



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LA TEMPERATURA INTRACELULAR EN LÍNEAS CELULARES DE OVARIO
DE HÁMSTER CHINO.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q. F. B. YAICE BERENICE SANDOVAL RAMÍREZ

DR. OCTAVIO TONATIUH RAMÍREZ REIVICH.
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. CHRISTOPHER DAVID WOOD
[Instituto de Biotecnología](#)

DR. TAKUYA NISHIGAKI SHIMIZU
[Instituto de Biotecnología](#)

Cuernavaca, Morelos, Octubre 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de maestría no. 886357 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT y a los ingresos extraordinarios P-9846 del Instituto Biosen y el P-9888 de Laboratorios Liomont

A todos los que nunca dudaron de mi, a los que me acompañaron en este viaje. A todos los que me cuidaron, me cobijaron y me sostuvieron en cada momento. A toda mi familia, a todos mis amigos, a toda la gente que amo, admiro y aprecio.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich y a la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera, por todo el apoyo, la confianza y libertad, por los consejos profesionales y personales, por ayudarnos e invitarnos a ver de diferentes perspectivas.

A las técnico académico Vanessa Hernández, Ana Ruth Pastor y Martha Alicia Contreras por todo su apoyo, su excelente trabajo y su amistad.

A todos los miembros del grupo Palomares-Ramírez, por todo el apoyo, el compañerismo y la amistad.

A los miembros de mi comité tutorial, los Dres Chris Wood y Takuya Nishigaki, por todo su invaluable apoyo, sus consejos, sus comentarios, por entrenarme y enseñarme.

A Karin Levy Popo y Larisa Campos, por ayudarnos siempre, por su amistad.

Al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, al Dr. Arturo Pimentel y al M.en C.Andres Saralegui, por su apoyo técnico, asesoría y consejos.

Al Consorcio del espermatozoide, en especial a la M. en C. Yoloxochitl Sanchez Guevara y al Dr. Héctor Ramírez, por su asesoría, entrenamiento y su invaluable amistad.

A Antonio Bolaños por tanta paciencia y todo su trabajo para el adecuado funcionamiento del posgrado.

A la Unidad de Computo, en especial a David Castañeda por su invaluable apoyo técnico y la amistad.

CONTENIDO

Índice de figuras.....	I
Índice de tablas.....	IV
Abreviaturas.....	V
1 Resumen.....	1
2 Introducción.....	3
3 Antecedentes.....	4
3.1 Células de ovario de hámster chino (CHO): hospedero preferido.....	4
3.2 Termogénesis y temperatura intracelular.....	6
3.3 Termómetros intracelulares.....	7
3.3.1 Mito Thermo Yellow (MTY).....	9
3.3.2 Termómetro polimérico fluorescente FDV-0005.....	11
3.3.3 gTemp.....	14
3.4 Valores reportados de temperatura intracelular.....	17
3.5 Aspectos termodinámicos del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) y de la fosforilación oxidativa (OXPHOS).....	18
3.6 Metabolismo energético y producción de lactato en células CHO.....	20
3.7 Estudios de temperatura intracelular en células CHO.....	21
4 Hipótesis.....	22
5 Objetivo general.....	22
6 Objetivos particulares.....	22
7 Estrategia experimental.....	23
8 Metodología.....	23

8.1	Selección de un sensor para medir la temperatura intracelular	23
8.2	Producción de proteínas fluorescentes Sirius y mT-Sapphire para caracterización <i>in vitro</i> de gTemp 24	
8.3	Obtención de espectros de emisión y evaluación de la dependencia de la intensidad de fluorescencia (IF) a la temperatura <i>in vitro</i>	25
8.4	Evaluación de la sensibilidad de la señal de fluorescencia a condiciones ambientales <i>in vitro</i> 26	
8.5	Cultivo celular.....	26
8.6	Internalización de FDV-0005 en células HEK-293.....	27
8.7	Internalización de FDV-0005 en células CHO-S.....	27
8.8	Internalización de FDV-0005 en células CHO-S por electroporación	27
8.9	gTemp	28
8.9.1	Recuperación de vectores	28
8.9.2	Verificación del patrón de restricción de plásmidos pcDNA3	29
8.9.3	Verificación por PCR de plásmidos pcDNA3	29
8.9.4	Propagación de vectores de transfección para expresar gTemp	30
8.10	Selección de método de transfección para expresar gTemp	31
8.10.1	Lípidos catiónicos	31
8.10.2	Electroporación	31
8.11	Estandarización de las condiciones de microscopia para experimentos <i>in vivo</i> con gTemp .	32
8.12	Curvas de calibración de gTemp <i>in vivo</i>	32
8.13	Ensayos <i>in vivo</i> con FCCP Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona).....	33

9	Resultados y discusión.....	34
9.1	Caracterización <i>in vitro</i> de FDV-0005	34
9.1.1	Evaluación de la sensibilidad a condiciones ambientales en FDV-0005	37
9.1.2	Internalización de FDV-0005 en células HEK-293.....	39
9.1.3	Internalización de FDV-0005 en células CHO-S.....	42
9.1.4	Internalización en células CHO-S por electroporación	43
9.2	Producción de proteínas fluorescentes Sirius y mT-Sapphire.....	45
9.3	Caracterización <i>in vitro</i> de gTemp.....	47
9.3.1	Evaluación de la sensibilidad de gTemp a condiciones ambientales.....	48
9.3.2	Expresión de gTemp: verificación de patrón de restricción y productos de PCR	52
9.3.3	Selección del método de transfección.....	53
9.3.4	Caracterización de gTemp <i>in vivo</i>	55
9.4	Sistemas de captura de imágenes y calibración.....	57
9.5	Ensayos de adición de FCCP(Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona)	59
9.6	Aproximaciones teóricas para el cálculo de la temperatura intracelular	63
10	Conclusiones	66
11	Perspectivas	67
12	Apéndices	68
12.1	Ruta de síntesis de Mito Thermo Yellow.....	68
12.2	Sistema de captura de imágenes con divisor de imágenes	71
12.3	Optimización de las condiciones de electroporación	73
13	Referencias.....	75

Índice de figuras

Figura 3.1 Estructura de a) rodamina, b) rosamina y c) de las moléculas que conforman la librería de Uchiyama et al (2015).)	9
Figura 3.2 Sustituyentes empleados en la librería de rosamina reportada por Ahn et al 2007, donde se obtuvo MTY	10
Figura 3.3 Estructura del polímero fluorescente reportado por Uchiyama et al, 2015.	12
Figura 3.4 Mecanismo de respuesta de polímeros termosensibles sintetizados con NIPAM.	13
Figura 3.5 Evaluación de la sensibilidad a la temperatura de diversas proteínas fluorescentes mutantes de GFP	14
Figura 3.6 Distribución de los espectros de emisión y excitación de sirius y mT-Sapphire	15
Figura 3.7 Plásmidos pcDNA3 para la expresión del sensor gTemp en células de mamífero	16
Figura 9.1 Comportamiento in vitro de la intensidad de fluorescencia y razón entre las señales del polímero fluorescente FDV-0005 respecto a la temperatura	35
Figura 9.2 Determinación de la sensibilidad de la intensidad de fluorescencia de DBDThD y el BODIPY, que componen al polímero fluorescente FDV-0005 respecto a la temperatura	36
Figura 9.3 Evaluación del comportamiento de la razón de fluorescencia de FDV-0005 a diferentes concentraciones del sensor (A), valores de pH (B) y fuerza iónica(C) pH.	38
Figura 9.4 Internalización del polímero fluorescente FDV-0005 en células MOLT-4(A) y HEK-293(B).	39
Figura 9.5 Experimentos de internalización de FDV-0005 en células HEK-293	39
Figura 9.6 Cambio en la intensidad de fluorescencia de un polímero de NIPAM,	41
Figura 9.7 Experimentos de internalización de FDV-0005 en células CHO-S	42
Figura 9.8 Experimentos de internalización de FDV-0005 en células CHO-S por electroporación.	44
Figura 9.9 Verificación de la purificación por cromatografía de afinidad de Sirius y mT-Sapphire por geles de poliacrilamida al 12 %.	46

