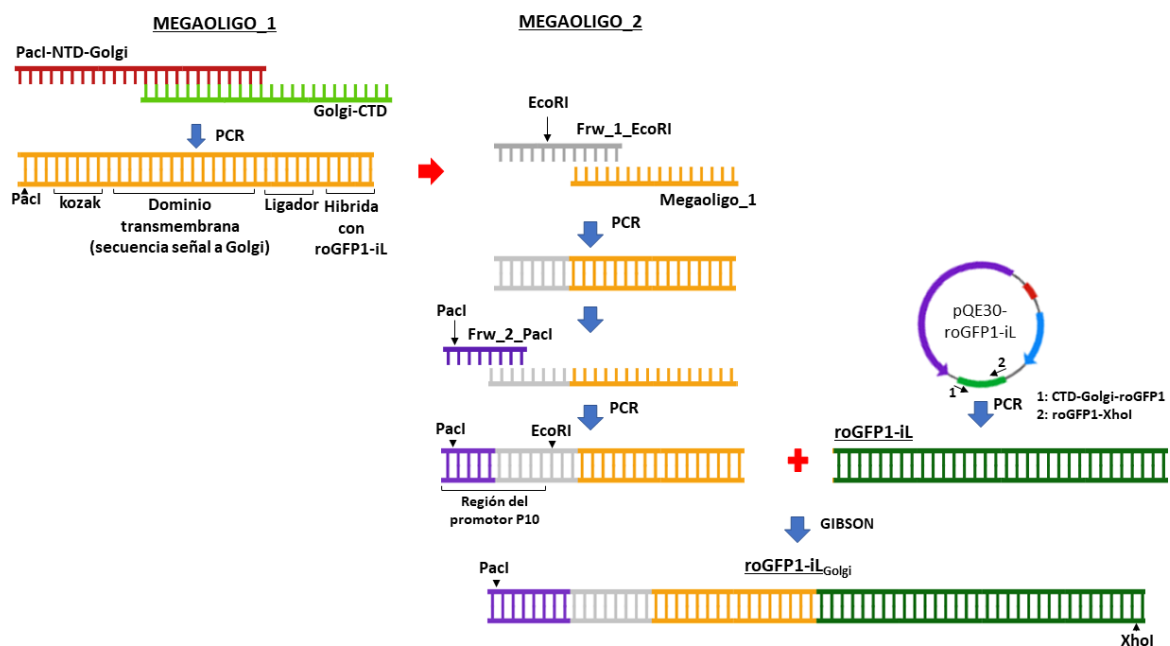


Figura 9: Esquema del procedimiento para generar la secuencia roGFP1-iL_{Golgi}. El megaoligo_1 contiene la secuencia señal para Golgi y regiones adicionales. El megaoligo_2 contiene al megaoligo_1 unido a una región del promotor P10. Finalmente, la unión del megaoligo_2 con la secuencia roGFP1-iL, amplificada a partir del vector pQE30-roGFP1-iL, da como resultado la secuencia roGFP1-iL_{Golgi}.

5.2.1.1. Construcción y amplificación de la secuencia que codifica para el péptido señal que permitirá dirigir la proteína roGFP1-iL a Golgi. Para localizar la roGFP1-iL en Golgi, se usó el dominio transmembrana *N*-terminal de la α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-IV) de *Cricetulus griseus*, cuya secuencia se encuentra disponible en CHOgenome.org(NP_001233628.1). Esta secuencia contiene al péptido señal que fue usado previamente por Zúñiga (2017) para enviar la proteína roGFP2 a la región trans de Golgi en células CHO. Se mandaron sintetizar dos oligos complementarios en 24 pb (cuadro 3), los cuales mediante una PCR de alta fidelidad permiten amplificar la secuencia que codifica para el dominio transmembrana de la ST3Gal-IV conjuntamente con otras regiones como Kozak, el sitio de restricción para PacI y el ligador.

Cuadro 3: Oligos para la construcción del péptido señal.

Nombre	Secuencia	Descripción
PacI-NTD-Golgi	CTG GGT TAA TTA AGG GCC ACC ATG GTG AGT AAA TCC CGC TGT AAG TTC CTG GCC ATG CTG GCT CTG GT	Fragmento NT del dominio transmembrana de la St3GalIV con sitio de restricción PacI para su clonación en el vector pFBGR.
Golgi-CTD	TCT GGG GCT GCT GCC GGA GAT GGA ATA CCA CAC CAT GAC GAC GAC AAA GAC CAG AGC CAG CAT GGC CAG GAA C	Fragmento CT del dominio transmembrana St3GalIV

La secuencia del péptido señal se obtuvo mediante PCR usando la enzima Phusion High-Fidelity DNA polymerase. Para esta reacción no se agregó algún templado de ácido desoxirribonucleico (ADN), ya que los oligos diseñados tienen una región complementaria que deja libre los extremos 3'. Se probaron diferentes condiciones para la reacción y se eligieron dos de ellas en donde se observó una mayor cantidad del producto amplificado esperado, al que se denominó Megaoligo_1. En ambas condiciones de PCR, la desnaturalización inicial se realizó durante 30 s a 98 °C y la extensión final durante 30 s a 72 °C. El producto amplificado se corrió en un gel de agarosa al 2% y la banda correspondiente al tamaño esperado para el Megaoligo_1 se purificó usando el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la elución se usó agua MilliQ libre de nucleasas, se cuantificó el Megaoligo_1 purificado y se guardó a -20 °C para usos posteriores.

5.2.1.2. Unión de la secuencia del péptido señal a un fragmento del promotor P10 presente en el vector pFBGR. El vector pFBGR (figura 10) cuenta con un promotor P10 que permite la transcripción de la secuencia de interés en células de insecto. En nuestro caso, parte de la secuencia de dicho promotor es eliminado al usar los sitios de restricción *PacI* y *XhoI* durante la clonación de la secuencia de interés. Como parte de nuestra estrategia de clonación, se decidió agregar mediante reacciones de PCR consecutivas, dicho fragmento a la secuencia del péptido señal, para lo cual se mandaron a sintetizar los oligos descritos en el cuadro 4. Las reacciones de PCR se realizaron usando la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. En la primera reacción se usaron el Forward_1_EcoRI y el megaoligo_1, ambos hibridan en una región complementaria de 22 pb. El amplificado de esta reacción fue purificado mediante el Kit DNA Clean&Concentrator™ (Zymo Research) y usado en una segunda reacción de PCR con el oligo Forward_2_PacI, debido a que comparten una secuencia común de 24 pb. El producto amplificado final, obtenido después de las dos reacciones consecutivas de PCR, fue denominado megaoligo_2 y se purificó usando el kit DNA Clean&Concentrator™.

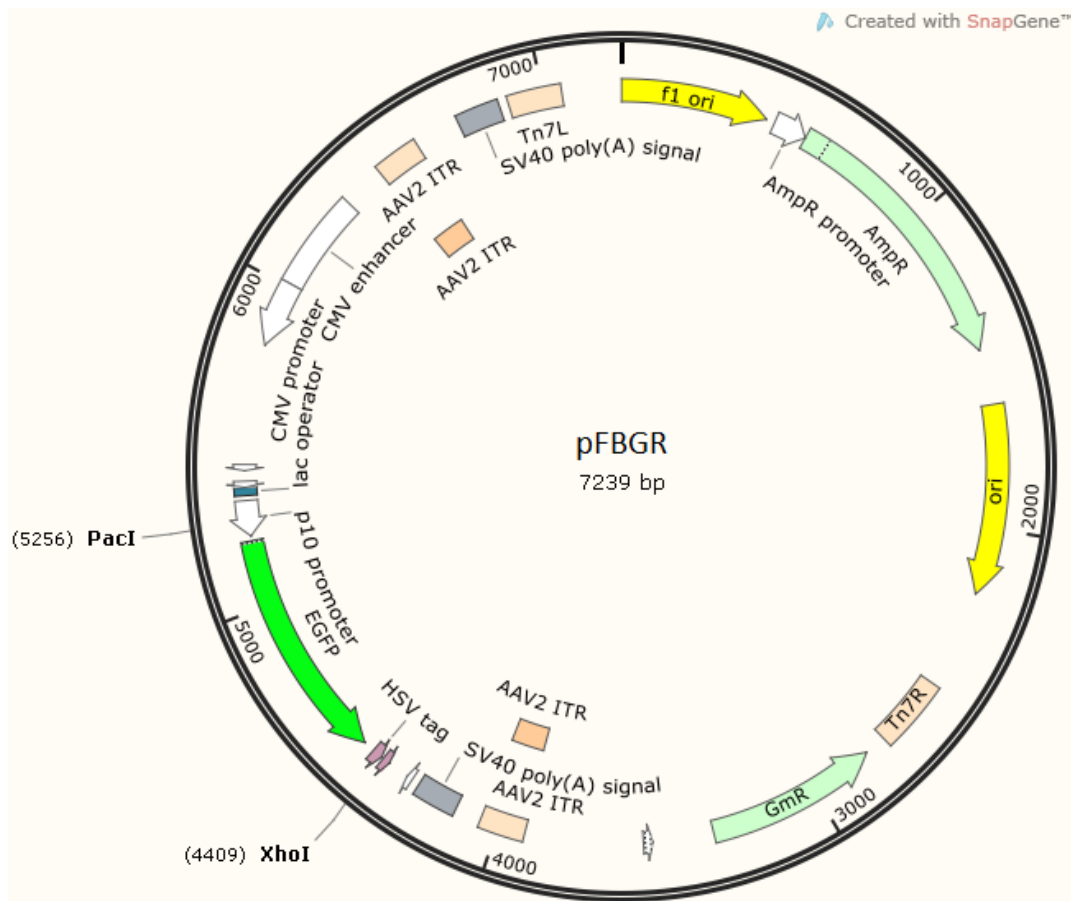


Figura 10: Esquema del vector pFBGR. Se indican los sitios de corte para las enzimas *PacI* y *XhoI*.

Cuadro 4: Oligos para agregar una región del promotor P10 a la secuencia del péptido señal.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Descripción
Forward_2_Pacl	GCT CGC TTA ATT AAA ATA CTA TAC TGT AAA TTA CAT TTT ATT TAC AAT CAA AGG AGA GAA T	Fragmento del promotor P10 con el sitio de restricción para Pacl y con una región complementaria al Forward_1_EcoRI.
Forward_1_EcoRI	TTA TTT ACA ATC AAA GGA GAG AAT TCG TCG GCC ACC ATG GTG AGT AAA TCC	Fragmento del promotor P10 con una región complementaria a la secuencia del péptido señal y con un sitio de restricción EcoRI entre el péptido señal y el promotor P10

5.2.1.3. Unión de las secuencias correspondientes a la roGFP1-iL y al péptido señal. La secuencia roGFP1-iL, presente en el vector pQE30-roGFP1-iL, fue amplificada por PCR usando los oligos CTD-Golgi-roGFP1 y roGFP1-XhoI mostrados en el cuadro 2. El producto amplificado se purificó y se unió al megaoligo_2 mediante una reacción de GIBSON en un volumen final de 10 μ L. Para la reacción se usaron 5 μ L de Gibson Assembly Master Mix (NEB), 10 ng de la secuencia roGFP1-iL y 48 ng del megaoligo_2, de tal manera que la relación molar entre estos dos últimos fue de 1 a 5. La reacción se dejó incubar durante 15 min a 50 °C y el producto obtenido (roGFP1-iL_{Golgi}) se amplificó mediante PCR usando los oligos Forward_2_Pacl y roGFP1-XhoI.

5.2.2. Clonación de la secuencia roGFP1-iL_{Golgi} en el vector pFBGR

Para la clonación de la secuencia roGFP1-iL en el vector pFBGR-EGFP (figura 10), ambos fueron digeridos con las enzimas XhoI y Pacl de NEB a 37 °C durante 8 h para el inserto y 6 horas para el vector. La digestión del vector se corrió en un gel de agarosa al 0.8 %, se identificó la banda correspondiente al vector sin la secuencia EGFP y esta se purificó mediante el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific). La defosfatación del vector pFBGR se hizo con el kit FastAP thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific). El inserto roGFP1-iL_{Golgi} digerido fue purificado mediante columna usando el kit DNA Clean & ConcentratorTM (Zymo Research).

La reacción de ligación, para la generación del plásmido pFBGR-roGFP1-iL_{Golgi}, se describe en el cuadro 5. Se usaron 25 μL de esta reacción para transformar bacterias *E. coli* Top10 mediante choque térmico. Se realizaron dos selecciones consecutivas de las colonias positivas, la primera en LB con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la segunda en LB con gentamicina 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se prepararon cultivos líquidos de las colonias positivas en medio LB con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y gentamicina 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El plásmido fue purificado y luego digerido con las enzimas EcoRI HF y XhoI de NEB para confirmar la presencia de la secuencia de interés. EcoRI es el sitio de restricción que se le agregó al inserto entre el promotor P10 y el péptido señal, mientras que XhoI se encuentra continuo al codón de parada de la secuencia roGFP1-iL. Las reacciones de digestión se corrieron en un gel de agarosa al 0.8 % y los plásmidos que liberaron el fragmento esperado fueron enviados a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del IBt. Para la secuenciación se usaron los oligos CTD-Golgi-roGFP1 y el T3, este último fue proporcionado por la Unidad de Síntesis y Secuenciación.

Cuadro 5: Componentes usados en la reacción de ligación del vector pFBGR con la secuencia roGFP1-iL_{Golgi}.

Componente	Volumen (40 μL de reacción)
10X T4 DNA Ligasa Buffer	4 μL
Vector (pFBGR)	21 μL (8 ng/ μL)
Inserto (roGFP1-iL _{Golgi})	15 μL (6 ng/ μL)
T4 DNA Ligasa (5U/ μL)	1 μL
Incubación durante 16 h a 37 °C	

5.2.3. Producción del b́acmido recombinante roGFP1-iL_{Golgi}

Se transformaron bacterias *E. coli* DH10Bac con el plásmido pFBGR-roGFP1-iL_{Golgi}. La selección de colonias positivas se realizó en placas de LB con gentamicina 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tetraciclina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, IPTG 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y X-gal 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Durante el proceso de recombinación se interrumpe la secuencia del gen que codifica para la enzima β -galactosidasa, las colonias en donde se llevó a cabo la recombinación serán blancas, mientras que aquellas que no tienen el b́acmido recombinante serán azules. Esto debido a que la β -galactosidasa hidroliza el X-gal produciendo galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, este último al oxidarse produce una coloración azul. Se sembraron las colonias blancas en placas de LB con la composición previamente descrita y se dejaron incubando a 37 °C durante 48 h.

Mediante PCR de colonia se identificaron las colonias blancas que no contenían el inserto de inte-

rés. El par de oligos M13 Frw/Rev que se usaron flanquean la región de recombinación y permiten amplificar un fragmento de aproximadamente 4862 bp cuando está presente el inserto de interés (colonia positiva). En caso contrario, se amplifica un fragmento de aproximadamente 300 bp (colonia negativa) que corresponde solo a la región de recombinación sin el inserto de interés. Para identificar las colonias positivas, también por PCR, se purificó el báculo de las colonias que no habían salido negativas mediante la PCR de colonia, y se usaron los pares de oligos Frw M13/Forward_1_EcoRI y Rev M13/roGFP1_XhoI, que amplifican fragmentos de 2886 pb y 2841 pb, respectivamente. Adicionalmente se realizó una PCR con los oligos Forward_1_EcoRI/roGFP1_XhoI para amplificar el fragmento de 866 pb que corresponde a la secuencia roGFP1-iL_{Golgi}, usando como control positivo el plásmido pFBGR-roGFP1-iL_{Golgi}. El análisis de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

5.2.4. Producción del baculovirus recombinante roGFP1-iL_{Golgi} en células de insecto Sf9

Se transfectaron 1.5×10^6 células Sf9 de insecto con 1 y 2 μg del báculo recombinante roGFP1-iL_{Golgi}. El complejo de transfección formado por el báculo y el reactivo FlyFectin (Bio-Science) se agregó a las células (sin el medio de cultivo) y se dejó incubando en agitación durante 4 h a temperatura ambiente. A cada pozo con células se le agregó 2 mL de medio Grace's 1X con antibiótico/antimicótico 1X y se dejó incubando durante 76 h a 27 °C en cámara húmeda. Se colectó el sobrenadante de cada pozo, se le agregó suero fetal bovino (SFB) 1 % y se almacenó a 4 °C. Para continuar con la producción del baculovirus, se agregó nuevamente a cada pozo 3 mL de medio Grace 1X con antibiótico/antimicótico 1X y se dejó incubando a las condiciones ya mencionadas. El sobrenadante se colectó y almacenó como se mencionó previamente. Se recolectaron las células restantes en cada pozo y se lisaron por sonicación para confirmar la expresión de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} mediante Western Blot. En este último se usaron el anticuerpo primario anti-EGFP a una dilución 1:10000, el anticuerpo secundario anti-ratón a una dilución 1:5000, y como controles la proteína roGFP1-iL y células Sf9 sin infectar.

Luego de comprobar la expresión de la proteína de interés en las células de insecto, y por tanto la presencia del baculovirus recombinante en los sobrenadantes recolectados, se procedió a usar 300 μL del sobrenadante para infectar un cultivo de 30 mL de células Sf9 en medio Sf900II a una concentración de 1.97×10^6 células/mL. Las células se dejaron incubando a 27 °C en agitación (110 rpm) durante 96 h. Se recolectó el sobrenadante mediante centrifugación, se le agregó SFB 1 % y se guardó a 4 °C.

5.2.5. Ensayo en placa para el aislamiento del baculovirus roGFP1-iL_{Golgi}

Se infectaron 1.5×10^6 células Sf9, cultivadas en placas de 6 pozos en medio Grace's 1X, con diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) del sobrenadante obtenido a partir de la infección del cultivo de 30 mL

de células Sf9. Las diluciones se hicieron en medio Grace's 1X y en un volumen final de 900 μL , cada dilución se agregó al pozo con células (sin medio) y se dejó incubando en agitación durante 4 h a temperatura ambiente. Se preparó una mezcla de agarosa con 1 volumen de agarosa al 4 %, 0.8 volúmenes de medio Grace's 2X y 0.2 volúmenes de SFB en un volumen final de 3 mL por pozo. Después de las 4 h de infección, la mezcla de agarosa a una temperatura de 40 °C se agregó lentamente sobre la pared de cada pozo, una vez que la agarosa solidificó se dejó incubando la placa a 27 °C durante 96 h en cámara húmeda. Se usó el microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse TE300 para identificar las unidades formadoras de placa (ufp), ya que las células de insecto infectadas con el baculovirus roGFP1-iL_{Golgi} expresan la proteína verde fluorescente. Las ufp más dispersas, identificadas en la dilución 10^{-4} , se colectaron mediante succión con una micropipeta de 200 μL , cada ufp succionada se resuspendió en 900 μL de medio Garce's 1X y se usó para infectar 2×10^6 células Sf9/pozo cultivadas en medio Sf900II. Antes de la infección se quitó el medio a las células. La infección se dejó incubando en agitación durante 6 h a temperatura ambiente, se agregó 2 mL de medio Sf900II a cada pozo de la placa y esta se dejó incubando 27 °C durante 96 horas en cámara húmeda. Se colectó el sobrenadante, dejando 500 μL en cada pozo, se le agregó SFB 1 % y se guardó a 4 °C (pase n° 0 del baculovirus roGFP1-iL_{Golgi}). Las células presentes en cada pozo se recolectaron con ayuda del volumen de 500 μL que se dejó del sobrenadante y se lisaron por sonicación para realizar el análisis por Western blot de la expresión de la proteína roGFP1-iL_{Golgi}, con la finalidad de conocer cuál de las infecciones había tenido mayor eficiencia. Se usaron los anticuerpos anti-EGFP 1:10000 y anti-ratón 1:5000.