Figura 9.10 Comparación del espectro de emisión reportado en Fluorescent Protein Data Base (FPbase) y espectro obtenido de la purificación de mT-Sapphire.....	47
Figura 9.11 Comportamiento in vitro de la intensidad de fluorescencia y razón entre las señales de gTemp respecto a la temperatura..	48
Figura 9.12 Prueba de fotoblanqueo para Sirius (A) y mT-Sapphire (B)..	49
Figura 9.13 Evaluación del comportamiento de la razón de fluorescencia de gTemp a diferente fuerza iónica (A), valores de pH (B) y concentraciones del sensor (C).....	50
Figura 9.14 Determinación de la sensibilidad de la señal de fluorescencia de Sirius(A) y mT-Sapphire(B) en diferentes condiciones respecto a la temperatura..	51
Figura 9.15 Verificación por patrón de restricción de gTemp.....	52
Figura 9.16 Verificación por productos de PCR 1) mito_gTemp 65 °C 2)mito_gTemp 61 °C 3) mito_gTemp 55 °C 4) gTemp 65 °C, 5) gTemp 61 °C, 6) gTemp 55 °C	53
Figura 9.17 Espectros de emisión de células CHO-S expresando gTemp en citoplasma(A) y mitocondria (B).....	55
Figura 9.18 Espectros de emisión de gTemp en transfecciones independientes en citoplasma (A) y mitocondrial (B).....	56
Figura 9.19 Calibración del descenso porcentual de la intensidad de fluorescencia de Sirius respecto a la temperatura.....	58
Figura 9.20 Respuesta de la intensidad de fluorescencia (%) de Sirius al desacoplar la OXPHOS.....	61
Figura 9.21 Valor de descenso global de la intensidad de fluorescencia en mitocondria y citoplasma al desacoplar la OXPHOS..	62
Figura 12.1 Ruta de síntesis orgánica de Mito Thermo Yellow	69
Figura 12.2 Protección de grupo amina en (5) por Boc ₂ O.....	70
Figura 12.3 Esquema del divisor de imágenes Optosplit Cairn II.....	71

Figura 12.4 Separación y filtración de las señale de Sirius y mT-Sapphire en el sistema dual de captura de imágenes.....	72
--	----

Índice de tablas

Tabla 3.1 Comparación de cultivos celulares realizados en 1986 y 2004, para la producción de anticuerpos monoclonales. Datos tomados de Wurn F, 2004.	5
Tabla 7.1 Mezcla de reacción para PCR.....	29
Tabla 7.2 Protocolo de reacción de PCR.....	30
Tabla 8.1 Propiedades fotofísicas de Sirius y mT-Sapphire.....	30
Tabla 8.2 Propiedades fotofísicas de DBThD. Datos tomados de (Uchiyama et al., 2015)	39
Tabla 8.3 Eficiencia de internalización de FDV-0005 en células CHO-	45
Tabla 8.4 Resultados de método de transfección propuestos.....	54
Tabla 8.5 Valores de descenso porcentual de la intensidad de fluorescencia corregidos	62
Tabla 11.1 Selección de condiciones de electroporación de células CHOS-S.....	74

Abreviaturas

r^2	Coeficiente de determinación
SnCl_2	Cloruro de estaño
ΔT	Diferencial de temperatura
APTMA	(3-acrilamido-propil) trimetil amonio
ATP	Trifosfato de adenosin
Boc_2O	Dicarbonato de ditert-butilo
BODIPY-AA	8-(4-acrilamidofenil)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno
CHO	Células de ovario de hámster chino
CNT	Nanotubos de carbón funcionalizados
Co-A	Coenzima A
CO_2	Dióxido de carbono
CTE	Cadena transportadora de electrones
Cu	Cobre
DBThD-AA	N-(2-([7-(N,N-dimetil-aminosulfonil)-2,1,3-benzotiadiazol-4-il]-(metil)amino)etil)-N- metilacrilamida),
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimetil formamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ER	Retículo endoplásmico
EtOH	Etanol
Eu-TTA	Europio (III) tenoiltrifluoroacetona
FADH_2	Flavín adenín dinucleótido
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
Fpbase	<i>Fluorescent protein database</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
H_2O	Agua
H_2SO_4	Acido sulfúrico
HCl	Acido clorhídrico
IBt	Instituto de Biotecnología
IF	Intensidad de fluorescencia
K_2CO_3	Carbonato de potasio
kb	Kilobases

KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilo Daltons
kJ	Kilo Joules
k	Conductividad térmica
LDH	Lactato deshidrogenasa
LNMA	Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada
LSCT	Temperatura de solución crítica más baja
LUT	<i>Look up table</i>
mF	Mili faradios
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero
ms	Milisegundos
mT-Sapphire	monomeric Turbo Sapphire
MTY	Mito thermo yellow
NAD ⁺	Nicotin adenín dinucleótido en forma oxidada
NADH	Nicotin adenín dinucleótido en forma reducida
NaH	Hidruro de sodio
NBD	7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il
NIPAM	N-isopropilacrilamida
nm	Nanómetros
NNPAM	N-N propilacrilamida
nW	Nanowatts
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
P	Energía liberada
p/v	Peso/volumen
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	Picogramos
pW	Picowatts
rpm	Rotaciones por minuto
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNR	Relación señal/ruido
t-PA	Activador tisular del plasminógeno
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
UCP	Proteínas desacopladoras
USSDNA	Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN
UV	Ultravioleta
V	Volts
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
wtGFP	Wildtype GFP

ΔG	Delta G
ϵ	Coeficiente de extinción molar
μ	Velocidad específica de crecimiento
μg	Microgramos
μL	Microlitros
ϕ	Rendimiento cuántico

1 Resumen

El tratamiento y prevención de enfermedades se ha modificado conforme el avance de la medicina y de la tecnología. El desarrollo de la biotecnología, en especial de la biología molecular, los bioprocesos y su relación con el metabolismo celular, han permitido obtener y producir proteínas terapéuticas que mejoran de forma importante la calidad de vida de los pacientes. Para obtener dichas proteínas, ha sido necesario entender los procesos celulares básicos y cómo estos se relacionan con el metabolismo y las variables del bioproceso. A través de este conocimiento, se han logrado adecuar las líneas celulares productoras de anticuerpos monoclonales y las condiciones de cultivo que permiten obtener títulos altos de proteína con las características deseadas.

El presente trabajo se enfoca en el estudio de la temperatura intracelular, ya que durante la última década se han acumulado evidencias de la existencia de diferencias de temperatura entre los diferentes organelos de la célula. Al ser un tema al que recientemente se ha prestado atención, aún existen una gran cantidad de incógnitas al respecto. En este trabajo se hizo un acercamiento con células de ovario de hámster chino (CHO) con la intención de sentar las bases de un estudio que permita entender en el futuro, el papel de la temperatura intracelular en la producción de proteínas terapéuticas y en su calidad. Al conocer el impacto de esta variable, se podría generar una herramienta de monitoreo de bioprocesos.

Este trabajo de investigación se dividió en 3 etapas: i) la selección de un sensor fluorescentes de temperatura, ii) la caracterización *in vitro* e *in vivo* del sensor seleccionado y iii) mediciones de temperatura durante el desacople de la fosforilación oxidativa. Se seleccionaron 3 sensores de temperatura: la molécula Mito Thermo Yellow (MTY), el polímero FDV-0005 y el sensor genéticamente codificado gTemp, de expresión citoplasmática y mitocondrial.

Para MTY sólo se propuso una ruta de síntesis ya que no se encuentra disponible a la venta, pero resulta una opción sumamente atractiva a ser probada en el futuro. Para el par de sensores restantes, se verificó que los picos máximos de excitación y que las señales generadas fueran independientes de las condiciones ambientales. De estos dos se descartó el uso de FDV-0005 puesto que sólo logró internalizarse por electroporación. Para gTemp se establecieron condiciones de transfección y se realizó una caracterización *in vivo*, que llevó a establecer el descenso en la intensidad de fluorescencia (IF) como herramienta de medida del cambio de temperatura.

Para llevar a cabo las mediciones de temperatura, se propusieron dos sistemas de captura de imágenes en un microscopio de epifluorescencia que permiten capturar una o dos señales distintas. Sin embargo, por cuestiones ajenas al proyecto, aquí solo se reportan resultados para el sistema de captura de una sola señal. Para dicho sistema de captura, se realizó una curva de calibración que permitió identificar una tasa de cambio de 1.045 % en la intensidad de fluorescencia del sensor por cada °C.

Posteriormente, se realizaron experimentos de desacople de la fosforilación oxidativa con la intención de romper el gradiente de protones de la matriz mitocondrial. Se encontró un aumento de temperatura de 7.4 °C en citoplasma con respecto a la temperatura basal, mientras que en mitocondria no se observaron cambios. Se propone realizar replicas experimentales adicionales para robustecer la información aquí generada.

Finalmente, se propusieron diversos enfoques para continuar con el estudio de temperatura intracelular, que incluye el sistema de captura de imágenes de ambas señales, condiciones de transfección por electroporación, así como propuestas de sensores alternativos o mejoras a gTemp.