5.2.6. Amplificación y titulación del baculovirus recombinante roGFP1-iL_{Golgi}

Las células Sf9 usadas para la amplificación del baculovirus fueron cultivadas previamente en un volumen de 40 mL de medio Sf90II a 27 °C y 110 rpm. Cuando la concentración celular llegó a 1.5×10^6 células/mL, el cultivo se infectó con 400 μL del sobrenadante del pase n° 0 que contiene el baculovirus recombinante roGFP1-iL_{Golgi}. La infección se dejó incubando durante 96 h a las mismas condiciones de cultivo. Se colectó el sobrenadante mediante centrifugación, se le agregó SFB 1 % y se almacenó a 4 °C (pase n° 1 del baculovirus roGFP1-iL_{Golgi}). Se realizó la titulación del baculovirus del pase n° 1 mediante la prueba de 3-(4,5 dimetiliazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolium bromuro, también llamada MTT, siguiendo el protocolo descrito por Mena et al., (2003). De manera breve, se cultivaron dos placas de 96 pozos con 50 μL de células Sf9 a una concentración final 1.8×10^5 células/mL. Cada dos columnas de la placa se infectaron con 10 μL de la dilución del baculovirus pase n° 1 (desde 10^1 hasta 10^{-9}) en medio Sf900II, dos columnas se infectaron con el baculovirus pase n° 1 sin diluir y otras dos columnas se dejaron sin infectar para que sean usadas como control. Las placas se dejaron incubar durante seis días a 27 °C en humedad. Después de ello, se agregó a cada pozo 10 μL de MTT 5 mg/mL, se dejaron incubar las placas a temperatura ambiente durante 2 h, en agitación y cubiertas de la luz. Las placas se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se agregó 50 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada pozo. Las placas se leyeron por absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

Para obtener el título viral, se obtuvieron los promedios de absorbancia y desviación estándar para cada dilución; estos datos y las diluciones se introdujeron en el programa Sigma Plot. Se obtuvo una gráfica que se ajustó a un modelo logístico sigmoideal de cuatro parámetros: a , b , x_0 , y_0 ; en donde x_0 es el valor de la dilución a la cual se observa el 50% de la respuesta a la infección viral. A partir del valor de x_0 se calculó la $DLCC50/mL = (1/(10-x_0))/0.01$ mL, $DICC50/mL = 10^{0.912(\log DLCC50/mL + 1.674)}$, y $ufp/mL = DICC50/mL \times 0.69$. Se volvió a amplificar el baculovirus de interés infectando un cultivo de células Sf9 con el baculovirus del pase n° 1, usando una $MOI = 0.1$ ufp/célula. El baculovirus roGFP1-iL_{Golgi} obtenido (pase n° 2) fue almacenado y titulado de la forma ya descrita.

5.3. Expresión de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} en células CHO-hSEAP

5.3.1. Transducción de células CHO-hSEAP con el baculovirus roGFP1-iL_{Golgi}

El día anterior a la transducción, se cultivaron 2.5×10^5 células CHO-hSEAP en placas Fluorodish de 33 mm de diámetro previamente tratadas con polilisina. El cultivo se realizó en medio Cellvento suplementado con glutamina 6 mM, se dejó incubando a 37 °C y CO₂ 5 %. Las células se transdujeron con una multiplicidad de infección (MOI , “multiplicity of infection”) de 250 ufp/célula, en un volumen final de 120 μ L con medio Cellvento, durante 6 h a 28 °C, CO₂ 5 % y agitación. Posteriormente se reemplazó el medio de transducción por Cellvento suplementado con glutamina 6 mM y butirato 1 mM y se dejó incubando durante 48 h a 37 °C y CO₂ 5 %.

5.3.2. Verificación de la localización de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} en Golgi

Para confirmar la presencia de roGFP1-iL_{Golgi} en Golgi se realizó el ensayo de colocalización usando el marcador de Golgi BSA-BODIPY TR ceramide (Thermofisher). A las 48 h postransducción se realizó el marcaje de Golgi, para lo cual se colocaron las cajas de células sobre hielo durante algunos minutos, se lavaron las células con la solución amortiguadora HBS/HEPES 10 mM pH 7.4 (frío), se agregó el complejo BSA-BODIPY TR ceramide 5 μ M y se dejó incubar durante 30 minutos a 4 °C. Se lavaron las células con medio frío y se dejaron incubando en medio Cellvento a 37 °C y CO₂ 5 % durante 30 min, se lavaron nuevamente las células y se dejaron incubando en medio Cellvento durante 1 h a las condiciones ya mencionadas. Transcurrido este tiempo, las placas fueron llevadas al Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA) para la adquisición de imágenes.

Las placas se colocaron en el microscopio confocal de disco giratorio 3I Marianas de tipo Zeiss Observer Z.1 invertido, dentro de una cámara a 37 °C y con CO₂ 5 %. La adquisición de las imágenes se realizó con un objetivo de 63X O/1.4 y en diferentes planos focales en el eje Z. La proteína fluorescente roGFP1-iL_{Golgi} fue excitada con la combinación de dos láser: 488-405 nm, y la luz emitida fue colectada con un filtro de emisión de 525/30 nm. El BSA-BODIPY TR ceramide fue excitado con un láser de 561

nm y la luz emitida fue colectada con un filtro de emisión de 610 nm. El análisis de colocalización se realizó con el programa FIJI.

5.4. Medición del potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP bajo condiciones de normoxia e hipoxia

5.4.1. Calibración de sensores de oxígeno PreSens

Con la finalidad de medir la cantidad de oxígeno en los cultivos celulares, se usó el sensor de oxígeno SP-PSt3-YAU-D10-YOP de PreSens basado en el principio de apagado de la fluorescencia. El sensor es excitado con una luz LED proporcionada por el equipo Fibox3 a través de una fibra óptica, y la intensidad de fluorescencia emitida, que varía de acuerdo con la cantidad de oxígeno, es convertida a % de O₂AirSat o sus equivalentes (% O₂, mmHg) en el programa PST3v602 de PreSens.

El sensor se calibró con aire atmosférico para configurar la medición al 100 % O₂AirSat, y con nitrógeno para la medición al 0 % O₂AirSat. Se usaron en total 4 sensores de oxígeno que fueron calibrados de manera independiente como se indica a continuación. El sensor de oxígeno fue colocado dentro de un frasco T25 de poliestireno que se llenó con 5 mL de agua. El frasco (sin cerrar) fue colocado dentro de una bolsa para empaqueo al vacío de 5 lados Vesta Precision cuya dimensión fue de 25.4 x 30.5 x 5.5 cm, se selló la bolsa dejando una abertura pequeña en cada extremo de la bolsa (dos aberturas en total). Con ayuda de un controlador de gases y de una manguera se suministró aire (1300 mL/min) durante 20 minutos por una de las aberturas de la bolsa, se sellaron ambas aberturas y se colocó la bolsa en una incubadora a 37 °C. La fibra óptica (Fibox3) se colocó dentro de la incubadora y debajo de la ubicación del sensor de oxígeno, de tal manera de que la Luz LED pudiera excitarlo. El programa PST3v6.02 brinda mediciones de oxígeno, amplitud y fase, este último valor varía de acuerdo con la cantidad de oxígeno presente y es el usado para realizar la calibración del sensor. La medición de fase se realizó en intervalos de 1 min y configurando el programa a 37 °C. Cuando el valor de fase se mantuvo oscilando entre los mismos valores cercanos por al menos unos 10 min, la medición se detuvo y se sacó un promedio de estos. Todo este procedimiento se volvió a realizar con nitrógeno (1320 mL/min) para calibrar el sensor al 0 % O₂AirSat.

Cuando se obtuvo el valor promedio de fase en ambas condiciones para cada uno de los 4 sensores, se evaluó que estos reporten la misma cantidad de oxígeno bajo las mismas condiciones. A cada sensor se le asignó un número del 1 al 4, y se manipularon de forma que se evitó la confusión entre uno u otro sensor. Cada sensor se colocó dentro de un frasco T25 con 5 mL de agua, los cuatro frascos (sin tapar) se colocaron dentro de la incubadora a 37 °C, CO₂ 5 % y humedad. La fibra óptica (Fibox3) se colocó dentro de la incubadora y debajo de la ubicación del sensor de oxígeno. Antes de medir la cantidad de oxígeno, se realizó la calibración manual del sensor en el programa PST3v6.02. Se introdujo los promedios de fases obtenidos previamente para el sensor en cuestión, considerando además la

presión atmosférica igual a 810 mBar (608 mmHg) y la temperatura 37 °C. También se evaluó la medición de los sensores bajo condiciones de hipoxia. Para ello los cuatro frascos se colocaron dentro de una bolsa para vacío Vesta Precision previamente descrita, se colocó un papel mojado dentro de la bolsa y selló dejando los extremos abiertos. Por uno de los extremos se suministró durante 20 min una mezcla de gases compuesta por nitrógeno (1320 ml/min), oxígeno (11 mL/min) y dióxido de carbono (70 mL/min). Los flujos fueron obtenidos usando controladores de flujo másico para cada gas. Se selló completamente la bolsa y se colocó en la incubadora a 37 °C. El procedimiento para medir la cantidad de oxígeno con cada sensor se siguió como se indica líneas arriba.

Cabe mencionar que debido al espesor del sensor de oxígeno (1 mm) y la profundidad del agua (2 mm), la cara del sensor que reacciona con el oxígeno no se encontraba sumergida en la fase líquida.

5.4.2. Cultivos celulares bajo condiciones normales de oxígeno

Dentro de una incubadora el porcentaje de oxígeno depende de la temperatura, la presión atmosférica y la presencia de otros gases. En una incubadora a 37 °C con un 5 % de CO₂ y 100 % de humedad, provocada por la presencia de una bandeja con agua, el porcentaje de oxígeno sería de aproximadamente 18.6 % de O₂ (89.1 % O₂AirSat). Este porcentaje de oxígeno fue corroborado usando los sensores de oxígeno PreSens, cuyo modo calibración y uso se describió en el punto anterior.

Las células CHO-hSEAP se cultivaron, la noche anterior a la transducción a una densidad de 80000 células/cm² en frascos T25 de poliestireno (superficie de 25 cm²) con tapa de filtro, en 4 mL de medio Cellvento suplementado con glutamina 6 mM y se dejaron incubando a 37 °C en humedad y 5 % de CO₂. Al día siguiente en la mañana se transdujeron las células con el baculovirus roGFP1-iL_{Golgi} usando una MOI de 500 ufp/célula, en un volumen final de 770 μL con medio PSFM, y considerando el total de células en cada frasco igual a 2x10⁶ células/mL. Como control de la transducción se usó 770 μL de medio PSFM. La transducción se llevó a cabo entre 6 y 8 horas a 28 °C y en agitación. Se quitó el medio de transducción y se colocó en cada frasco 5 mL de medio Cellvento suplementado con glutamina 6 mM, con y sin butirato 1 mM. Se dejó el cultivo en una incubadora a 37 °C, en humedad y CO₂ 5 %. A las 48 h postransducción se realizaron las mediciones de potencial redox.

5.4.3. Cultivos celulares bajo condiciones de hipoxia

Se usaron controladores de flujo másico para regular el porcentaje de oxígeno en una mezcla de gases conformada por nitrógeno, oxígeno y dióxido de carbono. De esta manera, al regular el flujo de nitrógeno a 1320 mL/min, oxígeno a 11 mL/min y CO₂ a 70 mL/min, se obtuvo una mezcla compuesta por 5 % de CO₂ y 0.79 % de O₂. Este porcentaje de oxígeno fue corroborado a temperatura ambiente usando el sensor de oxígeno PreSens, cuyo modo de calibración y uso se describió previamente.

El cultivo de células CHO-hSEAP y la transducción se realizaron como se indica en el punto anterior, con la diferencia de que no se agregó butirato. A las 24 h postransducción, se colocó dentro del frasco de cultivo el sensor de oxígeno PreSens previamente autoclavado. Las células se colocaron bajo condiciones de hipoxia empleando bolsas para empacado al vacío de 5 lados Vesta Precision con una dimensión de 25.4 x 30.5 x 5.5 cm y la mezcla de gases con 0.78 % de oxígeno. Lo que se hizo fue colocar el frasco con las células transducidas dentro de la bolsa para vacío, se colocó dentro de la bolsa un papel húmedo para simular las condiciones de humedad dentro de la incubadora y se selló la bolsa dejando dos extremos abiertos. Por un extremo se suministró la mezcla de gases durante 30 min, se sellaron ambos extremos y se colocó la bolsa a 37 °C. Se comenzó a medir la cantidad de oxígeno dentro del cultivo usando el sensor de oxígeno PreSens, colocado dentro del frasco, y los valores de calibración para el sensor en uso. La medición se hizo hasta que el % O₂AirSat obtenido se mantuvo estable durante aproximadamente 10 min. A las 48 postransducción, se volvió a medir el % O₂AirSat para verificar que este se haya mantenido estable y luego de esto se realizaron las mediciones de potencial redox. Es importante mencionar que debido a que el espesor del sensor de oxígeno era de 1 mm y la profundidad del medio era de 2 mm, el sensor no estaba completamente sumergido dentro del medio de cultivo, por lo que la cara del sensor que reacciona con el oxígeno estaba expuesta al ambiente atmosférico del frasco de cultivo.

5.4.4. Medición del potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP

A las 48 horas postransducción con una jeringa se perforó el filtro de la tapa del frasco T25 y se retiró todo el medio de cultivo. Inmediatamente con otra jeringa se agregó por la misma perforación del filtro 1 mL de *N*-etilmaleimida (NEM) 20 mM en PBS 1X, se dejó incubando en agitación a temperatura ambiente entre 10 a 15 min. Se abrió el frasco de cultivo, se descartó la solución de NEM y se lavaron las células dos veces con PBS 1X. Se agregó 1 mL de tripsina 0.15 % con EDTA 0.5 M en PBS 1X y se dejó incubando durante 5 min a 37 °C. Las células se recuperaron en un tubo de centrífuga de 15 mL en un volumen final de 3 mL de PBS 1X y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 0.5 o 1 mL de PBS 1X, dependiendo de la cantidad de células observada. Se usó 10 μL de la resuspensión para contar el número de células usando cámara de Neubauer. En una microplaca negra de 96 pozos de poliestireno (Corning) se colocaron 3.5x10⁵ células/pozo, desde cuatro hasta ocho pozos dependiendo de la cantidad de células disponibles, en un volumen final de 100 μL en PBS 1X. Durante la medición se usó como control células sin transducir, teniendo en cuenta que las mismas células sirven como control para todos los tratamientos (normoxia, hipoxia y butirato), ya que por lo general se evaluaron al menos dos tratamientos por experimento. La microplaca se colocó en el equipo Synergy H1, se midieron los espectros de excitación a 37 °C haciendo un barrido de excitación desde 350 hasta 500 nm, con intervalos de 5 nm y fijando la emisión en 510 nm. Para poder obtener el espectro únicamente con la fluorescencia de la proteína roGFP1-iL_{Golgi}, los espectros obtenidos de cada pozo se corrigieron restándoles la fluorescencia del espectro prome-

dio de los pozos control. Se determinó el valor de R para cada caso y se usó conjuntamente con los valores R_{ox} y R_{red} , para determinar el grado de oxidación de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} y su potencial redox.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Expresión y purificación de la proteína roGFP1-iL

La expresión de la proteína roGFP1-iL se llevó a cabo en la bacteria *E. coli* SHuffle. Dado que la transcripción del gen *roGFP1-iL*, presente en el vector pQE30, está regulado por el promotor T5 que es reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*; no es necesario el uso de cepas como la BL21 (DE3) que expresan de manera inducible la ARN polimerasa T7 (Rosano y Ceccarelli, 2014). La purificación se llevó a cabo con una resina de agarosa unida a níquel, ya que la proteína de interés tiene una cola de 6xHis en su extremo *N*-terminal. El peso esperado de la 6xHis-roGFP1-iL, según se evaluó con la herramienta de ProtParam de ExPasy, es de 28 kDa. Como se observa en el gel SDS-PAGE de las muestras de la purificación (figura 11), la banda a la altura de 28 kDa que está presente en la lisis total (carril 2) y en las eluciones (carril 5, 6, y 7) corresponde a la proteína recombinante roGFP1-iL y que además está enriquecida en la segunda fracción de elución (carril 6). Se observa además la presencia de una banda a la altura de 68 kDa en la primera y segunda fracción de elución, la ausencia de esta banda en la tercera fracción de elución sugiere que esta corresponde a una proteína endógena de *E. coli* que no pudo ser removida al usar 30 mM de imidazol.

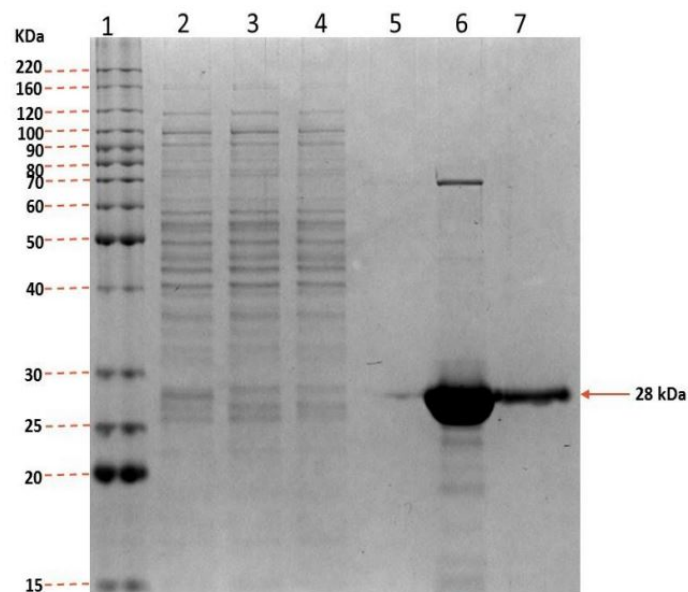


Figura 11: Purificación de la proteína roGP1-iL. Gel SDS-PAGE 12 % de las fracciones recolectadas durante el proceso de purificación. 1: Marcador BenchMark Life Technologies. 2: Sobrenadante de la lisis (contiene imidazol 30 mM). 3. Fracción no unida. 4. Fracción de lavados de la resina (solución de lavado con imidazol 30 mM). 5: Primera fracción de elución. 6. Segunda fracción de elución. 7. Tercera fracción de elución. Solución de elución con imidazol 500 mM.