2 Introducción

El desarrollo de la tecnología del DNA recombinante en 1977 permitió la expresión de proteínas heterólogas de interés industrial (Jayapal et al., 2007). En el campo médico-farmacéutico, éstas se han utilizado con fines profilácticos y en el tratamiento de enfermedades tales como VIH/SIDA, cáncer, Alzheimer, esclerosis, artritis reumatoide, entre otras (PhRMA, 2017). El éxito de las proteínas recombinantes como biofármacos, se debe a que su uso ha disminuido la tasa de mortalidad de algunos padecimientos y ha mejorado la salud y calidad de vida de los pacientes (PhRMA, 2017). Aunado a ello ha habido un desarrollo constante de nuevos productos. De hecho se espera que su valor en el mercado global alcance alrededor de 220 mil millones de dólares en 2023 (Allied Market Research, 2017; Research, 2019).

Genentech inició en 1980 el desarrollo comercial de la primera proteína terapéutica producida por células animales, el activador tisular del plasminógeno humano (t-PA); obteniendo la aprobación de la FDA en 1986 (Wurm, 2004). El proceso de producción incluía el cultivo en suspensión de células de mamífero (Hacker et al., 2009), por lo que el antecedente de aprobación por la FDA contribuyó a que dichas células se convirtieran en el sistema de expresión preferente en la industria biofarmacéutica.

Si bien a lo largo de los años se han empleado diversas líneas celulares de mamífero, cerca del 70 % de las proteínas terapéuticas producidas por células animales se expresan en células de ovario de hámster chino (CHO) (Jinyou, 2012). Este hospedero ha demostrado ser seguro, de crecimiento rápido y robusto, además de que presenta la capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales compatibles y bioactivas en humanos (Zhu, 2012). No obstante, los rendimientos son bajos y la productividad puede ser de 10 a 100 veces menor respecto a sistemas de expresión bacterianos (Jayapal et al., 2007).

Para sobreponerse a las desventajas de dicho sistema de expresión, la investigación se ha enfocado a entender los procesos celulares, así como el impacto de las variables del bioproceso. De esta forma se han logrado aumentar las concentraciones de producto de interés en hasta 100 veces (Kim et al., 2012). Es por ello que el estudio de nuevas variables y el desarrollo de nuevas herramientas de monitoreo deberían ser útiles para mejorar aún más la calidad y productividad de proteínas recombinantes fabricadas mediante el cultivo de células de mamífero.

Aunque se sabía que la temperatura intracelular es una variable que puede impactar en los procesos y al estado celular, es hasta hace apenas algunos años que comenzó a estudiarse.

En el presente trabajo se busca implementar una herramienta funcional, que permita estudiar la temperatura intracelular en células CHO.

3 Antecedentes

3.1 Células de ovario de hámster chino (CHO): hospedero preferido.

La línea celular de ovario de hámster chino (CHO) se estableció en 1957 por el Dr. Theodore T. Puck en el Departamento de Medicina, en la Universidad de Colorado. Dicha línea celular se usaba en estudios biomédicos, de metabolismo, mutagénesis y citotoxicidad (Jayapal et al., 2007). Aunque inicialmente se emplearon en investigación básica, comenzaron a utilizarse en la industria biotecnológica una vez que se aislaron células mutagenizadas que carecían del gen de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). Esta característica facilita la incorporación de genes exógenos junto con DHFR como marcador de selección (Wurm & Hacker, 2011).

Después de casi 30 años de que se estableció la línea celular, la empresa Genentech propuso la estrategia de cultivo que ha servido como modelo de producción de proteínas recombinantes a escala industrial: el cultivo de células CHO en suspensión (Wurm & Hacker, 2011). Desde que se aprobó el uso de estas células, no se ha observado algún efecto negativo, por lo que actualmente es relativamente sencillo obtener la aprobación de las instancias de regulación sanitaria para nuevos biofármacos producidos en dicha línea celular. Se ha demostrado que 44 virus patogénicos para el humano, incluidos los del VIH, Influenza, Polio, Herpes, entre otros no se replican en células CHO ((Wiebe et al., 1989)). Esto permitió certificar la seguridad para el personal que participa en los procesos productivos que emplean dichas células, así como para los pacientes a los que se les aplican productos fabricados en ellas.

Una de las características más relevantes que posicionó a las células CHO como hospederos destacados para la expresión de proteínas es la capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales similares a las de células humanas. Particularmente, las glicosilaciones son de suma importancia debido a que impactan en las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, así como la seguridad del producto. Las glicoformas que producen las células CHO son activas y biocompatibles, lo que indica que el plegamiento y los patrones de glicosilación son similares al del humano. Además de que el efecto inmunogénico de dichas proteínas es nulo o muy bajo.

Por otro lado, la optimización de medios y estrategias de cultivo ha conducido a mejoras trascendentales en la producción de proteínas recombinantes. Hecho que ha consolidado su uso para obtener productos de interés biofarmacéutico. Después de varias décadas de investigación, se ha logrado aumentar la producción, la productividad específica y mantener alta viabilidad celular por más tiempo (Wurm, 2004), tal como se muestra en la Tabla 4.1, donde se presenta una comparación de dos procesos, uno realizado en 1986 y otro en 2004.

Tabla 3.1 Comparación de cultivos celulares realizados en 1986 y 2004, para la producción de anticuerpos monoclonales. Datos tomados de Wurn F, 2004.

Año	1986	2004
Concentración celular máxima (células/mL)	2x10 ⁶	10x10 ⁶
Productividad específica (pg/célula/día)	10	~90
Producción (g/L)	0.05	10
Duración (días)	7	21

Para alcanzar dichos avances, se han propuesto estrategias basadas en la investigación de diversos aspectos básicos como la modificación en la actividad transcripcional (Hir et al., 2003)(Makrides, 1999), la generación de líneas celulares estables (Wurm, 2004); (Richards & Elgin, 2002); (Li et al., 2016), la extensión de la viabilidad, el aumento en la proliferación; el incremento de la concentración celular máxima; y el aumento de la velocidad específica de crecimiento (μ) (Kayser et al., 2006); así como la reducción de la muerte celular o la optimización de las vías secretorias (Chung et al., 2004) (Peng & Fussenegger, 2009) y metabólicas (Doyle & Butler, 1990; Park et al., 2000; Yang & Butler, 2000).

Aún con todo el avance logrado, en este trabajo se decidió indagar sobre una variable que ha comenzado a estudiarse en la última década: la temperatura intracelular. Esta es relevante debido a que al día de hoy se desconocen las implicaciones de este parámetro fundamental a nivel celular y su efecto en los productos de interés. Además, tampoco existe consenso sobre las fuentes de generación de calor, la regulación y las implicaciones tanto a nivel de conocimiento básico como en

aplicaciones biotecnológicas. Cabe señalar, que los estudios hasta ahora reportados se han realizado en modelos de referencia, por ejemplo HeLa o HEK-293, por lo que la información disponible aún es limitada. Debido a que las células CHO son ampliamente usadas en la industria biofarmacéutica, es de gran interés contribuir al entendimiento de la temperatura intracelular en este sistema particular.

3.2 Termogénesis y temperatura intracelular

La termogénesis es un concepto que hace referencia a la generación de calor bajo diferentes condiciones y que en algunos casos funciona como un mecanismo de regulación y protección en los organismos (Lowell & Spiegelman, 2000). El enfoque con que ha sido estudiado se ha modificado de manera importante a lo largo de los años, tal y como se explica a continuación.

Algunos de los pilares que sentaron las bases del estudio de la termogénesis, fueron los experimentos de Archibald Vivian Hill, sobre contracción muscular, que le valió el premio Nobel de medicina, en 1922. En ese momento no se conocía el mecanismo específico, sin embargo, se logró probar que el fenómeno iba acompañado de producción de calor. En ese sentido, se tenían indicios de que al evitar la tensión de las fibras musculares ante un estímulo, había un aumento en la producción de calor (Santesson, 1923), lo que permitía suponer que para que ocurriera una contracción, existía un proceso exotérmico cuya energía era utilizada para realizar el trabajo de tensión.

Para 1939, Engelhardt & Ljubimova habían descrito ya la presencia de miosina y su función como ATPasa en músculo (Engelhardt & Ljubimowa, 1939). Sin embargo, la termogénesis seguía explicándose como un fenómeno fisiológico. Estas ideas predominaron hasta finales de la década de 1950, en la que aún se consideraban dos clases de termogénesis: física o "*shivering*" y química o "*no shivering*".