Al usar el programa Image Lab 6.0.1 BIORAD se determinó un porcentaje de pureza del 80.9 % para la proteína roGFP1-iL en la segunda fracción de elución (figura 12). La concentración total de proteína (determinada por el método de Bradford) en dicha muestra fue de 4.47 mg/mL. Con estos datos se determinó una concentración de 3.62 mg/mL para la proteína roGFP1-iL purificada.

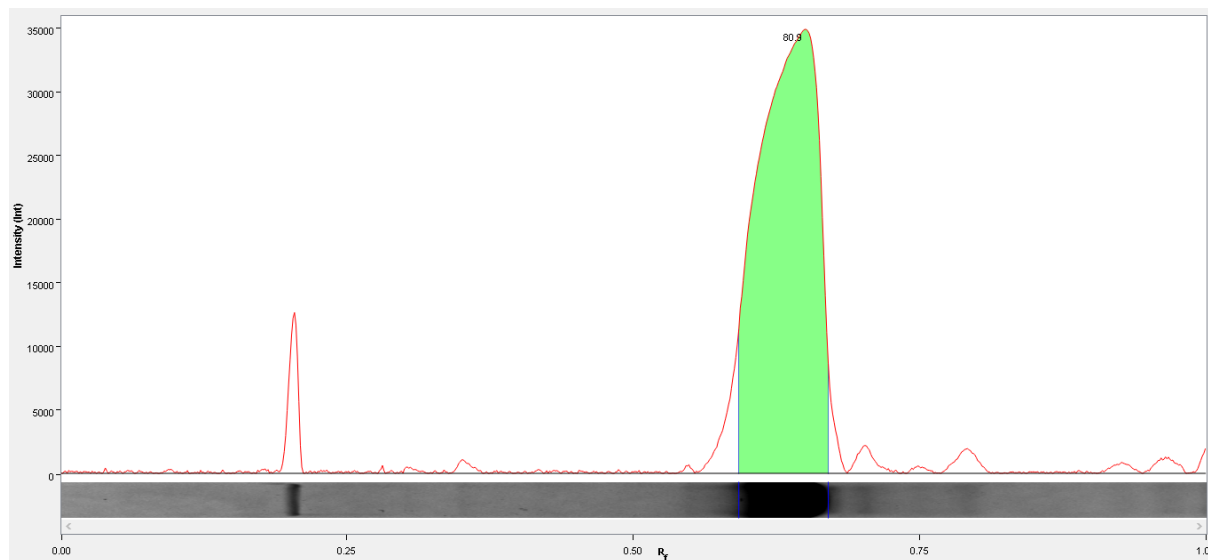


Figura 12: Porcentaje de pureza de la proteína roGFP1-iL en la segunda fracción de elución. Se analizó el carril número 6 del gel de electroforesis de la figura 11. El porcentaje de pureza se obtuvo en el programa Image Lab 6.0.1 BIORAD, aplicando el método de punto flotante (disk size = 1) para remover el ruido de fondo. Rf: distancia de migración relativa.

6.2. Evaluación *in vitro* de la respuesta de la proteína roGFP1-iL bajo diferentes condiciones redox

6.2.1. Mediciones realizadas en el equipo PerkinElmer

Como se observa en la figura 13, el espectro de excitación de la proteína roGFP1-iL, obtenido con el espectrofluorímetro Ls55 PerkinElmer, presenta dos longitudes de onda de máxima excitación a 395 y 465 nm, correspondientes a los estados oxidado (cromóforo neutro) y reducido de la proteína (cromóforo aniónico), respectivamente, de acuerdo con lo reportado por Lohman y Remington, 2018.

Los espectros de excitación de la proteína roGFP1-iL bajo diferentes condiciones redox (figura 13) fueron normalizados con respecto al punto isobéptico (425 nm) que separa los dos picos de excitación y que representa el equilibrio entre los dos estados de la proteína. Para la normalización se asignó de manera arbitraria el valor de 1 a la intensidad de fluorescencia obtenida a 425 nm de excitación. La máxima reducción de la proteína se obtuvo con DTT 500 mM y la máxima oxidación, en solución MES

sin DTT. Cabe mencionar que como agente oxidante se intentó usar H_2O_2 a distintas concentraciones, sin embargo en lugar de oxidar la proteína, lo que se observó fue una disminución en la intensidad de fluorescencia en el pico de excitación correspondiente a la especie oxidada (datos no mostrados), que podría estar relacionado con la formación de dímeros de la proteína, por lo que se descartó su uso.

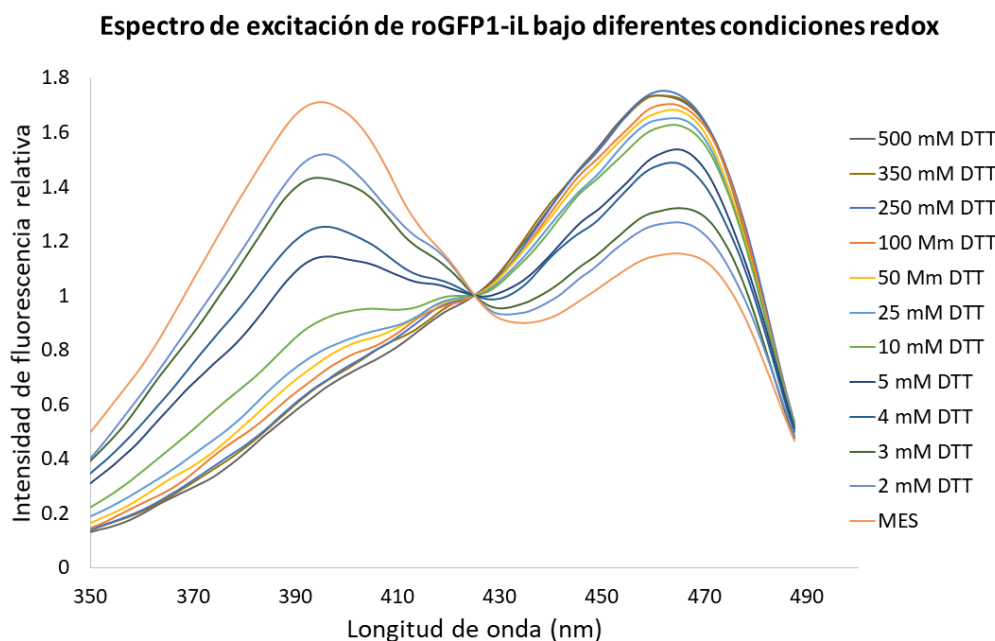


Figura 13: Espectro de excitación de la proteína roGFP1-iL en diferentes condiciones redox.

Longitud de onda de emisión: 505 nm. Las intensidades de fluorescencia de cada espectro fueron normalizadas con respecto al punto isobéptico (425 nm) al cual se le asignó el valor de 1. Las mediciones se realizaron en el equipo PerkinElmer.

Se evaluó la formación de monómeros y dímeros de la proteína roGFP1-iL, para lo cual las muestras se corrieron en un gel no reductor SDS-PAGE al 12 % que fue teñido con azul de Coomassie y luego fotodocumentado en el equipo ChemiDoc. Como se observa en la figura 14, en la solución MES (carril 2) se encuentran presentes el monómero oxidado (52.2 %), el monómero reducido (10.1 %) y la forma dimérica (37.8 %). Los porcentajes mencionados fueron determinados mediante el programa Image Lab 6.0.1 BIORAD (figura 15). La forma dimérica se reduce completamente en presencia de DTT 1mM, mientras que la cantidad de monómero oxidado va disminuyendo conforme la concentración de DTT va aumentando. La banda observada a la altura de 70 kDa tanto en la muestra en solución MES como en las muestras tratadas con diferentes concentraciones de DTT, lo que sugiere su correspondencia a una proteína endógena de *E. coli* tal como se había planteado previamente. Los dímeros de la roGFP1-iL, producidos por la formación de puentes disulfuro entre las cisteínas de la proteína, presentan un

espectro de excitación intermedio entre las formas monoméricas oxidadas y reducidas (Sarkar et al., 2013). La presencia del dímero, el monómero reducido y la forma oxidada de la proteína, en la solución MES, explicaría el espectro de excitación obtenido para la proteína roGFP1-iL en dicha condición (figura 13).

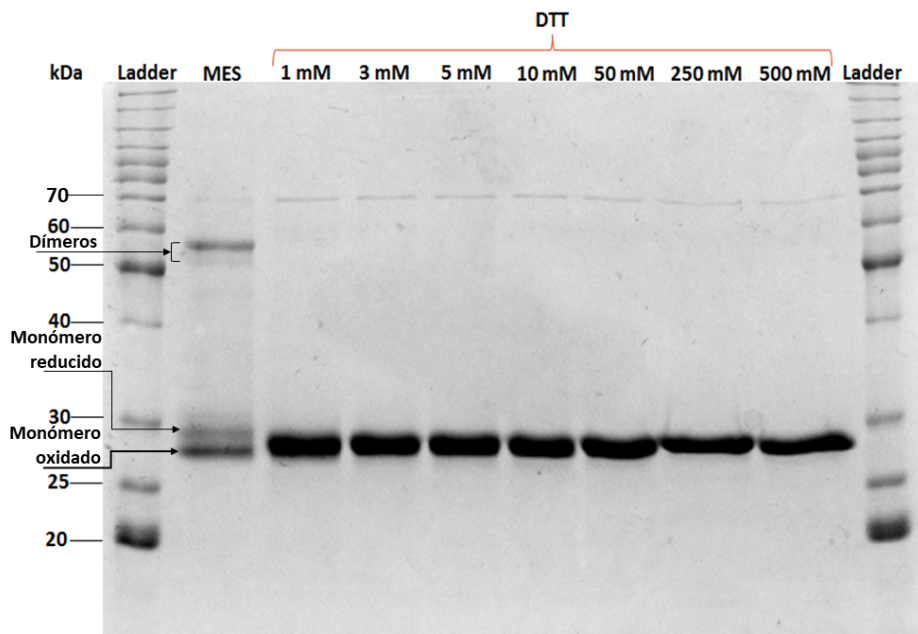


Figura 14: Gel SDS-PAGE 12 % no reductor para el análisis de la presencia de monómeros y dímeros de la proteína roGFP1-iL en diferentes condiciones redox. En el primer y último carril se colocó el marcador de peso molecular. En el segundo carril, la muestra cargada corresponde a la proteína roGFP1-iL en solución amortiguadora MES. Desde el carril tres hasta el nueve, las muestras corresponden a la proteína roGFP1-iL en MES con diferentes concentraciones de DTT.

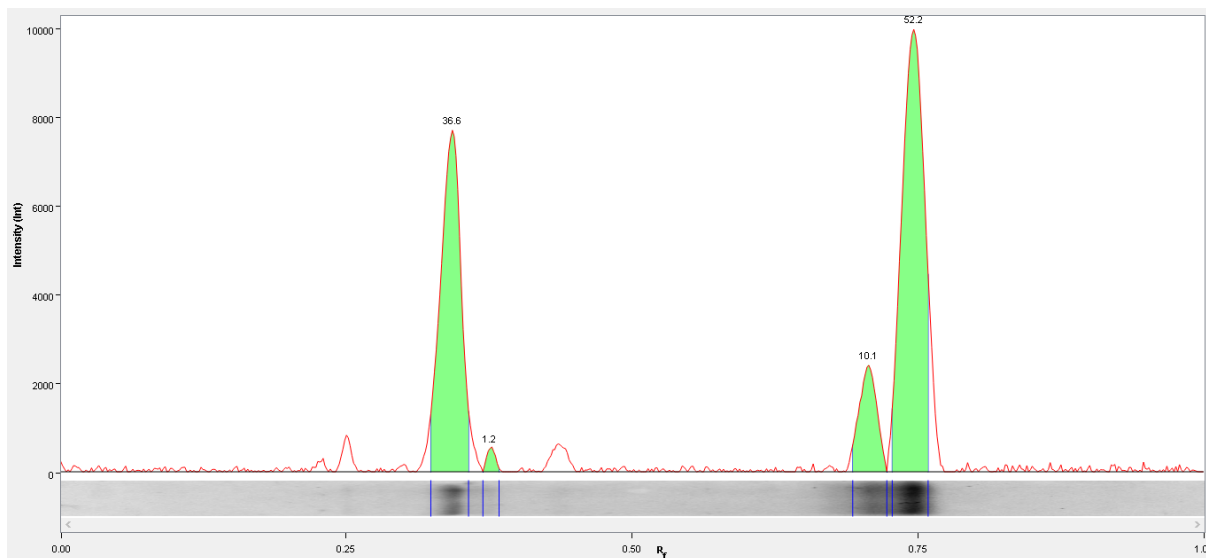


Figura 15: Porcentaje de monómeros y dímeros de la proteína roGFP1-iL. Se analizó el segundo carril del gel de electroforesis de la figura 14. Se usó el programa Image Lab 6.0.1 BIORAD, aplicando el método de punto flotante (disk size = 1) para remover el ruido de fondo. Rf: distancia de migración relativa.

Usando la información, obtenida en el PerkinElmer, de los espectros de excitación de la proteína completamente oxidada (MES) y reducida (DTT 500 mM)), se calcularon los valores de R_{ox} , R_{red} y $I_{465_{ox}}/I_{465_{red}}$ (datos no mostrados). En donde los términos R_{ox} y R_{red} hacen referencia a la razón de las intensidades de fluorescencia en los picos máximos de excitación (395 y 465 nm) de la proteína completamente oxidada y reducida, respectivamente. Los términos $I_{465_{ox}}$ y $I_{465_{red}}$ corresponden a las intensidades de fluorescencia a 465 nm de excitación para la proteína completamente oxidada y reducida, respectivamente. Dichos valores se utilizaron para determinar el grado de oxidación de la proteína roGFP1-iL, en cada condición del experimento, con la siguiente ecuación:

$$OxD_{roGFP1-iL} = \frac{R - R_{red}}{\frac{I_{460nm_{ox}}}{I_{460nm_{red}}}(R_{ox} - R) + (R - R_{red})}$$

En donde R hace referencia a la razón de las intensidades de fluorescencia en los picos máximos de excitación (395 y 465 nm) para cada condición del experimento.

Con el grado de oxidación de roGFP1-iL, se determinó el potencial redox de la proteína roGFP1-iL para condición del experimento usando la ecuación de Nernst:

$$E_{roGFP1-iL} = E'_{roGFP1-iL} - \frac{RT}{2F} \ln\left(\frac{1 - OxD_{roGFP1-iL}}{OxD_{roGFP1-iL}}\right)$$

En donde $E^{\circ}_{roGFP1-iL}$ es el potencial medio de referencia para la roGFP1-iL y tiene un valor de -229 mV que fue determinado por Lohman y Remington (2008). R es la constante universal de los gases ($1.987 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$), T es la temperatura en grados Kelvin ($310.15 \text{ }^{\circ}\text{K}$) y F es la constante de Faraday ($23.06 \text{ cal.mV}^{-1}.\text{mol}^{-1}$).

Se determinó el potencial redox de la proteína E(mV) roGFP1-iL para cada una de las condiciones evaluadas. En la figura 16 se muestra la relación entre el grado de oxidación de la proteína roGFP1-iL y su potencial redox para cada condición.

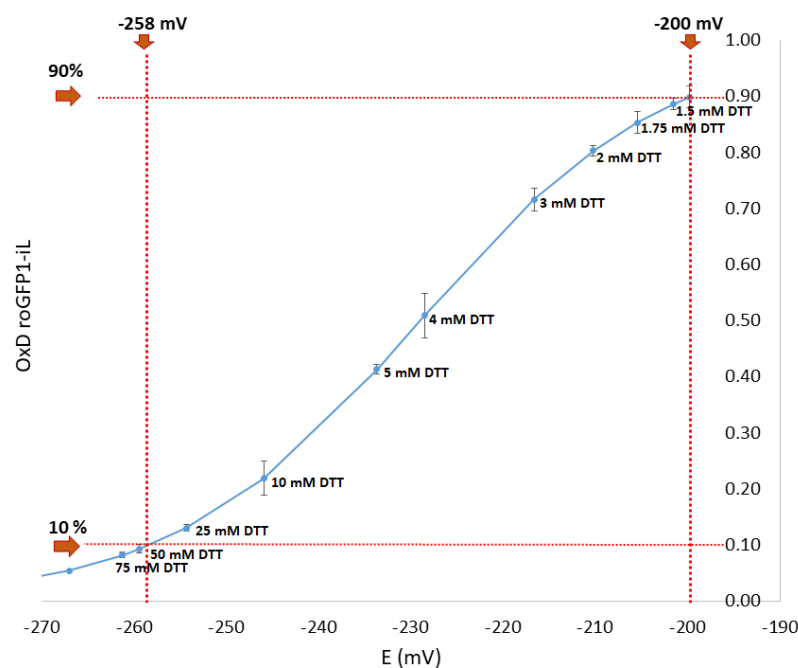


Figura 16: Relación entre el grado de oxidación de roGFP1-iL y su potencial redox. Las líneas rojas marcan los límites de medición de potencial redox de la proteína roGFP1-iL (Lohman y Remington (2008)). El cálculo del $OxD_{roGFP1-iL}$ se hizo a partir de las mediciones realizadas en el equipo PerkinElmer y el potencial redox se estimó a partir de la ecuación de Nernst.

El rango de medición del potencial redox de la proteína roGFP1-iL va desde -260 mV hasta -200 mV, límites que corresponden al 10 y 90 % de la proteína oxidada. En la figura 16 se muestra gráficamente esta relación a partir de las mediciones realizadas en el equipo PerkinElmer. Por lo general, las roGFPs son usadas para medir el equilibrio GSH/GSSG con un potencial redox que varía $\pm 35 \text{ mV}$ con respecto a su potencial medio de referencia (Lohman y Remington, 2008).

6.2.2. Mediciones realizadas en el equipo Synergy H1

Dado que posteriormente, al expresar la proteína roGFP1-iL_{Golgi} en células CHO-hSEAP, esta no pudo ser detectada en el equipo PerkinElmer, pero si en el equipo Synergy H1; se volvió a evaluar la respuesta de la proteína roGFP1-iL (purificada) en diferentes condiciones redox, usando para ello el equipo Synergy H1. Esto con la finalidad de obtener los valores de R_{ox} , R_{red} y $I_{460_{ox}}/I_{460_{red}}$, necesarios para poder determinar posteriormente el grado de oxidación de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} en células CHO-hSEAP.

Se usaron diferentes concentraciones de DTT para reducir a la proteína roGFP1-iL y ácido lipoico para oxidarla. Como se observa en la figura 17, los espectros de excitación se normalizaron con respecto a la intensidad de fluorescencia en el punto isosbético de 425 nm, igualando este valor a 1. Los dos picos máximos de excitación se observaron a 400 y 460 nm, correspondientes a la forma oxidada y reducida, respectivamente. La máxima reducción de la proteína se obtuvo en la solución de 500 mM de DTT, mientras que la máxima oxidación se observó de manera similar en las soluciones de 2 y 5 mM de ácido lipoico. La comparación de los espectros obtenidos en ácido lipoico y en MES parece indicar que hay muy poca cantidad del monómero reducido en la solución MES.

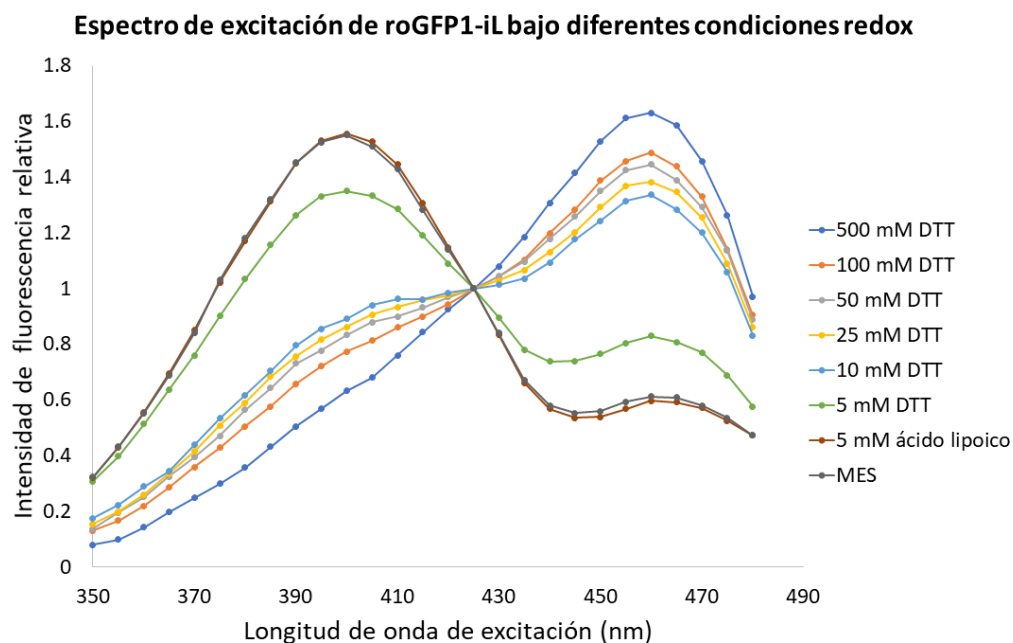


Figura 17: Espectro de excitación de la proteína roGFP1-iL a diferentes condiciones redox. Longitud de onda de emisión: 510 nm. Las intensidades de fluorescencia de cada espectro fueron normalizadas con respecto al punto isosbético (425 nm) al cual se le asignó el valor de 1. Mediciones realizadas en el equipo Synergy H1.

Las intensidades de fluorescencia en los picos máximos de excitación (400 y 460 nm) de los espectros de excitación de la proteína roGFP1-iL completamente oxidada (ácido lipoico 5 mM) y completamente reducida (DTT 500 mM) se usaron para determinar los valores de R_{ox} , R_{red} y $I_{460_{ox}}/I_{460_{red}}$ (cuadro 6), parámetros que serán usados para determinar posteriormente el grado de oxidación de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} expresada en células CHO-hSEAP.

Cuadro 6: Parámetros para determinar el grado de oxidación de la proteína roGFP1-iL ($OxD_{roGFP1-iL}$).

	I_{400nm}	I_{460nm}	$I_{400nm}/460nm$
ácido lipoico 5 mM (proteína completamente oxidada)	$3.07 \times 10^4 \pm 0.22 \times 10^4$	$1.18 \times 10^4 \pm 0.08 \times 10^4$	$R_{ox} = 2.61 \pm 0.03$
DTT 500 mM (proteína completamente reducida)	$7.82 \times 10^3 \pm 0.57 \times 10^3$	$2.016 \times 10^4 \pm 0.18 \times 10^4$	$R_{red} = 0.388 \pm 0.018$
		$I_{460_{ox}}/I_{460_{red}} = 0.585$	

Las mediciones se hicieron por cuadruplicado en el caso del ácido lipoico 5 mM y por triplicado para el DTT 500 mM. Se muestran los promedios \pm la desviación estándar (DS) de las intensidades de fluorescencia en los máximos picos de excitación ($I_{400_{nm}}$ y $I_{460_{nm}}$) para cada condición. Los valores de R_{ox} y R_{red} se obtuvieron promediando las razones $I_{400_{nm}}/I_{460_{nm}}$ para cada una de las mediciones de cada condición. El valor de $I_{460_{ox}}/I_{460_{red}}$ se obtuvo dividiendo el promedio de la $I_{460_{nm}}$ para la proteína completamente oxidada entre el promedio de la $I_{460_{nm}}$ para la proteína completamente reducida.

6.2.3. Comparación entre las mediciones realizadas en el equipo PerkinElmer y Synergy H1

Como se observa en las figuras 13 y 17, los picos de máxima excitación varían un poco, en el primer caso estos son 395 y 465 nm, mientras que en el segundo caso dichos valores son 400 y 460 nm. Estas diferencias serían resultado de las características de cada equipo. Por otro lado, si comparamos los espectros de la proteína en MES obtenidos en el PerkinElmer y el Synergy H1, en el Synergy H1 parece haber un mayor grado de oxidación de la roGFP1-iL (realizada meses después de la purificación proteica), lo que podría sugerir la oxidación del monómero reducido y la pérdida de los dímeros, dada su inestabilidad, a lo largo del tiempo. Esto no se puede confirmar, ya que no se realizó el análisis de la formación de monómeros y dímeros (mediante SDS-PAGE no reductor) de la proteína roGFP1-iL en MES evaluada en el Synergy H1. Asimismo, se observa una mayor variación entre los espectros de la proteína roGFP1-iL obtenidos en DTT 5 y 10 mM usando el equipo Synergy H1 con respecto a los obtenidos en el equipo PerkinElmer. Esto se debería a que las mediciones en DTT 5 mM en el Synergy

H1, que se realizaron meses después del resto de mediciones (DTT 10 - 500 mM) llevadas a cabo en el mismo equipo, se realizaron a partir de una solución stock de DTT 1M que había sido preparada unos meses atrás, por lo que la actividad reductora del DTT podría haber disminuido durante el tiempo de almacenamiento y por tanto estaría generando una menor reducción de la proteína bajo estas condiciones.

Los resultados de estos experimentos nos indican la respuesta de la proteína sensora bajo diferentes condiciones tanto reductoras como oxidantes. Además, es importante recalcar la importancia de obtener los parámetros R_{ox} , R_{red} y $I460_{ox}/I460_{red}$ para la proteína roGFP1-iL en cada instrumento de medición. Inicialmente se obtuvieron dichos parámetros en el equipo PerkinElmer, con la finalidad de usar el mismo equipo para las mediciones de potencial redox de Golgi en células CHO-hSEAP que expresen la proteína roGFP1-iL_{Golgi}; sin embargo, al no poder ser esta última detectada en el equipo PerkinElmer, se tuvieron que evaluar otros equipos para tal fin. En dicho sentido, se logró detectar la proteína roGFP1-iL_{Golgi} expresada en células CHO-hSEAP, empleando el equipo Synergy H1. Por lo que se obtuvieron los parámetros R_{ox} , R_{red} y $I460_{ox}/I460_{red}$ para la proteína roGFP1-iL en este equipo.

6.3. Obtención del baculovirus recombinante roGFP1-iL_{Golgi}

Para poder expresar la proteína roGFP1-iL en las células CHO-hSEAP, se usó para la entrega del transgen el baculovirus recombinante que contiene la secuencia roGFP1-iL_{Golgi}. Esta secuencia contiene al gen de la proteína roGFP1-iL unida a una secuencia señal de localización en Golgi.

Lo primero que se hizo fue construir la secuencia roGFP1-iL_{Golgi}. Para ello, mediante una reacción de PCR y usando dos secuencias complementarias, se amplificó el megaoligo_1 de 117 bp que contiene el péptido señal (dominio transmembrana de la ST3Gal-IV) para dirigir a la proteína sensora al Golgi. Este producto de 117 bp se fusionó, mediante dos reacciones de PCR consecutivas, a una región del promotor P10 que se pierde al realizar la clonación entre los sitios P_{ac}I y XhoI. En la primera reacción se agregó un sitio de restricción para EcoRI entre el promotor P10 y el péptido señal, el producto amplificado de 132 pb (EcoRI_megaoligo_1) se usó en una segunda reacción de PCR para agregar el sitio de restricción P_{ac}I al final de la región del promotor P10, dando como resultado un producto (megaoligo_2) de 169 pb. Este último se fusionó mediante el método de Gibson a la secuencia roGFP1-iL (758 pb), previamente amplificada, dando como producto la secuencia roGFP1-iL_{Golgi} de 903 pb. En la figura 18 se observan los productos de PCR que se fueron obteniendo en cada paso hasta lograr obtener la secuencia de interés roGFP1-iL_{Golgi}.

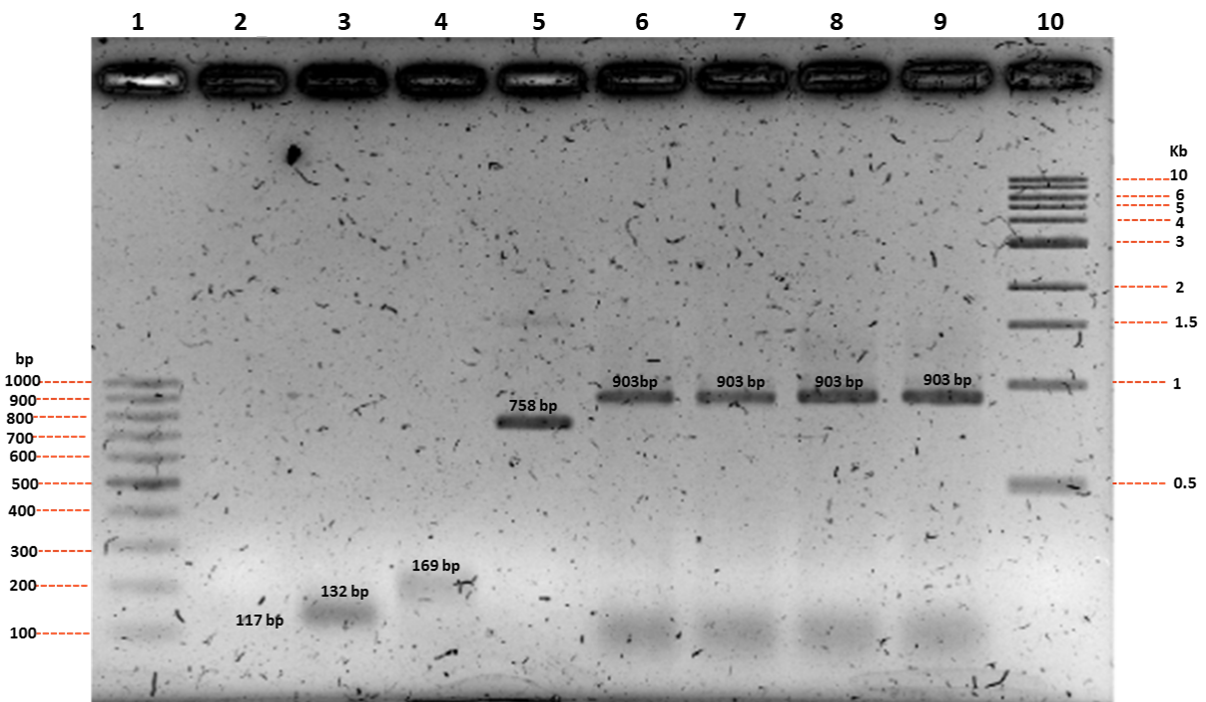


Figura 18: Construcción de la secuencia roGFP1-iL_{Golgi}. En el gel SDS-PAGE al 1 % se muestran los productos de PCR obtenidos en cada etapa de la construcción. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2: megaoligo_1, carril 3: EcoRI_megaoligo_1, carril 4: megaoligo_2, carril 5: roGFP1-iL, carril 6, 7, 8 y 9: roGFP1-iL_{Golgi} (fusión de las secuencias roGFP1-iL y megaoligo_2 mediante el método de Gibson, la secuencia obtenida se amplificó por PCR), carril 10: marcador de peso molecular de 1 kb.

Una vez obtenida la secuencia roGFP1-iL_{Golgi} (903 pb), esta se clonó en el vector pFBGR entre los sitios de restricción XhoI y PacI mediante una reacción de ligación. El producto de la ligación fue usado para transformar bacterias *E. coli* Top10. Se hizo una doble selección de las colonias positivas, la primera usando ampicilina y la segunda usando gentamicina. Se purificó el plásmido de las colonias positivas y se verificó la identidad del plásmido pFBGR_roGFP1-iL_{Golgi} (figura 19) mediante el análisis de su patrón de restricción usando las enzimas EcoRI HF y XhoI. El tamaño esperado de la secuencia liberada como producto de la doble digestión es de 838 pb, dicho tamaño fue observado en dos de las seis colonias evaluadas (10 y 13) tal como se observa en la figura 20. Asimismo, el plásmido linealizado para ambas colonias (10 y 13) se observa a una altura de aproximadamente 7 kb, siendo el tamaño esperado 7279 pb. Los plásmidos de las colonias en mención fueron enviados a secuenciar para confirmar la secuencia correcta de la región del promotor P10, así como de toda la secuencia roGFP1-iL_{Golgi}. Se obtuvo un 100 % de identidad entre la secuencia de interés y la esperada para ambos plásmidos.

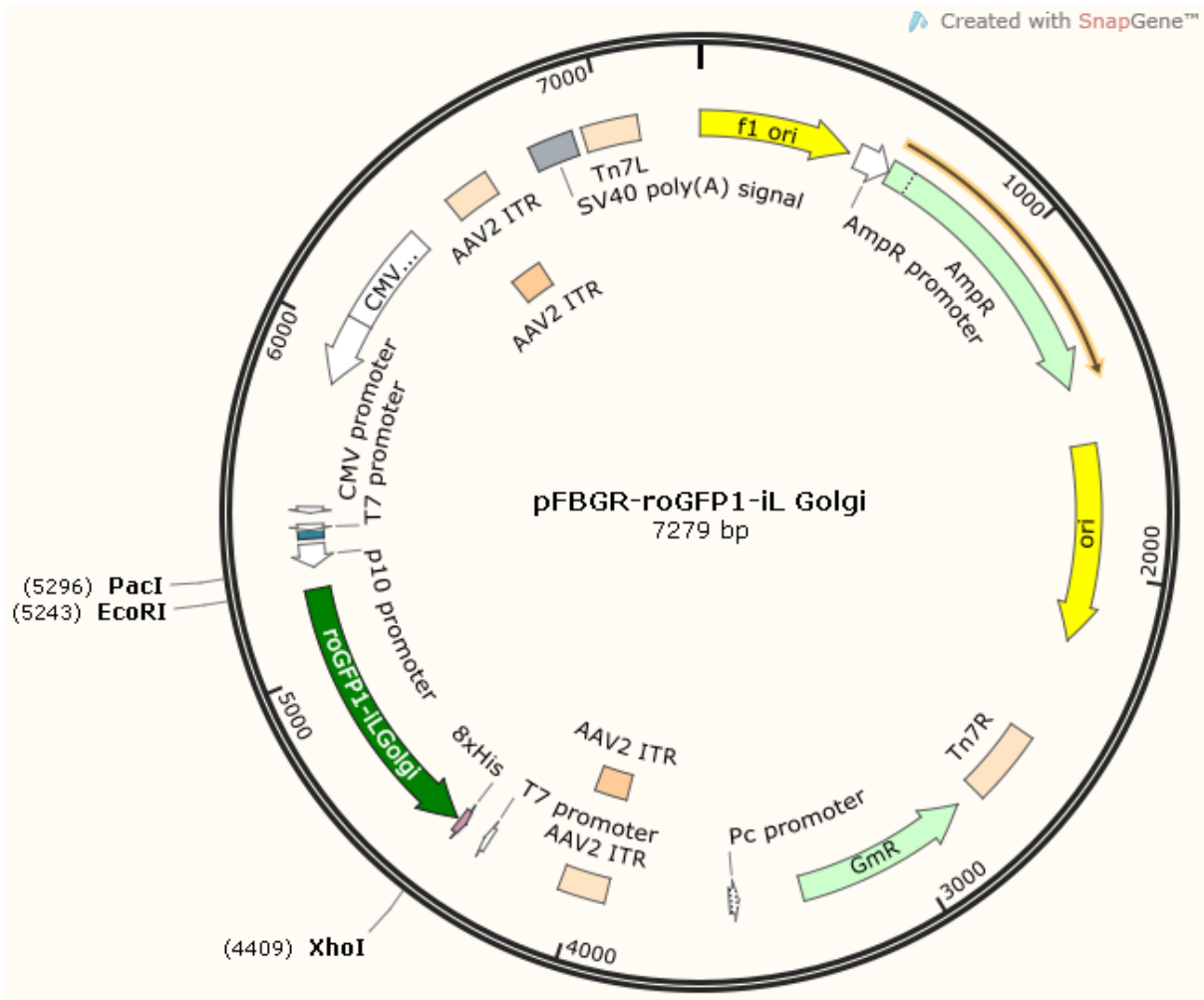


Figura 19: Esquema del mapa del vector pFBGR que contiene a la secuencia roGFP1-iL_{Golgi} flanqueada por los sitios de restricción para las enzimas EcoRI y XhoI. El sitio de corte para EcoRI y la región del promotor P10, que fue eliminada durante la clonación llevada a cabo entre los sitios de corte para PacI y XhoI, se agregaron a la secuencia roGFP1-iL_{Golgi} durante su construcción.