Pese a que en los ensayos en modelos animales se apoyaba la visión fisiológica de la termogénesis, comenzaron a acumularse evidencias de que debía existir una explicación a nivel bioquímico. Un ejemplo de ello, son los experimentos con ratones realizados por Hart, Heroux & Depocas (1956), quienes evaluaron la respuesta de los animales cuando se exponían a temperaturas bajas. Se tenían dos grupos, uno aclimatado a 6°C y otro a 30°C. El ensayo consistía en colocar a ambos grupos a 30°C durante 30 min y posteriormente exponerlos a 6°C. Se realizaron electromiogramas y monitoreo de consumo de oxígeno. Se encontró que aquellos ratones aclimatados a 30°C tenían mayor actividad muscular respecto al grupo que había sido aclimatado a temperaturas bajas. De forma

contraria, aquellos con menor actividad muscular mostraban una tasa respiratoria 1.5 veces mayor (Hart et al., 1956). Este hallazgo apoyaba la idea de que existían mecanismos alternativos a la termogénesis física y que, a través de ellos, los ratones aclimatados a temperaturas bajas, lograban generar el calor necesario para mantenerse en buenas condiciones.

En años posteriores, se realizaron avances importantes en el entendimiento de los mecanismos bioquímicos asociados a la respiración celular (David, 1966; Fritz, 1941; Keilin & King, 1958), así como la función termogénica del tejido adiposo pardo (R. E. Smith, 1964a; R. Smith & Hock, 1963). Bajo estos antecedentes fue que algunos autores comenzaron a concebir la producción de calor desde un enfoque bioquímico al que denominaron termogénesis celular. Dicho concepto denotaba que las células poseen la capacidad de producir calor mediante el uso de energía que obtiene de los nutrientes (R. E. Smith, 1964b); precisando en años siguientes, la relación con la respiración y la oxidación de sustratos (Prusiner & Poe, 1968). En los años posteriores, la termogénesis comenzó a abordarse como un fenómeno a nivel celular. Debido a que no se contaban con técnicas que permitieran analizar células individuales, los estudios se realizaban a nivel poblacional. Para ello, se emplearon micro-calorímetros como una herramienta de medición directa, en estudios termodinámicos en cultivos bacterianos (Stoward, 1962) y de producción de calor en distintos tipos celulares (eritrocitos, miocitos, adipocitos, etc.) (Bottcher & Furst, 1997; Monti et al., 1980; Ronquist & Waldenström, 2003), entre otros.

No fue sino hasta finales de la década de 1990 cuando por primera vez se realizaron mediciones en tiempo real, a través de termografía infrarroja, en células aisladas (Paulik et al., 1998). En este contexto, uno de los avances más importantes desde el año 2000, ha sido el desarrollo de herramientas que permiten realizar determinaciones a nivel subcelular. Aprovechando esta nueva oportunidad, se han realizado estudios en los que se ha comparado la temperatura en distintos organelos. Los resultados encontrados han llevado a concebir un nuevo panorama, la existencia de diferencias de temperatura al interior de la célula.

3.3 Termómetros intracelulares

La termometría intracelular es un área de investigación muy reciente y creciente que se ha favorecido en los últimos 10 años. Dado que las determinaciones a nivel subcelular presuponen que las mediciones deben realizarse con una alta resolución espacio-temporal, a escala microscópica (Bai & Gu, 2016; Brites et al., 2012), el trabajo se ha centrado en dos retos principales: identificar técnicas de detección y el desarrollo de moléculas con las características idóneas.

En cuanto a la detección, se han reportado diversos métodos (Brites et al., 2012). Sin embargo, son las señales de fluorescencia las que se han empleado como una herramienta central. Esta técnica combina parámetros únicos, como alta resolución temporal y espacial, no es invasiva y puede emplearse en células y organismos completos (Giepmans et al., 2006). Además de las ventajas inherentes, los avances en biología molecular, química orgánica y ciencias de materiales han ayudado a crear una amplia gama de moléculas con características que hacen muy atractivo su uso en el contexto de termometría intracelular. Dentro de los fluoróforos (también denominados sondas) propuestos, existen moléculas de distinta naturaleza como: moléculas orgánicas, complejos con metales raros, puntos cuánticos (“quantum dots”), biomoléculas, polímeros sintéticos, y estructuras compuestas, entre otros.

Ahora bien, para seleccionar un fluoróforo que permita detectar cambios de temperatura a nivel subcelular, se requiere que posea las siguientes características: I) independencia de la concentración, II) tiempos de respuesta cortos, III) alta resolución (sensibilidad), IV) método de cuantificación fácil y accesible e V) independencia de factores ambientales como pH y fuerza iónica. Otro aspecto importante, es que todas las moléculas que pueden ser de utilidad son fluoróforos extrínsecos; esto es, que no se encuentran de forma natural en la célula. Por lo anterior, es necesario considerar el método de incorporación, pues puede resultar un factor limitante. Dependiendo el tipo de molécula y sus características, pueden incorporarse a través de microinyección (Okabe et al., 2012), difusión (Arai et al., 2014, 2015a; Tsuji et al., 2013) o como DNA, en el caso de la expresión de proteínas.

Hasta ahora, los ensayos de temperatura intracelular han empleado como modelo de estudio levaduras, células COS7, HeLa, HEK293 y MOLT-4, principalmente (Uchiyama et al., 2017);(Nakano et al., 2017a);(Gao et al., 2017). Esto se debe a que, en gran medida, el enfoque de los estudios se ha limitado a pruebas de concepto para moléculas propuestas.

Entre los estudios más relevantes, se han reportado diferencias de 1°C en el retículo endoplásmico (Arai et al., 2015b), de 3°C en núcleo (Nakano et al., 2017b), y entre 6 y 12°C en mitocondria (Chrétien et al., 2018; Nakano et al., 2017b), respecto a los valores registrados inicialmente.

Para llevar a cabo estas mediciones, se han empleado algunas de las herramientas que se describen a continuación:

3.3.1 Mito Thermo Yellow (MTY)

MTY es una sonda que se obtuvo a través de química combinatoria (Y. Ahn et al., 2007; Y. H. Ahn et al., 2007). Esta técnica permite sintetizar un conjunto de compuestos químicos que comparten una estructura base común que se denomina librería.

MTY es una de las 240 moléculas que conforman la librería mostrada en la figura 8.1c, cuya estructura base es la rosamina. Esta batería de compuestos son de interés debido a que al ser rosamina (Figura 8.1 b) una molécula de estructura similar a rodamina (Figura 8.1 a) presenta características deseables en un fluoróforo. Por ejemplo, tiene un alto coeficiente de extinción, alto rendimiento cuántico (cercano a 1), baja sensibilidad a la polaridad del solvente, alta fotoestabilidad y baja sensibilidad al pH (Y. H. Ahn et al., 2007; Lakowicz, 2006).

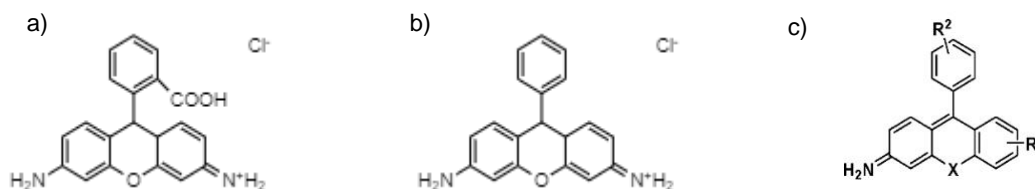


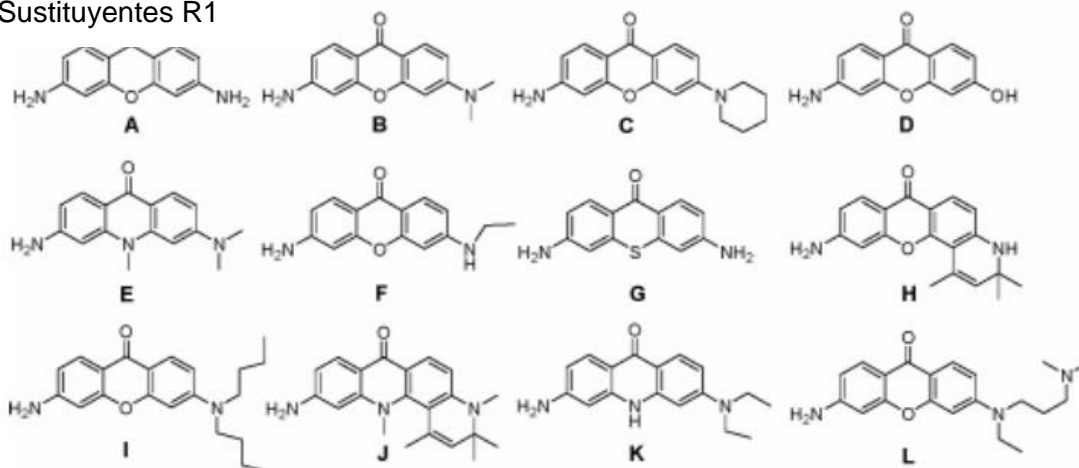
Figura 3.1 Estructura de a) rodamina, b) rosamina y c) de las moléculas que conforman la librería de Uchiyama et al (2015), donde R1 y R2 es alguno de los sustituyentes que se agregan a la mezcla de reacción y X es un átomo de oxígeno(O), de nitrógeno(N) o de azufre (S).