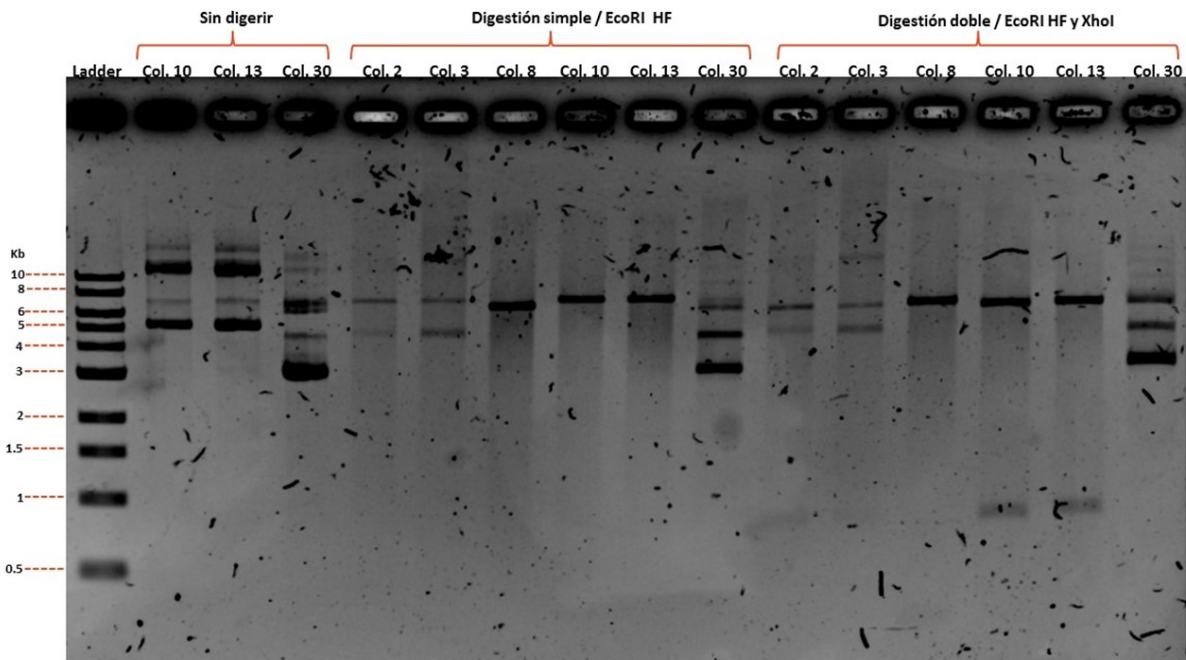


Figura 20: Identificación del plásmido pFBGR-roGFP1-iL_{Golgi}. SDS-PAGE al 1 %. En los plásmidos cortados con la enzima EcoRI, los plásmidos de las colonias 8, 10 y 13 se encuentran linealizados; sin embargo en el caso de las colonias 10 y 13 se observa un tamaño más cerca a lo esperado (7279 pb). En los plásmidos cortados con las enzimas EcoRI y XhoI, solo los plásmidos de las colonias 10 y 13 liberan un fragmento del tamaño esperado (838 pb).

Se transformaron bacterias *E. coli* DH0Bac con el plásmido pFBGR-roGFP1-iL_{Golgi}. Las colonias azules, que crecen en el medio de selección, no contienen el gen de interés; mientras que cuando sucede la recombinación, las colonias son blancas, debido a que el inserto interrumpe la secuencia que codifica para la β -galactosidasa. Mediante PCR usando el par de oligos Frw/Rvr M13 se puede identificar el b́acmido recombinante debido a la presencia del inserto de interés, según se indica en la figura 21. Dada la presencia de productos inespecíficos al usar este par de oligos, el b́acmido recombinante fue identificado con los pares Forward_1_EcoRI/roGFP1_XhoI y FrwM13/Forward_1_EcoRI (figura 21). El primero amplifica una gran parte de la secuencia roGFP1-iL_{Golgi} dando un producto de 866 pb, y el segundo amplifica una secuencia de 2886 pb que comprende desde el extremo *N*-terminal de la roGFP1-iL_{Golgi} hasta la región Tn7R (roGFP1-iL_{Golgi}-Tn7R). En la figura 19 se puede ver la localización de la secuencia Tn7R en el vector pFBGR-roGFP1-iL_{Golgi}. Los resultados de estas PCRs se muestran en la figura 22.

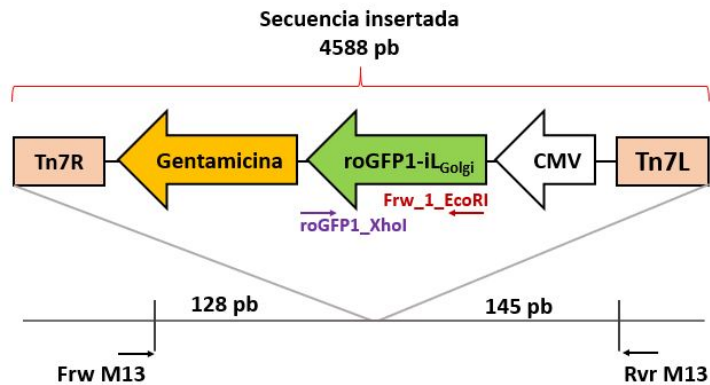


Figura 21: Esquema de la región de recombinación dentro del báculo y los oligos usados para identificar el báculo recombinante. La secuencia insertada contiene a la secuencia que codifica para la proteína roGFP1-iL_{Golgi}.

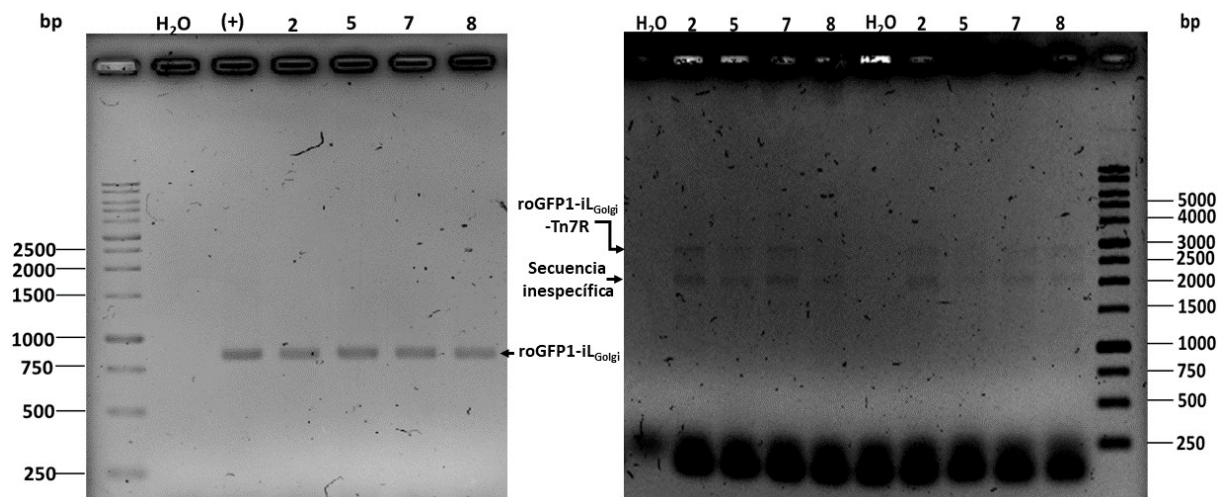


Figura 22: Identificación del báculo recombinante. En el gel de la izquierda se observa el producto amplificado que corresponde a gran parte de la secuencia roGFP1-iL_{Golgi} (tamaño esperado 866 pb). En el gel de la derecha se observa una banda inespecífica a la altura de 2000 pb, y la banda que corresponde a la secuencia roGFP1-iL_{Golgi}-Tn7R (tamaño esperado 2886 pb). Los números sobre cada carril hacen referencia a la colonia evaluada.

Las células de insecto Sf9 se transfectaron con diferentes cantidades del báculo recombinante para la formación del baculovirus roGFP1-iL_{Golgi}. La presencia del baculovirus en el cultivo celular se comprobó indirectamente mediante la detección de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} por Western blot. Este resultado se muestra en la figura 23, en donde la banda a la altura de aproximadamente 30 kDa corresponde a la proteína roGFP1-iL_{Golgi}, cuyo peso molecular esperado es de 30.3 kDa. El baculovirus

roGFP1-iL_{Golgi} se aisló mediante ensayo en placa usando la dilución 10^{-4} , y se amplificó en cultivos de células Sf9, obteniendo títulos entre 1×10^{-9} y 9×10^{-9} ufp/mL para los distintos pases (n° 1 y 2). El baculovirus del pase n° 2 se usó para transducir células CHO-hSEAP, mientras que el pase n° 1 se almacenó como respaldo para volver a amplificar el báculo recombinante de ser necesario.

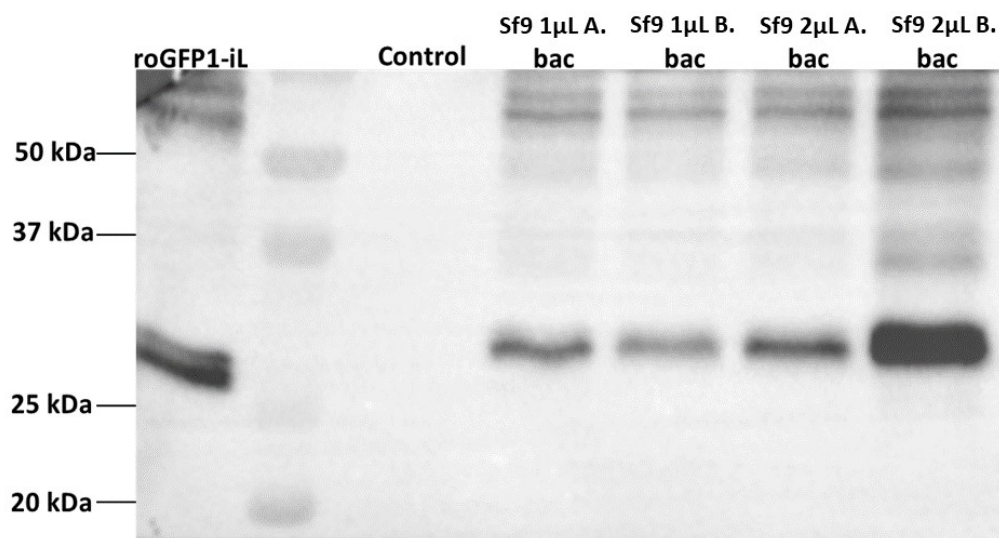


Figura 23: Western blot para la identificación de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} expresada en células Sf9. Carril 1: proteína roGFP1-iL purificada (control positivo), carril 2: marcador de peso molecular, carril 3: células Sf9 sin infectar (control negativo). carril 4, 5, 6 y 7: células Sf9 transfectadas con diferentes cantidades del báculo recombinante. Las lestras A y B hacen referencia a la identificación de los báculos recombinantes usados. Anticuerpo primario: anti-EGFP, anticuerpo secundario: anti-ratón.

6.4. Expresión de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} en células CHO-hSEAP

Las células CHO-hSEAP se transdujeron, con el baculovirus recombinante roGFP1-iL_{Golgi}, usando una MOI de 250 ufp/célula. Luego de la transducción, las células se dejaron crecer en medio suplementado con glutamina 6 mM y butirato 1 mM. El butirato se usó para aumentar el nivel de expresión de la roGFP1-iL_{Golgi} (figura 29 ver anexo) y obtener mejores resultados en el ensayo de colocalización.

Como sabemos, el uso de baculovirus es una excelente alternativa para entregar transgenes en células de mamíferos. La expresión del transgen depende de los mecanismos de regulación de la transcripción de genes, propios de cada línea celular. Por lo tanto, la expresión de la proteína recombinante, además de estar asociada con la entrada del baculovirus a la célula, también se encuentra regulada por mecanismos de regulación epigenética. En el presente trabajo, la secuencia que codifica para la

proteína roGFP1-iL_{Golgi} se encuentra regulada bajo el promotor CMV, que es susceptible al silenciamiento por histonas y por la metilación de citosinas presentes en islas CpG (Brooks et al., 2004). El uso de agentes como el butirato de sodio (1-10 mM) aumentan considerablemente los niveles de expresión de la proteína recombinante debido a su actividad inhibidora de las desacetilasas de histonas (Jeon y Lee, 2007) y a su probable implicancia en la desmetilación del ADN (Cosgrove y Cox, 1990).

6.4.1. Localización de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} en Golgi de células CHO-hSEAP

En las células CHO-hSEAP transducidas se analizó la colocalización de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} y el marcador de Golgi BODIPY TR ceramide, conformado por esfingolípidos unidos al fluoróforo Bodipy TR. El marcador, asociado a BSA libre de ácidos grasos (BSA-BODIPY TR ceramide), se une a la membrana celular y se acumula en mayor cantidad en Golgi, presentando este compartimento una mayor intensidad de fluorescencia con respecto al resto de la célula.

Las imágenes adquiridas para cada campo visual consistieron en una imagen en campo claro, así como también imágenes en diferentes planos focales Z con un incremento de 1 μm para cada canal (verde y rojo). Usando el programa FIJI se compilaron en una sola imagen las imágenes adquiridas en los diferentes planos focales Z, tanto para el canal verde (roGFP1-iL) (figura 24b), como para el canal rojo (BODIPY) (figura 24c). La sobreposición de la señal en ambos canales (figura 24d) permite visualizar de manera cualitativa las regiones en donde ambas señales coinciden, indicándonos la colocalización de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} y el marcador BODIPY TR ceramide. Con la finalidad de visualizar la colocalización de ambas señales (rojo y verde) a lo largo de los planos Z, al lado derecho y en la parte inferior de la (figura 24d) se muestran las proyecciones ortogonales de la imagen. Asimismo, en la figura 25 se muestran algunos de los planos Z para ambos canales, así como su solapamiento.

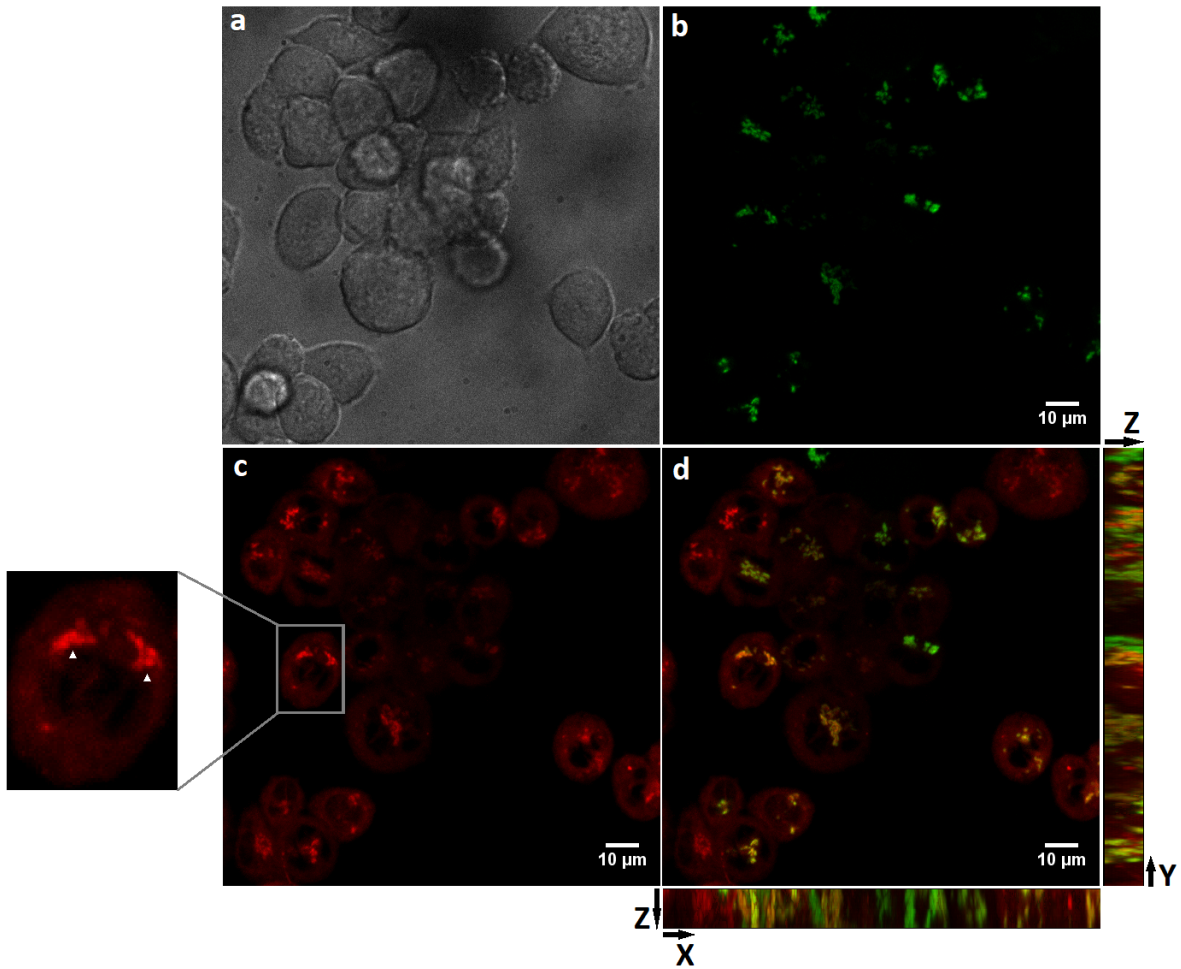


Figura 24: Análisis de colocalización de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} en el Golgi de células CHO-hSEAP. a) Células visualizadas en campo claro. b) Compilación de las imágenes en Z obtenidas para el canal verde (roGFP1-iL_{Golgi}). c) Compilación de las imágenes en Z obtenidas para el canal rojo (BODIPY TR ceramide), las regiones con mayor intensidad de fluorescencia dentro de las células corresponden a Golgi debido a la acumulación del marcador. d) Sobreposición de ambos canales. Se muestran las vistas ortogonales en X y Y que permiten visualizar la sobreposición de las señales en los planos Z. Objetivo 63X.