Las propiedades antes mencionadas son producto de la rigidez del núcleo, conformado por los tres anillos principales, a los que se unen el resto de los sustituyentes (Figura 8.2). Estas características son importantes, debido a que facilitan su uso en microscopía de fluorescencia.

Al tener coeficiente de extinción molar (ϵ) y rendimiento cuántico (ϕ) altos, indica que la molécula requerirá una cantidad baja de fotones para lograr excitarse y a su vez, que la cantidad de fotones que emitirá en relación con los que fueron necesarios para excitarla, es alta.

En el aspecto técnico, estas características ofrecen la ventaja de que, durante la observación a través de un microscopio, pueden ajustarse tiempos de exposición cortos, las relaciones señal-ruido son altas, tampoco se requiere operar las fuentes de iluminación a potencia alta para obtener buena señal y, por lo tanto, se disminuye el fotoblanqueo.

Sustituyentes R1



Sustituyentes R2

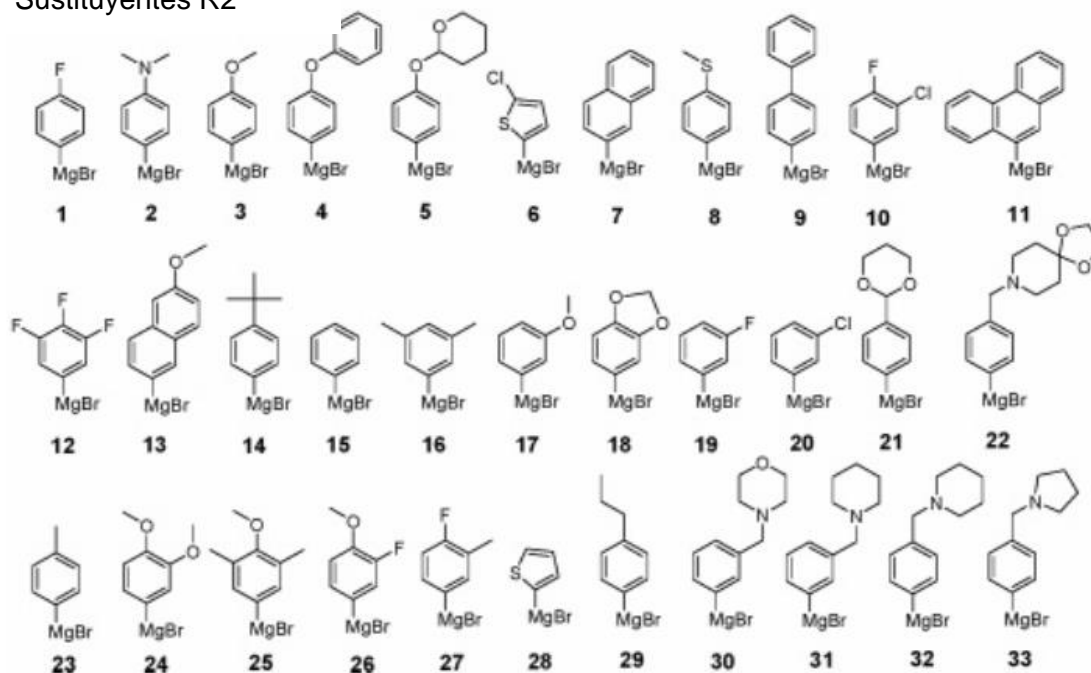


Figura 3.2 Sustituyentes empleados en la librería de rosamina reportada por Ahn et al 2007, donde se obtuvo MTY (Donde el sustituyente R1 es I y el sustituyente R2 es 31)

La síntesis de esta librería (Figura 8.1 c) fue reportada por Ahn et al., 2007 y analizada por (Arai et al., 2014, 2015a) teniendo como premisas principales: que las estructuras obtenidas a partir de rosamina, muestran sensibilidad a la temperatura y especificidad por organelos ácidos.

Arai et al., 2014, 2015a) realizaron un análisis en microplacas, en el que se monitoreó la variación de la intensidad de fluorescencia respecto a la temperatura, siendo MTY la molécula que mostró la mayor sensibilidad respecto al incremento de temperatura (2.0-2.8 % de IF/°C). Este parámetro es relevante puesto que a mayor sensibilidad del sensor (aumento o disminución porcentual de la IF según el fluoróforo), mayor será la resolución. En cuanto a la localización, los autores encontraron que la señal proviene de mitocondrias, obteniendo un coeficiente de correlación de Pearson de 0.85 en el análisis de colocalización.

Pese a que esta molécula no se encuentra disponible de forma comercial, sería muy interesante probarla, dadas sus características, que ha mostrado resultados favorables y que cuenta con la validación de un grupo externo.

3.3.2 Termómetro polimérico fluorescente FDV-0005

La sonda FDV-0005 fue reportada por Uchiyama et al. (2015). Este polímero fue seleccionado de un conjunto de compuestos generados por síntesis orgánica. Se propuso el uso de diferentes monómeros sensibles a la temperatura, las unidades fluorescentes y las proporciones de cada una de ellas. Los criterios de selección buscaron la molécula que presentara mayor sensibilidad a la temperatura, baja toxicidad, baja sensibilidad a condiciones ambientales y que su internalización fuera espontánea.

El sensor polimérico FDV-005 es un copolímero compuesto de 4 monómeros:

- i) NNPAM (N-n-propil acrilamida), monómero que le permite responder a la temperatura, puesto que adopta una conformación extendida a temperaturas bajas y globular a temperaturas altas;
- ii) APTMA ((3-acrilamido- propil) trimetil amonio), monómero catiónico que evita la agregación y favorece la internalización en las células;
- iii) DBThD-AA (N-(2-([7-(N,N-dimetil-aminosulfonil)-2,1,3-benzotiazol-4-il]-(metil)amino)etil)-N-metilacrilamida), unidad fluorescente que responde a los cambios de hidrofobicidad/hidrofilicidad que ocurren con la modificación en la conformación de la unidad termosensible.

iv) BODIPY-AA (8-(4-acrilamidofenil)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno), unidad fluorescente cuya emisión es constante.

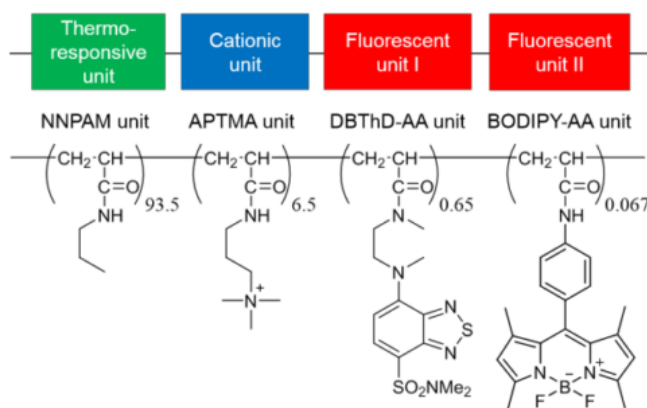


Figura 3.3 Estructura del polímero fluorescente reportado por Uchiyama et al, 2015

Debido a que el sensor cuenta con dos unidades fluorescentes (Figura 8.3) la determinación de temperatura se registra como una razón de la intensidad de fluorescencia de ambas moléculas.

Los sensores de razón son sistemas robustos, que permiten minimizar errores por variaciones en la intensidad de fluorescencia, a través del uso de la relación entre las dos señales. Es deseable que una de las señales tenga baja o nula sensibilidad a la variable de estudio, puesto que de esa forma existe mayor resolución en las determinaciones. En el caso de FDV-0005 la emisión del BODIPY (unidad fluorescente II) se mantiene prácticamente constante, mientras que la emisión de DBThD (unidad fluorescente I) se modifica con los cambios de temperatura. Por consiguiente, la variación en la razón de fluorescencia depende de la emisión de la unidad DBThD.

Cabe señalar que la condición que modifica la intensidad de fluorescencia de DBThD es la polaridad del medio, siendo la temperatura una variable que afecta en forma indirecta. Para entender la respuesta a la temperatura, es necesario explicar el funcionamiento del sensor.