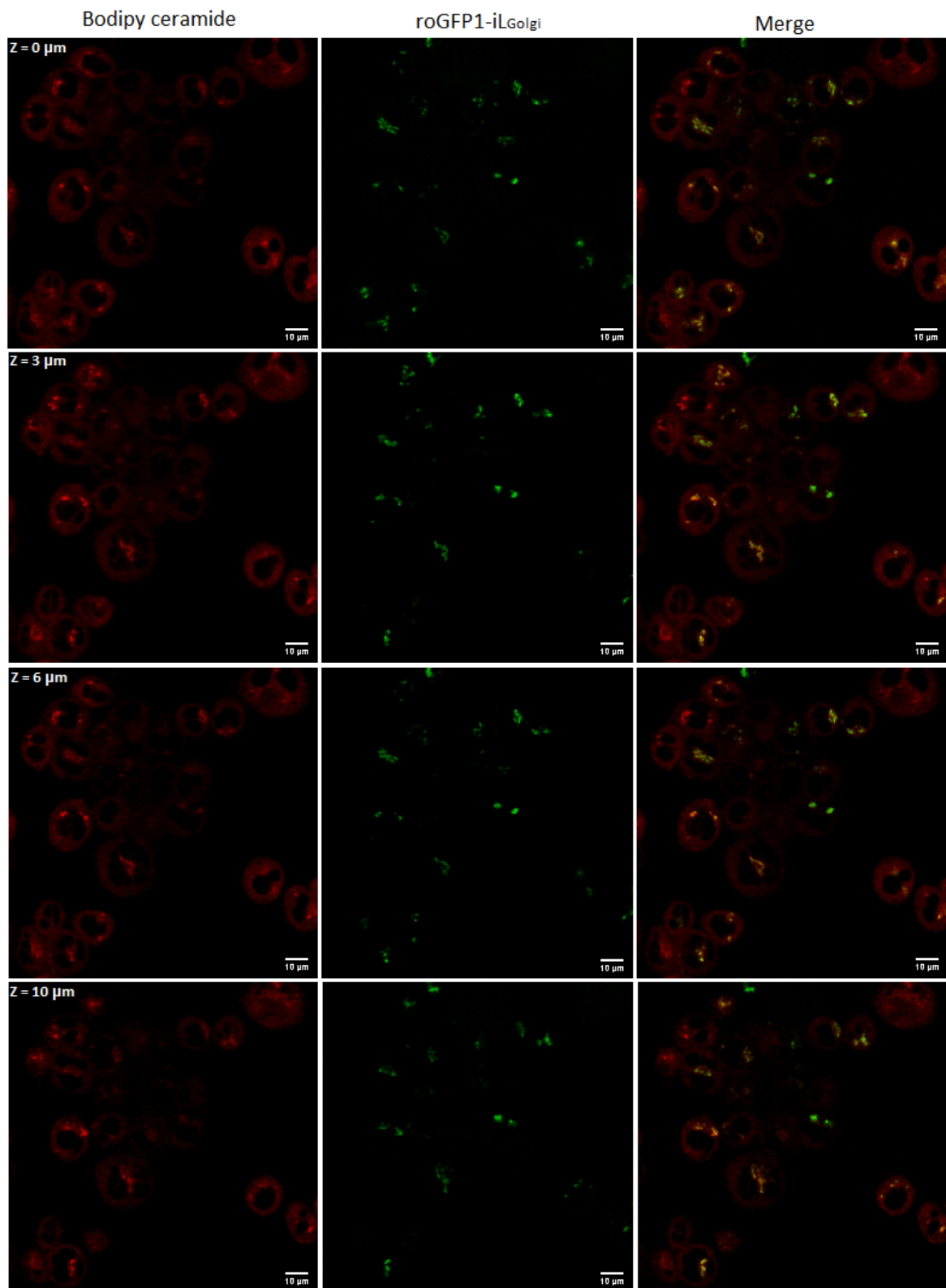


Figura 25: Algunos de los planos Z usados en el análisis presentado en la figura 24.

Este análisis cualitativo de la colocalización, usando como marcador de Golgi el BODIPY TR ceramide, permite confirmar la localización de la proteína roGFP1-iL en Golgi de células CHO-hSEAP.

6.5. Calibración de los sensores de oxígeno PreSens

Los porcentajes de oxígeno dentro de los frascos de cultivos celular fueron medidos con los sensores de oxígeno PreSens, los cuales fueron calibrados con aire atmosférico y nitrógeno para configurar la medición al 100 y 0 % O₂AirSat, respectivamente. Los valores de calibración obtenidos para cada sensor se muestran en el cuadro 7. Los cuatro sensores reportaron mediciones de oxígeno similares dentro de la incubadora de cultivo celular, dando un promedio de 89.1 ± 1.5 % O₂AirSat. Este valor coincide con el esperado teóricamente (88.8 %) al considerar dentro de la incubadora una temperatura de 37 °C, 5 % de CO₂ y 100 % de humedad. Asimismo, se obtuvo un promedio de 3.7 ± 0.4 % O₂AirSat para la condición de hipoxia (N₂ 1320 mL/min, O₂ 11 mL/min y CO₂ 70 mL/min), en donde el porcentaje de oxígeno en la mezcla de gases usada es de 0.79 %, que corresponde al 3.52 % O₂AirSat al considerar un 100 % de humedad. Estos resultados permiten darle veracidad a las mediciones de oxígeno y asegurar que la medición obtenida sea la misma sin importar cuál de los cuatro sensores se esté usando.

Cuadro 7: Valores de calibración para los sensores de oxígeno PreSens.

	100 % aire atmosférico	100 % nitrógeno
Sensor n°1	26.02	56.94
Sensor n°2	26.40	56.68
Sensor n°3	26.40	56.40
Sensor n°4	26.15	56.47

Los valores de calibración se obtuvieron en el programa PST3v602 y son colocados en dicho programa (de acuerdo al sensor usado) previamente a la medición de oxígeno.

6.6. Medición del potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP cultivadas en condiciones normales de oxígeno e hipoxia

6.6.1. Transducción de las células CHO-hSEAP con el baculovirus roGFP1-iL_{Golgi}

Las células CHO-hSEAP fueron sembradas el día anterior de la transducción a una densidad de 8×10^4 células/cm² en un frasco de 25 cm² de superficie. La transducción con el baculovirus roGFP1-iL_{Golgi} se

realizó usando 500 ufp/célula, considerando un total de 2×10^6 células. Se usó una MOI=500 ufp/célula, ya que el nivel de expresión de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} era mucho mayor a la que se obtenía al usar una MOI=100 ufp/célula y muy similar al usar una MOI=1000 ufp/célula (figura 29 ver anexo).

Se buscó en la bibliografía qué tanto puede afectar la presencia del baculovirus en las células de mamíferos. Poco se sabe del cambio a nivel molecular en las células de mamíferos tras la entrada del baculovirus, así como también de la expresión de genes virales dentro de las células en mención. Kenoutis et al. (2006) reportaron una baja expresión de algunos genes virales tempranos de Bombyx mori NPV (BmNPV) en células HEK293 a las 24 horas postransducción, adicionalmente encontraron que no había diferencias apreciables en los niveles de expresión genéticos de dichas células tras su transducción con una MOI=500 ufp/célula. Por otro lado, cultivos primarios de hepatocitos transducidos con el baculovirus AcNPV (*Autographa californica nucleopoliedrovirus*) (MOIs=100 y 200) no presentaron alteraciones en los niveles de cAMP, considerado segundo mensajero en las vías de señalización, ni variaciones en la actividad de la enzima PKA que es importante en las vías metabólicas (Beck et al., 2000). Basados en esta información, no existe evidencia previa que indique que el usar una MOI=500 ufp/células para transducir las células CHO-hSEAP influiría de manera significativa el potencial redox intracelular.

6.6.2. Cultivos de células CHO-hSEAP en condiciones normales de oxígeno y condiciones de hipoxia

Luego de la transducción, todos los cultivos celulares se colocaron en la incubadora a 37 °C, que contiene además de aire atmosférico, 5 % de CO₂ y humedad.

Para medir el potencial redox de Golgi en condiciones normales de oxígeno, los cultivos celulares (con y sin tratamiento de butirato) se mantuvieron hasta las 48 h postransducción en la incubadora a 37 °C. El O₂AirSat obtenido en los frascos de cultivo bajo estas condiciones, usando el sensor PreSens, fue en promedio de 89.1 ± 1.5 % O₂AirSat.

Para medir el potencial redox de Golgi en hipoxia, los cultivos celulares se colocaron en condiciones de hipoxia desde las 24 hasta las 48 h postransducción. Para ello se usó como referencia la metodología reportada por (Bakmiwewa et al., 2015), la cual se modificó con base en las herramientas disponibles en nuestro laboratorio. Los cultivos celulares se colocaron dentro de la bolsa para empacado al vacío y se realizó el recambio de aire atmosférico por la mezcla de gases que contiene un 0.79 % de O₂ (figura 26a). A través del sensor de oxígeno colocado dentro del frasco de cultivo (figura 26b) se monitoreó, dentro de la incubadora a 37 °C, el % O₂AirSat al inicio y al final del tratamiento de hipoxia (cuadro 8).

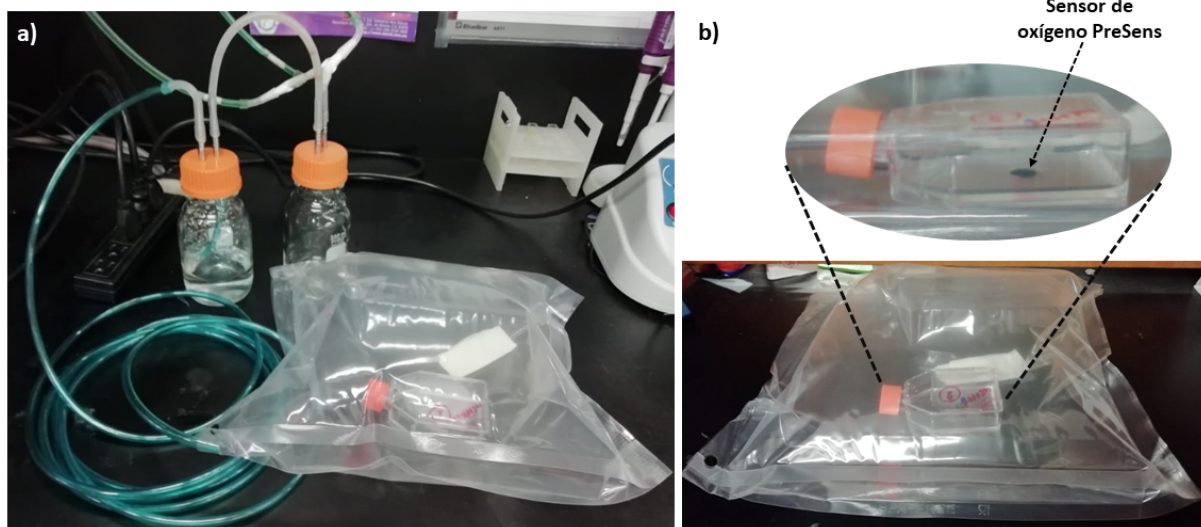


Figura 26: Sistema de cámara de hipoxia para cultivo celular. a) Recambio del aire atmosférico dentro de la cámara de hipoxia por la mezcla de gases que contiene un 0.79 % de O₂. b) Sensor de oxígeno PreSens dentro del frasco de cultivo. La cara del sensor que interacciona con las moléculas de oxígeno se encuentra expuesta a fase gaseosa dentro del frasco de cultivo.

Cuadro 8: % O₂AirSat en los cultivos bajo condiciones de hipoxia.

	% O ₂ AirSat al inicio de la hipoxia (24 h postransducción)	% O ₂ AirSat al final de la hipoxia (48 h postransducción)
Replica n°1	3.45	3.41
Replica n°2	4.83	4.09
Replica n°3	3.17	3.49

6.6.3. Cálculo del oxígeno presente en la fase líquida de los cultivos de células CHO-hSEAP en condiciones normales de oxígeno y de hipoxia

Se calculó la concentración de oxígeno en el medio de cultivo (C_L), a las 48 h postransducción, usando la ley de Fick. Se asumió que el flujo de oxígeno a través del medio era igual a la velocidad de consumo de oxígeno (VCO); al despejar la C_L se obtiene la siguiente ecuación.

$$C_L = C'_L - h.VCO/D$$

en donde:

C'_L = concentración de oxígeno en la superficie de la fase líquida (mol/L). Calculado a partir de la ley de Henry.

D = constante de difusión de oxígeno (cm²/s)

h = la profundidad del medio de cultivo (cm)

Para calcular la C_L en condiciones normales de oxígeno, primero se determinó la C'_L a partir de la ley de Henry. Para ello se usó la constante de Henry igual a 771.65 mmHg/mM (Place et al., 2017) y la presión parcial de oxígeno (pO_2) igual a 113 mmHg, esta última calculada a partir del % O₂ AirSat (medido con el sensor de oxígeno PreSens) y considerando la presión atmosférica igual a 608 mmHg. Debido a que en todos los cultivos se obtuvo en promedio 89.1 % O₂ AirSat, el valor de la pO_2 fue el mismo en dichos cultivos, así como también el valor de la C'_L . La VCO se determinó a partir de la densidad celular y la tasa específica de consumo de oxígeno (qO_2). Para calcular la densidad celular se contó el número de células en cada cultivo, previamente a la medición del potencial redox (48 h postransducción), y se consideró el área superficial del frasco de cultivo igual 25 cm². La qO_2 para las células CHO se consideró igual a 3.8×10^7 moléculas de O₂ célula⁻¹ s⁻¹ (Lai et al., 1982) equivalente a 6.3×10^{-17} mol célula⁻¹ s⁻¹. D = 2.84×10^{-5} cm²/s (Place et al., 2017) y h = 2 mm. Con esta información se calculó el valor de la C_L y a partir de esta se estimó el OD, considerando que el 100 % de OD = 165 μM. En el cuadro 9 se muestran los valores de las variables obtenidas para el cálculo de la C_L , así como también los valores de C_L y OD calculados para cada una de las réplicas.

Cuadro 9: Cálculo del oxígeno disuelto en el medio de cultivo de CHO-hSEAP cultivadas en condiciones normales de oxígeno.

	pO_2 (mmHg)	C'_L (μM)	Densidad celular (10^5 células/cm ²)	VCO (mol/cm ² .s)	C_L (μM)	OD (%)
			2.30	1.45E-11	45	27
			2.40	1.51E-11	40	24
sin but.	113	147	1.81	1.14E-11	67	40
			2.50	1.57E-11	36	22
			1.96	1.23E-11	60	36
OD promedio ± DS						30 ± 8
			0.72	4.54E-12	115	70

	pO ₂ (mmHg)	C' _L (μM)	Densidad celular (10 ⁵ células/cm ²)	VCO (mol/cm ² .s)	C _L (μM)	OD (%)
con but.	113	147	0.90	5.64E-12	107	65
			1.38	8.72E-12	85	52
OD promedio ± DS						62 ± 9

La tensión de oxígeno disuelto calculada para los cultivos de CHO-hSEAP en condiciones normales de oxígeno sin tratamiento de butirato (condiciones normales) fue de 30 ± 8 % de OD, mientras que para los cultivos en condiciones normales de oxígeno con tratamiento de butirato dicho valor fue de 62 ± 9 % de OD. Por lo que podemos decir que estos cultivos se encontraban en condiciones de normoxia (10-100 % de OD).

Para determinar la C_L en condiciones de hipoxia, se usaron los valores ya mencionados para la presión atmosférica, la constante de Henry, la constante de difusión de oxígeno, y la profundidad del medio. La pO₂ se calculó a partir de los % O₂AirSat reportados en el cuadro 8 (48 h postransducción). La qO₂ se consideró igual al 10 % de la qO₂ usada en condiciones normales, teniendo en cuenta que Lin y Miller (1992) reportaron la disminución de la qO₂ de células CHO, en un 80 y 99% en condiciones de hipoxia severa (0.2 % de OD) y anoxia (0 % de OD) respectivamente. En el cuadro 10 se muestran los valores de C_L y OD, obtenidos para dos de las tres réplicas, además de los valores de las variables usadas.

Cuadro 10: Determinación del oxígeno disuelto en el medio de cultivo de CHO-hSEAP, cultivadas en condiciones de hipoxia.

% O ₂ AirSat	pO ₂ (mmHg)	C' _L (μM)	Densidad celular (10 ⁵ células/cm ²)	VCO (mol/cm ² .s)	C _L (μM)	OD (%)
3.41	4.33	5.61	0.93	5.85E-14	1.5	1
4.09	5.19	6.73	1.10	6.90E-14	1.9	1

La tensión de oxígeno disuelto, calculado para los medios de cultivo de CHO-hSEAP, en condiciones de hipoxia es de 1 % de OD. Este valor podría estar sub o sobreestimado, debido a que la qO₂ podría ser mayor o menor a la que se usó. A pesar de ello, esta aproximación del % de OD, nos permite confirmar

el estado de hipoxia de los cultivos celulares.

6.6.4. Tratamiento de células CHO-hSEAP con *N*-etilmaleimida

A las 48 h postransducción, las células cultivadas en condiciones normales de oxígeno y en condiciones de hipoxia fueron cosechadas para realizar las mediciones de los espectros de excitación de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} y a partir de estos calcular el potencial redox de Golgi. Para evitar variaciones del potencial redox de Golgi causadas durante el procesamiento de la muestra, las células fueron tratadas con *N*-etilmaleimida (NEM).

La *N*-etilmaleimida reacciona con los grupos tioles o también llamados sulfhidrilos para formar uniones tioeter relativamente estables a través del tiempo. Este reactivo es usado en estudios sobre potencial redox intracelular (Birk et al., 2013; Gutscher et al., 2008; Lith et al., 2011; Sarkar et al., 2013), ya que su rápida difusión a través de las membranas permite preservar el estado redox de todo el sistema dentro de la célula (Hatori et al., 2020), incluyendo el de la proteína sensora. En el presente proyecto, las células cultivadas en los frascos T25 fueron tripsinizadas, centrifugadas, contadas y colocadas en igual número en pozos de placas de 96 pozos para realizar las mediciones de los espectros de excitación de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} en el Synergy H1. Todo este proceso o manipulación de las células podría estar alterando el estado redox intracelular, lo que resultaría en potenciales redox de Golgi no tan confiables. Se observa en el tiempo 0 de la figura 27 que la razón entre las intensidades de fluorescencia en los máximos picos de excitación de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} ($I_{400\text{nm}}/I_{460\text{nm}}$) de las células sin tratar con NEM son mayores a las tratadas con NEM; lo cual estaría indicando una mayor oxidación de la proteína sensora en las células sin tratar con NEM. Es decir, las células tratadas con NEM antes de su cosecha tienen todos sus grupos sulfhidrilos, incluidos los de la proteína sensora roGFP1-iL_{Golgi}, unidos al NEM, de tal manera que estos no estarían siendo oxidados durante la cosecha. Asimismo, se observa la estabilidad de la unión del NEM con los grupos sulfhidrilos a través del tiempo, impidiendo la reducción de la proteína sensora y manteniendo la razón $I_{400\text{nm}}/I_{460\text{nm}}$. Este experimento se realizó una sola vez para poder comprobar la utilidad del reactivo en la medición del potencial redox; sin embargo para poder tener una mayor información acerca de las diferencias observadas, sería necesario hacer repeticiones de este experimento.