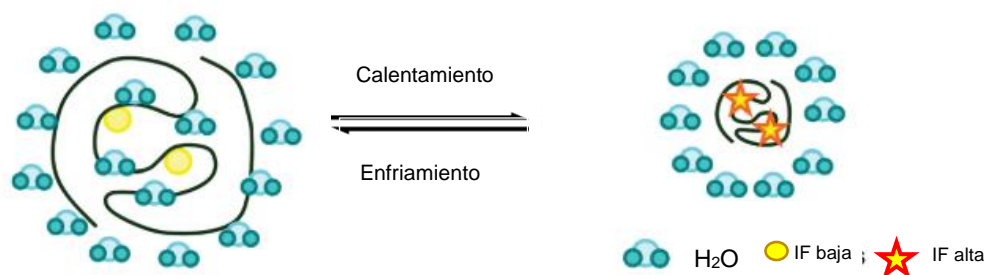


Figura 3.4 Mecanismo de respuesta de polímeros termosensibles sintetizados con NIPAM. El carácter termomórfico de NIPAM produce una modificación en la estructura de los polímeros, favoreciendo un ambiente polar (baja fluorescencia) o apolar (alta fluorescencia): Modificado de Uchiyama et al, 2017.

Los polímeros construidos con NNPAAM (N-N propilacrilamida) o NIPAM (N-isopropilacrilamida) son termomórficos. Esto significa que algunas características se manifiestan a partir de una temperatura determinada, a través de una fase de transición (conocida como temperatura de solución crítica más baja o LSCT, por sus siglas en inglés). En este caso, lo que se modifica son las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas a lo largo del polímero. Con ello se modifica también el radio hidrodinámico (Figura 8.9). En los polímeros sintetizados con NIPAM o NNPAAM se favorecen las interacciones hidrofílicas por debajo de la temperatura de transición; en consecuencia, la estructura tiene menor empaquetamiento. Por el contrario, una vez alcanzada la temperatura de transición la molécula forma interacciones hidrofóbicas y se contrae a una estructura globular.

El ambiente generado alrededor del fluoróforo DBThD determina el cambio en la intensidad de fluorescencia, debido a que el rendimiento cuántico de la molécula disminuye de forma inversa a la polaridad del medio. Esto es, que la emisión de fluorescencia es mayor en ambientes apolares que en ambientes polares (Tabla 8.2).

Tabla 3.2 Propiedades fotofísicas de DBThD. Datos tomados de (Uchiyama et al., 2015)

Solvente	Coefficiente de extinción molar, ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	Rendimiento cuántico ϕ
Hexano	8100	0.81
Acetato de etilo	7600	0.68
Acetonitrilo	8000	0.49
Metanol	7900	0.27

Agua

8100

0.089

En cuanto a la internalización, Tsuji et al.,(2013) probaron el uso de la molécula catiónica APTMA con 2 fines: 1) para generar repulsión electrostática y evitar agregación intermolecular y 2) favorecer la internalización espontanea y evitar técnicas complejas como la microinyección. En dicho trabajo se reportó la internalización espontanea del sensor en levaduras, HEK-293T y MOLT-4. El polímero sintetizado en dicho estudio, se empleó como base para la síntesis de FDV-0005.

Pese a que este sensor no ha sido empleado por grupos externos al que se reportó inicialmente, resulta interesante analizarlo puesto que las características previamente descritas pueden ser muy útiles en la medición de temperatura intracelular.

3.3.3 gTemp.

Es un sensor de razón genéticamente codificado que está compuesto por dos proteínas fluorescentes derivadas de GFP (wtGFP): Sirius y mT-Sapphire.

Para seleccionar los componentes de gTemp, (Nakano et al., 2017a) realizaron el tamizaje de un grupo de proteínas fluorescentes en donde evaluaron el decremento en la intensidad de fluorescencia respecto al cambio de temperatura (Figura 8.4).

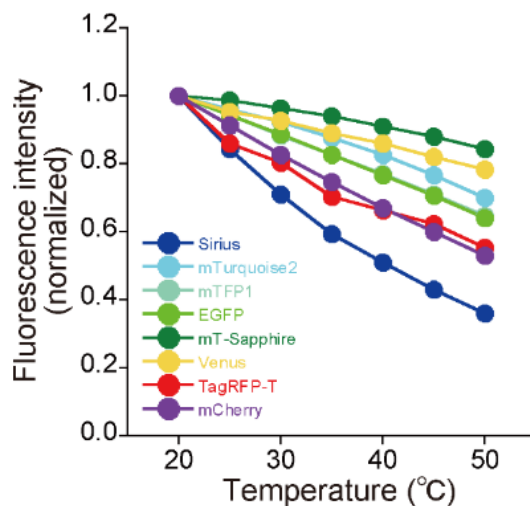


Figura 3.5 Evaluación de la sensibilidad a la temperatura de diversas proteínas fluorescentes mutantes de GFP. De ellas que se seleccionaron Sirius y mT-Sapphire (Nakano M, et al 2017).

De ellas, Sirius fue seleccionada al poseer la mayor sensibilidad (2.17 % de IF/°C) y mT-Sapphire por ser la que muestra menor sensibilidad (0.57 % de IF/°C).

La presencia de ambas señales de fluorescencia permite realizar la determinación de temperatura a través de la razón de las intensidades.

Aunque ambas proteínas son variantes de wtGFP, sus características fotofísicas son muy distintas (Tabla 9.3) de forma que sus espectros de excitación y emisión se encuentran distribuidos en el intervalo UV y visible (Figura 8.5).

Tabla 3.3 Propiedades fotofísicas de Sirius y mT-Sapphire

Proteína	Sirius	mT-Sapphire
Peso molecular (kDa)	26.7	26.9
Coefficiente de extinción molar, ϵ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	15,000	44,000
Rendimiento cuántico Φ	0.24	0.6
Longitud de onda de máxima emisión (nm)	425	511
Decremento de la intensidad de fluorescencia (IF) respecto a temperatura (%)	2.17 % de IF/ °C	0.57 % de IF/ °C

Esto es particularmente importante en la emisión puesto que permite detectar ambas señales, sin que haya contaminación en los canales. Respecto a la excitación (líneas continuas, Figura 8.5), existe una región de ambos espectros en donde se sobreponen, lo que permite excitar ambas proteínas a una misma longitud de onda (línea vertical, Figura 8.5).

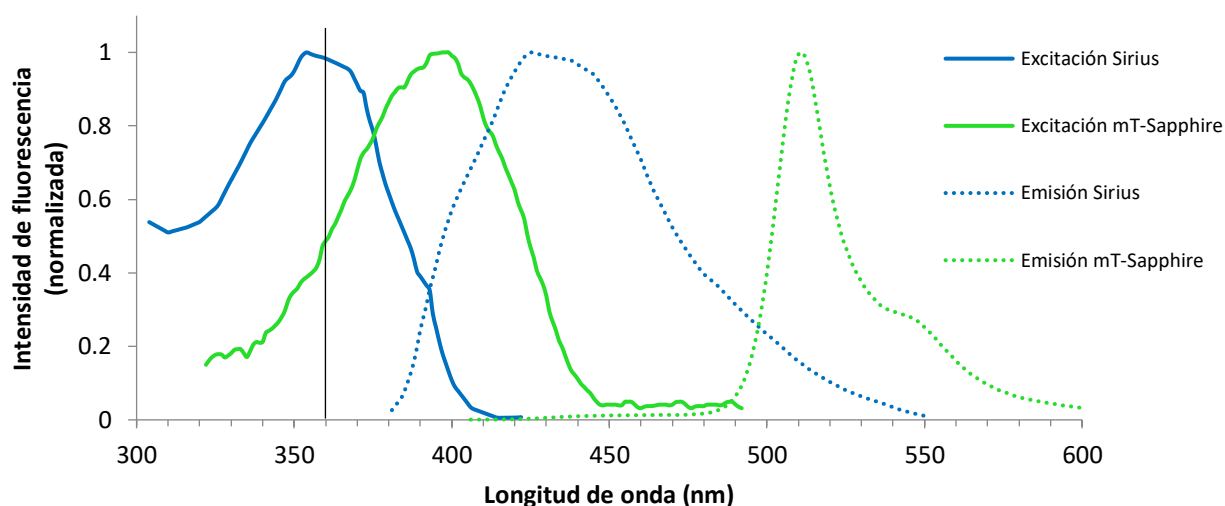


Figura 3.6 Distribución de los espectros de emisión y excitación de sirius (en color azul) y mT-Sapphire (en color verde). En línea continua se muestran los espectros de excitación y en línea punteada los espectros de emisión. La línea vertical negra, indica la longitud de onda de excitación de gTemp. Datos tomados de Fluorescent Protein Database (Lambert, TJ 2019)

La excitación de gTemp se realiza a 360 nm, longitud de onda que se encuentra en el pico máximo (1.0) de excitación de Sirius y en el extremo izquierdo (0.5) del espectro de excitación de mT-Sapphire (indicado con una línea vertical en la Figura 8.5). Se seleccionó 360 nm debido a que Sirius tiene valores de ϵ y ϕ bajos, por lo que es necesario excitar en la longitud de onda máxima para obtener la mejor señal posible. En el caso de mT-Sapphire, los valores altos de ϵ y ϕ permiten obtener buena señal aun cuando la excitación no ocurra en el pico máximo

Respecto a la forma de entrega, se tiene codificada la secuencia nucleotídica de gTemp en el vector de expresión para células de mamíferos pcDNA3; al ser genéticamente codificado tiene la ventaja de que pueden agregarse secuencias de direccionamiento que permitan localizar a las proteínas en organelos específicos. Aprovechando este recurso, (Nakano et al., 2017a) agregaron en el extremo 5' de ambas proteínas, la secuencia que codifica para la subunidad VIII de la enzima citocromo C oxidasa, o complejo IV de la cadena transportadora de electrones (CTE). Por lo anterior, el formato nombrado mito_gTemp (Figura 8.6 B), permite realizar mediciones en la membrana mitocondrial interna; mientras que con el formato gTemp (Figura 8.6 A), que contiene únicamente las secuencias del sensor, las mediciones se efectúan en el citoplasma.

Cabe mencionar que aunque gTemp se transcribe como una sola secuencia, sirius y mT-sapphire se traducen como dos proteínas independientes, a través del péptido linker T2A.

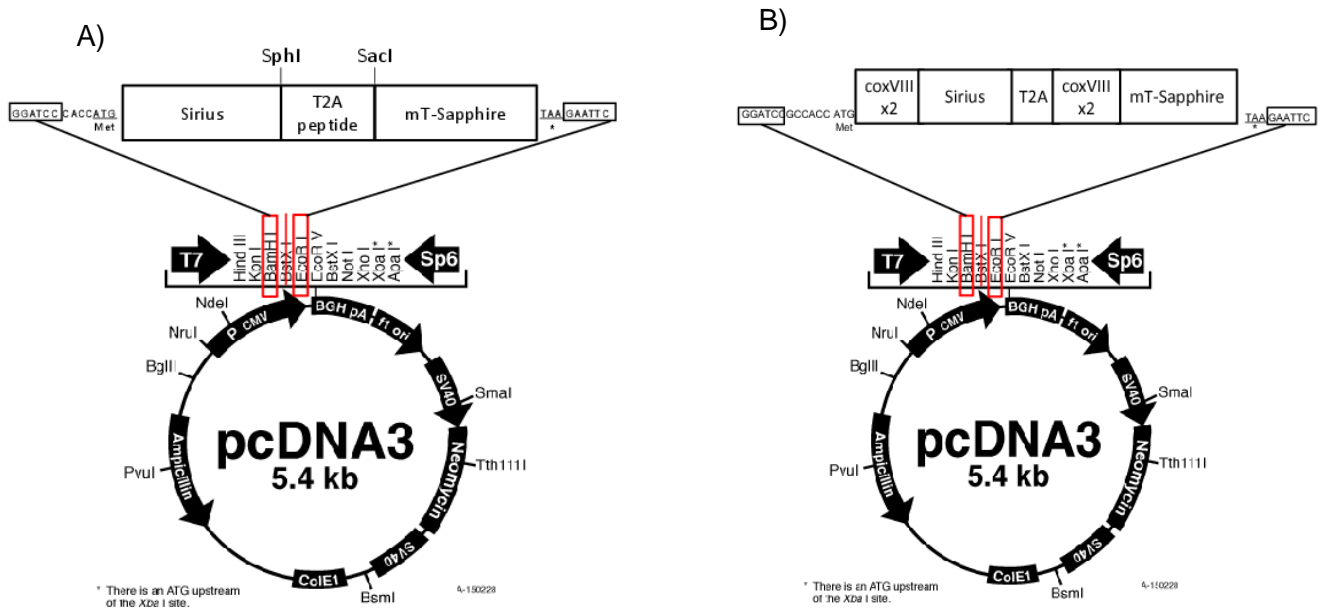


Figura 3.7 Plásmidos pcDNA3 para la expresión del sensor gTemp en células de mamífero. Las dos proteínas que conforman el sensor se encuentran unidas por un péptido T2A. El diseño de los plásmidos permite la expresión citoplasmática (A) y mitocondrial (B) al emplear como tag de direccionamiento la subunidad VIII de la enzima Citocromo C oxidasa. Figuras tomadas de Addgene.org.

3.4 Valores reportados de temperatura intracelular

En la última década se han acumulado reportes en la literatura que afirman que al estimular a la célula o incluso en condiciones fisiológicas, existen diferencias de temperatura intracelular. Dentro de dichos reportes se encuentran los que se describen a continuación.

Arai et al. (2014) registraron cambios de temperatura en el retículo endoplásmico (ER) de células HeLa. Se ha propuesto que el ER es el segundo organelo termogénico, por lo que resulta interesante estudiarlo. En este trabajo los autores emplearon a la molécula ER thermo yellow, un fluoróforo con afinidad al organelo en cuestión (coeficiente de correlación de Pearson = 0.9). La captura de imágenes se realizó en un microscopio confocal con incubación a 37 °C. Para realizar las mediciones al interior de este organelo se empleó ionomicina. Este ionóforo rompe el gradiente de calcio citosol-ER y provoca el desacople de la ATPasa de calcio, llevando a la producción de calor. A través de este acercamiento los autores encontraron un aumento de 1.7 °C respecto a su temperatura inicial.

Por otro lado Nakano et al. (2017) construyeron y reportaron al sensor gTemp. Para probar su funcionamiento realizaron mediciones en núcleo, mitocondria y citoplasma de células HeLa. Dichas mediciones se abordaron a través de 2 estrategias experimentales. Para las mediciones en la matriz mitocondrial los autores desacoplaron la fosforilación oxidativa (OXPHOS) empleando carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP); encontrando una diferencia de entre 6-9 °C respecto a su temperatura inicial. En el caso de las mediciones de núcleo y citoplasma, gTemp se expresó en ambos sitios y se determinó la diferencia de temperatura en condiciones basales; encontrado una diferencia de 2.9 °C entre ellos. En todos los experimentos se empleó un microscopio de epifluorescencia con control de de temperatura a 37 °C

Otro de los resultados más controversiales ha sido el obtenido por Chrétien et al (2018), quienes al desacoplar la fosforilación oxidativa en células HEK-293 encontraron una diferencia de entre 10-12 °C respecto a la temperatura inicial. Se sabe que dicho aumento de temperatura ocurre dentro de la mitocondria debido a que en estudios previos, se demostró que el sensor MTY, empleado en este estudio, interacciona con la enzima aldehído deshidrogenasa 2 mitocondrial (ALDH2) (Kim Y, et al. 2011). Además de que en ensayos de colocalización se determinó una fuerte interacción con las mitocondrias. Para efectuar las mediciones los autores emplearon un espectrofluorímetro Xenius XC acoplado a un dispositivo FireSting O₂, que permite monitorear en forma simultánea el consumo de oxígeno, la intensidad de fluorescencia y la temperatura del medio. Adicionalmente se determinó que la tasa de consumo de oxígeno tiene una relación directamente proporcional a la temperatura, de tal

forma que cuando se registra una disminución en el consumo de oxígeno, se observa un enfriamiento o disminución en la producción de calor.

Finalmente, el resultado reportado por Rajagopal et al. (2019) resulta muy interesante debido a que su medición está basada en cambios de voltaje y no en señales de fluorescencia. Estos autores construyeron un microelectrodo que tras emplear a la molécula BAM15, identificaron un aumento de temperatura de 7.5 K. Ellos sugieren que su resultado proviene no solo de la oxidación de sustratos si no del flujo de protones a través de la membrana.

Con estos resultados se ha establecido una discusión muy activa en donde se han expuesto argumentos y evidencias para apoyar o desmentir este 1x PBS + 0.05 % Tween 20 fenómeno. Los cuestionamientos principales son ¿Qué factor o factores podrían explicar la existencia de gradientes de temperatura intracelular? ¿Cuáles serían las fuentes de energía necesaria para lograr un incremento en la temperatura de las dimensiones mencionadas? ¿Las características y compartimentalización de los procesos metabólicos, así como las características bioquímicas de cada organelo, contribuyen a la acumulación localizada de calor? ¿El metabolismo por si solo es capaz de explicar este fenómeno u otros procesos contribuyen en forma paralela? Por ello, ha sido necesario realizar un análisis de los aspectos fundamentales que soportarían una diferencia de temperatura entre los organelos.