Estado redox de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} a través del tiempo en células CHO-hSEAP tratadas con o sin NEM

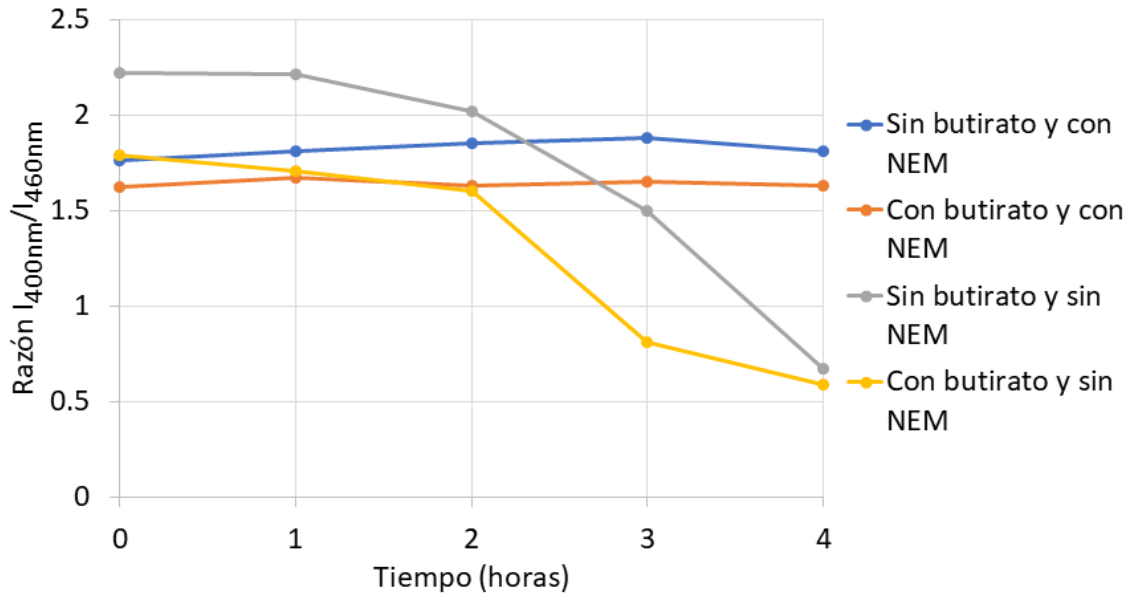


Figura 27: Efecto del NEM en el estado de oxidación de la proteína roGFP1-iL_{Golgi}. Las células CHO-hSEAP que expresan a la proteína roGFP1-iL_{Golgi} fueron cultivadas bajo condiciones normales de oxígeno (con o sin butirato) y tratadas con o sin NEM antes de ser cosechadas. La razón I_{400nm}/I_{460nm} refleja el estado redox de la proteína roGFP1-iL_{Golgi}. En el punto 6.2.2 se calculó el valor de la razón I_{400nm}/I_{460nm} para la proteína roGFP1-iL completamente oxidada (2.61) y completamente reducida (0.388).

6.6.5. Potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP

El potencial redox de Golgi fue determinado mediante la ecuación de Nernst a partir del grado de oxidación de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} expresada en las células CHO-hSEAP. Para determinar el grado de oxidación de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} se usó la ecuación:

$$OxD_{roGFP1-iL_{Golgi}} = \frac{R - R_{red}}{\frac{I_{460_{ox}}}{I_{460_{red}}}(R_{ox} - R) + (R - R_{red})}$$

Los parámetros R_{ox} , R_{red} y $I_{460_{ox}}/I_{460_{red}}$ fueron determinados previamente para la proteína roGFP1-iL en el equipo Synergy H1. El cálculo detallado de estos se muestra en el cuadro 6. De forma resumida los valores son los siguientes:

$$R_{ox} = 2.61$$

$$R_{red} = 0.388$$

$$I460_{ox}/I460_{red} = 0.585$$

Una vez obtenido el grado de oxidación de la proteína roGFP1-iL_{Golgi}, se determinó su potencial redox mediante la ecuación de Nernst:

$$E_{roGFP1-iL_{Golgi}} = E'_{roGFP1-iL} - \frac{RT}{2F} \ln\left(\frac{1 - OxD_{roGFP1-iL_{Golgi}}}{OxD_{roGFP1-iL_{Golgi}}}\right)$$

En donde $E'_{roGFP1-iL}$ es el potencial medio de referencia para la roGFP1-iL y tiene un valor de -229 mV que fue determinado por Lohman y Remington (2008). R es la constante universal de los gases (1.987 cal.K⁻¹.mol⁻¹), T es la temperatura en grados Kelvin (310.15 °K) y F es la constante de Faraday (23.06 cal.mV⁻¹.mol⁻¹).

Dado que el glutatión se encuentra en equilibrio con la proteína roGFP1-iL_{Golgi}; el $E_{roGFP1-iL_{Golgi}} = E_{GSH}$. Por lo tanto, el potencial redox de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} será igual al potencial redox de Golgi.

El promedio ± DS del grado de oxidación de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} ($OxD_{roGFP1-iL_{Golgi}}$) y del potencial redox de Golgi (E°_{Golgi}) obtenidos para cada una de las condiciones en estudio (condiciones normales, tratamiento con butirato y condiciones de hipoxia) se muestran en el cuadro 11, mientras que en la figura 28 se muestran los valores del potencial redox de Golgi obtenidos para cada réplica.

Cuadro 11: Potencial redox de Golgi promedio en cada condición estudiada.

	$OxD_{roGFP1-iL_{Golgi}}$	E°_{Golgi} (mV)
Condiciones normales	77 ± 2	-213 ± 2
Tratamiento con butirato	66 ± 4	-220 ± 2
Condición de hipoxia	48 ± 6	-230 ± 3

Potencial redox de Golgi de CHO-hSEAP en diferentes condiciones

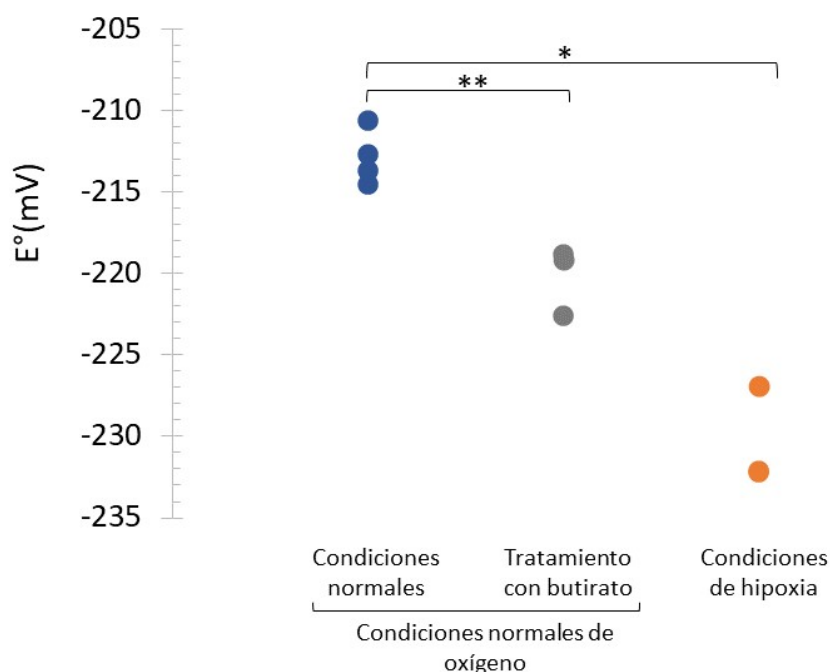


Figura 28: Potencial redox de Golgi en CHO-hSEAP. Las mediciones se hicieron a las 48 h postransducción para todas las condiciones. La condición de hipoxia fue colocada a las 24 h postransducción y tuvo un tiempo de duración de 24 h. Cada condición fue llevada a cabo por triplicado, excepto la condición normal (n=4), $p < 0.001^*$, $p < 0.01^{**}$. Las células fueron tratadas con NEM antes de ser cosechadas para las mediciones. Se usó el análisis estadístico t-Student.

El potencial redox de Golgi a condiciones normales que obtuvimos fue igual a -213 ± 2 mV (cuadro 11). Este valor, como se esperaba de acuerdo con los estudios realizados por Hassinen et al. (2019) y Hatori et al. (2020), es más oxidante al reportado para retículo endoplasmático, cuyo valor es de -230 mV en células CHO (Kolossoff et al., 2012), -231 mV en fibroblastos (Lith et al., 2011) y -241 mV en *P. pastoris* (Delic et al., 2012). Hassinen et al. (2019), Hatori et al. (2020) y Zúñiga (2017) observaron que la proteína sensora de redox roGFP2, en su estado basal, se encontraba completamente oxidada en Golgi; dado que las mediciones se obtienen entre el 5 y 95% de la proteína oxidada, solamente se podía describir el potencial redox de Golgi como cercano a -240 mV, considerando que el rango de medición para la roGFP2 va desde -320 hasta -240 mV (Meyer y Dick, 2010). Debido a que el uso de la proteína roGFP2 restringe el estudio de potenciales redox oxidantes y sus variaciones con respecto

al estado basal, el uso de la proteína roGFP1-iL permite superar estos inconvenientes, motivo por el cual decidimos usarla en este proyecto. Como se observa en el cuadro 11, obtuvimos en promedio un 77 % de oxidación de la proteína roGFP1-iL_{Golgi} en su estado basal, al no estar completamente oxidada ni reducida, nos permite estudiar la respuesta del potencial redox de Golgi frente a diferentes estímulos.

En Golgi se realiza la modificación postraduccional de las proteínas recién sintetizadas y plegadas en el retículo endoplasmático. El ambiente oxidante de Golgi es necesario para conservar el correcto plegamiento de la proteína transportada, pero además permitiría asegurar la adecuada actividad de las proteínas implicadas en las modificaciones postraduccionales como la *N*-glicosilación (Hassinen et al., 2019; Zúñiga, 2017). El ambiente oxidante de Golgi puede ser reflejo de una baja concentración de GSH, una mayor cantidad de GSH asociado a proteínas, o una mayor actividad de enzimas como las glutarredoxinas que utilizan como cofactor el glutatión. En el retículo endoplasmático encontramos proteínas como la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y la peroxidoredoxina IV que están implicadas en el mantenimiento redox intracelular, la primera encargada de la formación de puentes disulfuro y la segunda en el metabolismo del H₂O₂ (Ahsan et al., 2009). Además, se ha visto que la sobreexpresión de la PDI en una cepa silvestre de *P. pastoris*, aumenta el grado de oxidación del retículo endoplasmático sin un aumento en la producción de EROs (Delic et al., 2012). En el caso de Golgi, hay pocas proteínas descritas que están implicadas en la regulación redox, entre ellas la proteína quiescín sulfhidril oxidasa 1 (QSXOX1), que participa en la formación de puentes disulfuros (Attacha et al., 2017), y las glutarredoxinas Grx6 y Grx7 que se encargan de su reducción. Es importante tener en cuenta que las regiones de Golgi (cis, medio, trans) tienen distintos pHs, que van desde 6.7 hasta 6. El potencial redox de referencia para el par GSH/GSSG a pH 7.4 es de -264 mV, mientras que a pH 6 este valor es de -179 mV, volviéndose menos reductor (más oxidante) a pHs menores (Schafer y Buettner, 2001). Por tanto, el pH podría también estar influenciando el potencial oxidante de Golgi.

En las células tratadas con butirato, el potencial redox de Golgi fue igual a -220 ± 2 mV, que corresponde en promedio a un 66 % de oxidación de la proteína, dando como resultado un potencial redox de Golgi menos oxidante (más reductor) al obtenido para las condiciones normales. Ha sido reportado que el butirato de sodio (5 mM) causa una disminución en la cantidad de GSH dentro de la célula, provocando un aumento de 59 mV en el potencial redox intracelular (volviéndolo más oxidante) a las 48 horas de tratamiento (Kirlin et al., 1999); sin embargo, este resultado a nivel global celular no refleja el ambiente real dentro de los compartimentos celulares como Golgi que cuentan con mecanismos propios de regulación. Se ha visto que el butirato, empleado para aumentar los niveles de expresión de una proteína recombinante, induce estrés en el retículo endoplasmático, desencadenando el mecanismo de respuesta a proteínas desplegadas (UPR, por sus siglas en inglés) (Zhang et al., 2016). Este mecanismo está relacionado con la disminución del potencial redox del retículo endoplasmático en una cepa de *P. pastoris* que produce una proteína recombinante secretada (más de una copia del gen), con respecto a la cepa silvestre (Delic et al., 2012). Cuando la síntesis de proteínas secretadas o de

membrana aumenta, sobrepasando la capacidad de Golgi para su modificación o transporte, genera un estrés que es contrarrestado con la activación de mecanismos de homeóstasis (Sasaki y Yoshida, 2019). De lo mencionado, podríamos hipotetizar que la reducción del potencial redox de Golgi que observamos ante el tratamiento con butirato podría ser parte de una respuesta de Golgi frente al estrés provocado por el aumento de la producción de la proteína recombinante roGP1-iL_{Golgi}. Cabe mencionar que esta información también sugiere hacer un análisis del potencial redox de Golgi en células CHO (cultivadas bajo condiciones normales) que no producen la hSEAP, con la finalidad de comprobar si podría haber algún efecto de la producción de dicha proteína recombinante sobre el potencial redox.

En las células cultivadas bajo condiciones de hipoxia, el potencial redox de Golgi fue de -230 ± 3 mV, que corresponde en promedio a un 48 % de oxidación de la proteína. Este resultado concuerda con lo reportado por Hassinen et al. (2019), quien observó una reducción del potencial redox tanto de Golgi como del retículo endoplasmático en células COS-7 cultivadas a bajas cantidades de oxígeno (5 % O₂). Se sabe que bajo condiciones de hipoxia hay un aumento de la producción de EROs en la cadena transportadora de electrones (Duranteau et al., 1998; Semenza, 2009). Waypa et al. (2010) reportaron el aumento del potencial redox citoplasmático en células cultivadas bajo condiciones limitantes de oxígeno (1.5 % O₂) e identificaron que la causa era el aumento en los niveles de H₂O₂ que difunde a través de la membrana mitocondrial y llega al citoplasma. Para combatir el daño generado por el H₂O₂ el citoplasma tiene enzimas como la glutatión peroxidasa que se encarga de su eliminación, usando para ello el GSH y generando GSSG. Nuestros resultados muestran un ambiente de Golgi más reductor (menos oxidante) como respuesta a las condiciones de hipoxia, esta respuesta podría estar relacionada con una exportación de GSSG al citoplasma o con el aumento del glutatión disponible a partir de proteínas tioles o proteínas glutatíoladas.

No hay suficiente información que nos permita explicar el potencial redox muy oxidante de Golgi, así como la reducción del potencial frente a las condiciones de estrés estudiadas, sin embargo es importante continuar con estudios que nos ayuden a comprender los mecanismos moleculares implicados en ello.

7. CONCLUSIONES

El potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP cultivadas en condiciones normales fue igual a -213 ± 2 mV. Para nuestro conocimiento, este es el primer reporte del valor del potencial redox para este organelo, siendo este más oxidante al reportado para el retículo endoplasmático por otros autores.

El butirato, reactivo muy usado en la industria e investigación para mejorar la producción de proteínas recombinantes, causó una reducción del potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP. Aunque se desconoce el mecanismo molecular de dicha respuesta, está sería provocada por un aumento en la producción de la proteína roGFP1-iL_{Golgi}.

Bajo condiciones de hipoxia, hubo una disminución del potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP. Este potencial redox fue más reductor al obtenido con el tratamiento de butirato.

Estudios previos ya habían reportado un potencial redox de Golgi más oxidante al del retículo endoplasmático (-231 mV), sin embargo ninguno de aquellos estudios había reportado su valor, principalmente por limitaciones de la proteína sensora que se usaba. En el presente trabajo, el uso de la proteína sensora roGFP1-iL, cuyo rango de potencial redox va desde -265 hasta -195 mV, permitió determinar el potencial redox de Golgi, así como su disminución en condiciones de hipoxia y en tratamiento con butirato. Esta información permite ampliar el conocimiento acerca de Golgi y su respuesta de frente a condiciones de estrés. Asimismo, se requieren estudios adicionales sobre los mecanismos de regulación del potencial redox de Golgi, para poder comprender los resultados obtenidos.

8. PERSPECTIVAS

En el presente proyecto se determinó el potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP, dado estudios previos que indican la influencia de la producción de proteínas recombinantes secretadas sobre el potencial redox del retículo endoplasmático, resultaría interesante evaluar el potencial redox de Golgi en células CHO que no expresan la proteína hSEAP.

Las mediciones del potencial redox de Golgi en condiciones de hipoxia, se hicieron después de mantener a las células CHO-hSEAP en las cámaras de hipoxia durante 24 h. Sería interesante poder evaluar el potencial redox de Golgi en condiciones de hipoxia desde las 0 h hasta las 48 o 72 h. Esto nos permitiría saber que tan rápida es la respuesta de Golgi frente a la falta de oxígeno y en qué momento está respuesta se vuelve estable.

Se planteó como objetivo evaluar el efecto de la hipoxia en el potencial redox de Golgi, para explicar cambios en el patrón de *N*-glicosilación que han sido reportados por otros autores a OD limitante. Dada la implicancia que hemos encontrado de las condiciones de hipoxia sobre el potencial redox de Golgi de células CHO-hSEAP, se espera poder llevar a cabo los análisis del patrón de *N*-glicosilación bajo dichas condiciones.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahsan, Md Kaimul, Lekli, Istvan, Ray, Diptarka, Yodoi, Junji, y Das, Dipak K. (2009). Redox Regulation of Cell Survival by the Thioredoxin Superfamily: An Implication of Redox Gene Therapy in the Heart. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(11), 2741-2758. doi:10.1089/ars.2009.2683
- Al-Ani, Abdullah, Toms, Derek, Kondro, Douglas, Thundathil, Jarin, Yu, Yang, y Ungrin, Mark. (2018). Oxygenation in cell culture: Critical parameters for reproducibility are routinely not reported. *PLOS ONE*, 13(10), e0204269. doi:10.1371/journal.pone.0204269
- Attacha, Safira, Solbach, David, Bela, Krisztina, Moseler, Anna, Wagner, Stephan, Schwarzländer, Markus, ... Meyer, Andreas J. (2017). Glutathione peroxidase-like enzymes cover five distinct cell compartments and membrane surfaces in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, 40(8), 1281-1295. doi:10.1111/pce.12919
- Bakmiwewa, Supun M., Heng, Benjamin, Guillemin, Gilles J., Ball, Helen J., y Hunt, Nicholas H. (2015). An effective, low-cost method for achieving and maintaining hypoxia during cell culture studies. *BioTechniques*, 59(4), 223-229. doi:10.2144/000114341
- Beck, NB, Sidhu, JS, y Omiecinski, CJ. (2000). Baculovirus vectors repress phenobarbital-mediated gene induction and stimulate cytokine expression in primary cultures of rat hepatocytes. *Gene Therapy*, 7(15), 1274-1283. doi:10.1038/sj.gt.3301246
- Birk, J., Meyer, M., Aller, I., Hansen, H. G., Odermatt, A., Dick, T. P., ... Appenzeller-Herzog, C. (2013). Endoplasmic reticulum: reduced and oxidized glutathione revisited. *Journal of Cell Science*, 126(7), 1604-1617. doi:10.1242/jcs.117218
- Brooks, Alan R., Harkins, Richard N., Wang, Peiyin, Qian, Hu Sheng, Liu, Pengxuan, y Rubanyi, Gabor M. (2004). Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *The Journal of Gene Medicine*, 6(4), 395-404. doi:10.1002/jgm.516
- Circu, Magdalena L., y Aw, Tak Yee. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(6), 749-762. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022
- Cosgrove, Dominic E., y Cox, G. Stanley. (1990). Effects of sodium butyrate and 5-azacytidine on DNA methylation in human tumor cell lines: Variable response to drug treatment and withdrawal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1087(1), 80-86. doi:10.1016/0167-4781(90)90124-K
- Delic, Marizela, Rebnegger, Corinna, Wanka, Franziska, Puxbaum, Verena, Haberhauer-Troyer, Christina, Hann, Stephan, ... Gasser, Brigitte. (2012). Oxidative protein folding and unfolded protein response elicit differing redox regulation in endoplasmic reticulum and cytosol of yeast. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(9), 2000-2012. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.048

-
- Dooley, Colette T., Dore, Timothy M., Hanson, George T., Jackson, W. Coyt, Remington, S. James, y Tsien, Roger Y. (2004). Imaging Dynamic Redox Changes in Mammalian Cells with Green Fluorescent Protein Indicators. *Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 22284-22293. doi:10.1074/jbc.M312847200
- Duranteau, Jacques, Chandel, Navdeep S., Kulisz, Andre, Shao, Zuohui, y Schumacker, Paul T. (1998). Intracellular Signaling by Reactive Oxygen Species during Hypoxia in Cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(19), 11619-11624. doi:10.1074/jbc.273.19.11619
- Filomeni, Giuseppe, Rotilio, Giuseppe, y Ciriolo, Maria Rosa. (2002). Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochemical Pharmacology*, 64(5-6), 1057-1064. doi:10.1016/S0006-2952(02)01176-0
- Goochee, Charles F., Gramer, Michael J., Andersen, Dana C., Bahr, Jennifer B., y Rasmussen, James R. (1991). The Oligosaccharides of Glycoproteins: Bioprocess Factors Affecting Oligosaccharide Structure and their Effect on Glycoprotein Properties. *Bio/Technology*, 9(12), 1347-1355. doi:10.1038/nbt1291-1347
- Gutscher, Marcus, Pauleau, Anne-Laure, Marty, Laurent, Brach, Thorsten, Wabnitz, Guido H., Samstag, Yvonne, ... Dick, Tobias P. (2008). Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nature Methods*, 5(6), 553-559. doi:10.1038/nmeth.1212
- Hanson, George T., Aggeler, Robert, Oglesbee, Devin, Cannon, Mark, Capaldi, Roderick A., Tsien, Roger Y., y Remington, S. James. (2004). Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-sensitive Green Fluorescent Protein Indicators. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 13044-13053. doi:10.1074/jbc.M312846200
- Hassinen, Antti, Khoder-Agha, Fawzi, Khosrowabadi, Elham, Mennerich, Daniela, Harrus, Deborah, Noel, Maxence, ... Kellokumpu, Sakari. (2019). A Golgi-associated redox switch regulates catalytic activation and cooperative functioning of ST6Gal-I with B4GalT-I. *Redox Biology*, 24, 101182. doi:10.1016/j.redox.2019.101182
- Hassinen, Antti, Pujol, Francois M., Kokkonen, Nina, Pieters, Caroline, Kihlström, Minna, Korhonen, Kati, y Kellokumpu, Sakari. (2011). Functional Organization of Golgi N- and O-Glycosylation Pathways Involves pH-dependent Complex Formation That Is Impaired in Cancer Cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(44), 38329-38340. doi:10.1074/jbc.M111.277681
- Hatori, Yuta, Kubo, Takanori, Sato, Yuichiro, Inouye, Sachiye, Akagi, Reiko, y Seyama, Toshio. (2020). Visualization of the Redox Status of Cytosolic Glutathione Using the Organelle- and Cytoskeleton-Targeted Redox Sensors. *Antioxidants*, 9(2), 129. doi:10.3390/antiox9020129
- Jeon, Min Kyoung, y Lee, Gyun Min. (2007). Correlation between enhancing effect of sodium butyrate on specific productivity and mRNA transcription level in recombinant Chinese hamster ovary cells
-

producing antibody. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(6), 1036-40. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18050924>

Jiang, Jing, Auchinvole, Craig, Fisher, Kate, y Campbell, Colin J. (2014). Quantitative measurement of redox potential in hypoxic cells using SERS nanosensors. *Nanoscale*, 6(20), 12104-12110. doi:10.1039/C4NR01263A

Jiang, Zheng, Hu, Zhiping, Zeng, Liuwang, Lu, Wei, Zhang, Hainan, Li, Ting, y Xiao, Han. (2011). The role of the Golgi apparatus in oxidative stress: is this organelle less significant than mitochondria? *Free Radical Biology and Medicine*, 50(8), 907-917. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.011

Kenoutis, Christos, Efrose, Rodica C., Swevers, Luc, Lavdas, Alexandros A., Gaitanou, Maria, Matsas, Rebecca, y Iatrou, Kostas. (2006). Baculovirus-Mediated Gene Delivery into Mammalian Cells Does Not Alter Their Transcriptional and Differentiating Potential but Is Accompanied by Early Viral Gene Expression. *Journal of Virology*, 80(8), 4135-4146. doi:10.1128/JVI.80.8.4135-4146.2006

Kirlin, Ward G., Cai, Jiyang, Thompson, Sally A., Diaz, Dolores, Kavanagh, Terrance J., y Jones, Dean P. (1999). Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11-12), 1208-1218. doi:10.1016/S0891-5849(99)00145-8

Kolossov, Vladimir L., Leslie, Matthew T., Chatterjee, Abhishek, Sheehan, Bridget M., Kenis, Paul J. A., y Gaskins, H. Rex. (2012). Förster resonance energy transfer-based sensor targeting endoplasmic reticulum reveals highly oxidative environment. *Experimental Biology and Medicine*, 237(6), 652-662. doi:10.1258/ebm.2012.011436

Kunkel, Jeremy P., Jan, David C. H., Jamieson, James C., y Butler, Michael. (1998). Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *Journal of Biotechnology*, 62(1), 55-71. doi:10.1016/S0168-1656(98)00044-3

Lai, C. S., Hopwood, L. E., Hyde, J. S., y Lukiewicz, S. (1982). ESR studies of O₂ uptake by Chinese hamster ovary cells during the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(4), 1166-1170. doi:10.1073/pnas.79.4.1166

Lee, Pearl, Chandel, Navdeep S., y Simon, M. Celeste. (2020). Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(5), 268-283. doi:10.1038/s41580-020-0227-y

Li, Huijuan, y D'Anjou, Marc. (2009). Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), 678-684. doi:10.1016/j.copbio.2009.10.009

Lin, Andy A., y Miller, William M. (1992). CHO cell responses to low oxygen: Regulation of oxygen consumption and sensitization to oxidative stress. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(4), 505-516. doi:10.1002/bit.260400409

Lipscomb, Matthew L., Palomares, Laura A., Hernández, Vanessa, Ramírez, Octavio T., y Kompala,

-
- Dhinakar S. (2008). Effect of Production Method and Gene Amplification on the Glycosylation Pattern of a Secreted Reporter Protein in CHO Cells. *Biotechnology Progress*, 21(1), 40-49. doi:10.1021/bp049761m
- Lith, M. van, Tiwari, S., Pediani, J., Milligan, G., y Bulleid, N. J. (2011). Real-time monitoring of redox changes in the mammalian endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*, 124(14), 2349-2356. doi:10.1242/jcs.085530
- Lohman, Jeremy R., y Remington, S. James. (2008). Development of a Family of Redox-Sensitive Green Fluorescent Protein Indicators for Use in Relatively Oxidizing Subcellular Environments. *Biochemistry*, 47(33), 8678-8688. doi:10.1021/bi800498g
- Mallikarjun, Venkatesh, Clarke, David J., y Campbell, Colin J. (2012). Cellular redox potential and the biomolecular electrochemical series: A systems hypothesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(2), 280-288. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.034
- Martinovich, Grigory G., Cherenkevich, Sergey N., y Sauer, Heinrich. (2005). Intracellular redox state: towards quantitative description. *European Biophysics Journal*, 34(7), 937-942. doi:10.1007/s00249-005-0470-3
- Meneses, Angélica. (2001). El potencial de oxidoreduccion : implicaciones y efectos en el cultivo de celulas de eucariotes superiores (Tesis de Doctorado). UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
- Meyer, Andreas J., y Dick, Tobias P. (2010). Fluorescent Protein-Based Redox Probes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(5), 621-650. doi:10.1089/ars.2009.2948
- Miller, William M., Wilke, Charles R., y Blanch, Harvey W. (1987). Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. *Journal of Cellular Physiology*, 132(3), 524-530. doi:10.1002/jcp.1041320315
- Mitra, Nivedita, Sinha, Sharmistha, Ramya, Thirumalai N. C., y Surolia, Avadhesh. (2006). N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(3), 156-163. doi:10.1016/j.tibs.2006.01.003
- Pham, Phuc V. (2018). Medical Biotechnology. En *Omics Technologies and Bio-Engineering* (pp. 449-469). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00019-1>: Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-804659-3.00019-1
- Place, Trenton L., Domann, Frederick E., y Case, Adam J. (2017). Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radical Biology and Medicine*, 113(October), 311-322. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.003
- Rao, Goving, Cacciuttolo, Marco A., y Oliver, Cynthia. (2003). Animal cell culture, physiochemical effects of dissolved oxygen and redox potential. En *Encyclopedia of Cell Technology* (pp. 51-57).
-

-
- Restelli, V., y Butler, M. (2006). The Effect of Cell Culture Parameters on Protein Glycosylation. En *Cell Engineering* (pp. 61-92). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. doi:10.1007/0-306-47525-1_2
- Rosano, Germán L., y Ceccarelli, Eduardo A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), 1-17. doi:10.3389/fmicb.2014.00172
- Roy, Sukanya, Kumaravel, Subhashree, Sharma, Ankith, Duran, Camille L., Bayless, Kayla J., y Chakraborty, Sanjukta. (2020). Hypoxic tumor microenvironment: Implications for cancer therapy. *Experimental Biology and Medicine*, 245(13), 1073-1086. doi:10.1177/1535370220934038
- Runkel, Laura, Meier, Werner, Pepinsky, R. Blake, Karpusas, Michael, Whitty, Adrian, Kimball, Kathleen, ... Goelz, Susan E. (1998). Structural and functional differences between glycosylated and Non-glycosylated forms of human Interferon-B (IFN-B). *Pharmaceutical Research*, 15(4), 641-649. doi:https://doi.org/10.1023/A:1011974512425
- Sarkar, Deboleena Dipak, Edwards, Sarah K., Mauser, Justin A., Suarez, Allen M., Serowoky, Maxwell A., Hudok, Natalie L., ... Tsao, Tsu-Shuen. (2013). Increased Redox-Sensitive Green Fluorescent Protein Reduction Potential in the Endoplasmic Reticulum following Glutathione-Mediated Dimerization. *Biochemistry*, 52(19), 3332-3345. doi:10.1021/bi400052u
- Sasaki, Kanae, y Yoshida, Hiderou. (2019). Golgi stress response and organelle zones. *FEBS Letters*, 593(17), 2330-2340. doi:10.1002/1873-3468.13554
- Schafer, Freya Q., y Buettner, Garry R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(11), 1191-1212. doi:10.1016/S0891-5849(01)00480-4
- Schwarzländer, Markus, Dick, Tobias P., Meyer, Andreas J., y Morgan, Bruce. (2015). Dissecting Redox Biology Using Fluorescent Protein Sensors. *Antioxidants & Redox Signaling*, 24(13), 680-712. doi:10.1089/ars.2015.6266
- Semenza, Gregg L. (2009). Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Physiology*, 24(2), 97-106. doi:10.1152/physiol.00045.2008
- Smith, Kimberly A., Waypa, Gregory B., y Schumacker, Paul T. (2017). Redox signaling during hypoxia in mammalian cells. *Redox Biology*, 13(May), 228-234. doi:10.1016/j.redox.2017.05.020
- Toyoda, T., Arakawa, T., y Yamaguchi, H. (2002). N-Glycans Stabilize Human Erythropoietin through Hydrophobic Interactions with the Hydrophobic Protein Surface: Studies by Surface Plasmon Resonance Analysis. *Journal of Biochemistry*, 131(4), 511-515. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003128
- Vervecken, Wouter, Callewaert, Nico, Kaigorodov, Vladimir, Geysens, Steven, y Contreras, Roland. (2007). Modification of the N-Glycosylation Pathway to Produce Homogeneous, Human-Like Glycans Using GlycoSwitch Plasmids. En *Pichia Protocols, Second Edition* (Vol. 389, pp. 119-138). New Jersey: Humana Press. doi:10.1385/1-59745-456-7:119
-

-
- Waypa, Gregory B., Marks, Jeremy D., Guzy, Robert, Mungai, Paul T., Schriewer, Jacqueline, Dokic, Danijela, y Schumacker, Paul T. (2010). Hypoxia Triggers Subcellular Compartmental Redox Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*, 106(3), 526-535. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.206334
- Wurm, Florian M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1393-1398. doi:10.1038/nbt1026
- Xing, Wei, Yin, Min, Lv, Qing, Hu, Yang, Liu, Changpeng, y Zhang, Jiujun. (2014). Oxygen Solubility, Diffusion Coefficient, and Solution Viscosity. En *Rotating Electrode Methods and Oxygen Reduction Electrocatalysts* (pp. 1-31). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-444-63278-4.00001-X
- Zhang, Jintao, Yi, Man, Zha, Longying, Chen, Siqiang, Li, Zhijia, Li, Cheng, ... Sun, Suxia. (2016). Sodium Butyrate Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Colorectal Cells: Implications for Apoptosis. *PLOS ONE*, 11(1), e0147218. doi:10.1371/journal.pone.0147218
- Zhou, Qun, y Qiu, Huawei. (2019). The Mechanistic Impact of N-Glycosylation on Stability, Pharmacokinetics, and Immunogenicity of Therapeutic Proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108(4), 1366-1377. doi:10.1016/j.xphs.2018.11.029
- Zúñiga, Frania J. (2017). EFECTO DEL POTENCIAL REDOX EN LA SIALIDACIÓN DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL (Tesis de Maestría). UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

10. ANEXO

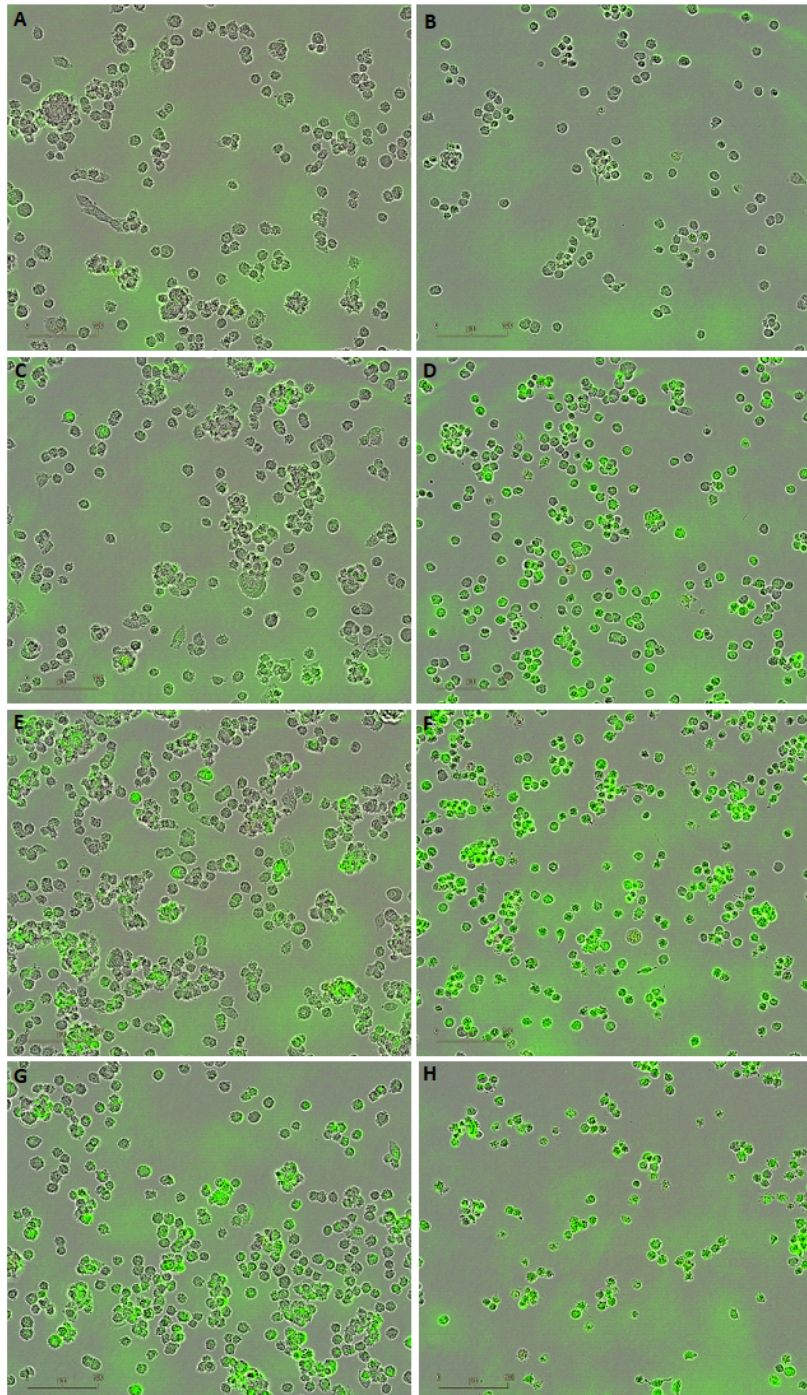


Figura 29: Expresión de la proteína recombinante roGFP1-iLGolgi en células CHO-hSEAP a las 48 horas postransducción, tratamiento con butirato 10 mM (derecha) y sin butirato (izquierda). A y B) MOI = 0, células control. C y D) MOI = 100. E y F) MOI = 500. G y H) MOI = 1000. Escala = 100 μ m. Imágenes tomadas en el equipo IncuCyte con un objetivo de 20X.