3.5 Aspectos termodinámicos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y de la fosforilación oxidativa (OXPHOS)

Las células son sistemas que obedecen a las leyes físicas y químicas fundamentales. En consecuencia, aunque cuenten con enzimas que puedan acelerar reacciones, éstas no pueden promover que ocurran procesos que sean desfavorables. Debido a lo anterior, en las rutas metabólicas se acoplan reacciones energéticamente favorables con las que no lo son. De forma que, la energía que se libera en algunas etapas se aprovecha en otras en las que se requiere energía para que puedan ocurrir. El criterio que determina si un proceso es energéticamente favorable o no, es el cambio en la energía libre (ΔG). Esta se define como la energía disponible en un sistema para realizar un trabajo. Aquella fracción que no se utiliza, se libera como calor, aumentando la entropía del sistema. Si el proceso disminuye la energía libre ($-\Delta G$) se habla de un proceso energéticamente favorable o exergónico; mientras que aquellos procesos cuya energía libre aumenta ($+\Delta G$) son energéticamente desfavorables o endergónicos.

Dentro del metabolismo celular, la oxidación fosforilativa (OXPHOS) es el principal mecanismo de generación de energía (Lowell & Spiegelman, 2000; Lucia et al., 2015; Vazquez-Duhalt, 2002), debido a que la oxidación de acarreadores electrónicos, como NADH y FADH₂ es altamente exergónica. Tan solo la oxidación de un mol de NADH tiene un ΔG de -220 kJ/mol (Nath, 2016). La energía liberada tras la oxidación de los acarreadores en la cadena transportadora de electrones se emplea para la formación de ATP (Deshpande & Mohiuddin, 2019); reacción que tiene un ΔG de 30.5 kJ/mol (Nath, 2016). Si se sabe que por cada mol de NADH que se oxida, se sintetizan hipotéticamente 2.5 moles de ATP, se tiene que de los 220 kJ generados, únicamente 76.5 kJ se emplea como energía útil. Si bien los 143.5 kJ restantes (65 %) podrían ser empleados en otros procesos, hay una fracción de dicha energía que se libera como calor (Kang, 2017; Vazquez-Duhalt, 2002). De hecho se ha sugerido que las mitocondrias son las que realizan un aporte mayoritario a la generación de calor (Kang, 2017; Pagliarini & Rutter, 2013). De tal forma que la oxidación completa de un mol de glucosa se generan 2870 kJ/mol, de los cuales 2640 kJ provienen de TCA y de la OXPHOS.

Además de los balances energéticos, el mecanismo de termogénesis descrito para la grasa parda ayuda a comprender el proceso de generación de calor. La grasa parda es un tejido termogénico especializado, formado por los adipocitos marrones. En este tipo celular, se encuentran embebidas en la membrana mitocondrial interna las proteínas desacopladoras de la cadena transportadora de electrones (UCP, por sus siglas en inglés), también conocida como termogenina (UCP1). Estas proteínas cumplen la función de translocar protones desde el citoplasma hasta la matriz mitocondrial. Esta acción provoca el desacople de la OXPHOS debido a la disipación del gradiente de H⁺. Esto acelera la oxidación de sustratos en ausencia de la síntesis de ATP, causando un ciclo fútil que da como resultado la generación de calor (Yu et al., 2000),(Fenzl & Kiefer, 2014),(Jastroch et al., 2012). Se sabe que el desacople de la OXPHOS a través de la UCP1, es un mecanismo altamente regulado, es decir, que se activa a través de señales particulares (señales hormonales y ácidos grasos libres) y que también puede ser inhibido. De hecho, se ha observado que la sola presencia de las UCPs no es suficiente para generar el desacople de la OXPHOS, puesto que se requieren activadores apropiados (Jastroch et al., 2012; Mozo et al., 2006; Nedergaard et al., 2001).

Si bien, el desacople de la OXPHOS como mecanismo de termogénesis no ocurre en células en las que no se encuentren presentes las UCP's o los activadores, se tienen mecanismos alternativos que emulan dicho proceso (Jarmuszkiewicz et al., 2010). En la mayoría de los estudios de temperatura intracelular, se han empleado moléculas desacopladoras de la fosforilación oxidativa, con la intención de generar calor al interior de la célula y comprobar la funcionalidad de las moléculas propuestas.

Ciertamente la termometría intracelular es un área de investigación de reciente desarrollo, por lo que se ha generado controversia respecto a si los valores de temperatura reportados pueden explicarse a través del metabolismo celular o si se trata de errores de observación relacionados a las técnicas hasta ahora empleadas (Baffou et al., 2014, 2015; Nakano & Nagai, 2017; Suzuki et al., 2015). Aunque en los diferentes trabajos se ha buscado descartar fuentes de error en las mediciones, es necesario realizar estudios futuros para ayudar a contestar las interrogantes que se han generado al respecto.

3.6 Metabolismo energético y producción de lactato en células CHO

Una de las características de las células de ovario de hámster chino es que realizan glicólisis aeróbica (efecto Warburg). Como resultado se favorece la producción de lactato aún en la presencia de oxígeno (Bulté et al. 2020; Compan et al. 2015). El lactato es un metabolito relevante debido a que es un subproducto tóxico que tiene efectos negativos sobre las células y sobre las proteínas de interés; además es un indicador de la eficiencia del metabolismo celular (Wahrheit et al., 2014). Para comprender mejor los efectos del lactato, es necesario analizar cómo es que dicha molécula se forma, así como las implicaciones de su acumulación en el medio de cultivo.

Se sabe que cuando la glucosa ingresa a la célula, se metaboliza a través de glicólisis. El producto final de la vía son dos moléculas de piruvato por una de glucosa, que pueden seguir dos caminos diferentes. En el primero de ellos, el piruvato ingresa a la mitocondria y es transformado a acetil Co-A, a través del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa. El acetil-CoA continúa hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), donde se genera el NADH utilizado en la cadena transportadora de electrones (ETC). Como resultado se obtiene CO₂, H₂O y ATP (Wahrheit, Nicolae & Heinzle, 2011). En el segundo camino, las moléculas de piruvato son convertidas en lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Teóricamente, el lactato se forma cuando la célula no tiene suficiente oxígeno disponible al cual pueda transferir los electrones en la ETC. En ese escenario, existe dificultad para regenerar el cofactor NAD⁺. Por ello, se favorece la formación de lactato como un mecanismo alternativo (Nelson et al. 2005; Lowell & Spiegelman, 2000). Dicha reacción, incluye la oxidación de NADH, por lo que se regenera el NAD⁺ y la célula puede continuar con los procesos que requieren de dicho cofactor. No obstante, la reacción de formación de lactato es un ciclo fútil, en donde, no hay generación de productos aprovechables inmediatos y que además incluye un gasto energético. En consecuencia, la formación de lactato se traduce en un uso ineficiente de la fuente de carbono, pues cada molécula de lactato formada implica gasto energético, además de disminuir la cantidad de ATP que se produciría por la vía oxidativa (Wahrheit J et al. 2014).

Cabe señalar que en células CHO, la formación de lactato no está relacionada a la baja disponibilidad de oxígeno, sino a la glicólisis aerobia, donde hay consumo rápido de glucosa y glutamina, con generación de lactato, aún en la presencia de oxígeno (Zagari et al., 2013). Existen diversos estudios que a nivel molecular han propuesto soluciones a la acumulación de lactato, entre los más recientes, el reportado por (Bulté et al. 2020), quien a través de la sobreexpresión del transportador mitocondrial de piruvato (MPC), lograron disminuir la producción de lactato en un 50 %.

3.7 Estudios de temperatura intracelular en células CHO

Existen 2 reportes en los que se propusieron sensores moleculares con potencial para realizar mediciones de temperatura en células CHO. El primero de ellos fue realizado por Chapman et al. (1995), quienes propusieron el uso de laurdano y NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) para monitorear cambios en la temperatura y la dinámica de las membranas celulares. El segundo, propone el uso del complejo Eu-TTA (europio (III) tenoiltrifluoroacetona), para monitorear la generación de calor en células modificadas que expresaban el receptor m1-muscarínico (Zohar et al., 1998). Sin embargo, en ninguno de los dos estudios lograron obtenerse resultados concluyentes, debido a que las señales emitidas por los sensores seleccionadas eran afectadas por el pH y la polaridad del medio.

Salvo los estudios antes mencionados, no existen evidencias de cómo se comporta la temperatura en el interior de las células CHO. Adicionalmente, no se tiene información sobre si la temperatura intracelular es una variable con efecto sobre la síntesis y producción de proteínas recombinantes, el plegamiento, la glicosilación, etc; o bien si la temperatura intracelular podría ser empleada como una herramienta de monitoreo del estado celular. Debido a esto y a la relevancia que tienen las células CHO en la industria farmacéutica es importante realizar estudios que permitan en primera instancia determinar si existen diferencias de temperatura como los mencionados con anterioridad y posteriormente, relacionar dicha variable con estados celulares o condiciones particulares. El objetivo será que en el futuro se genere información que ayude a diseñar o plantear estrategias para mejorar los procesos de producción de proteínas recombinantes.

4 Hipótesis

Las células de ovario de hámster chino (CHO) presentan una diferencia de temperatura entre las mitocondrias y el citoplasma.

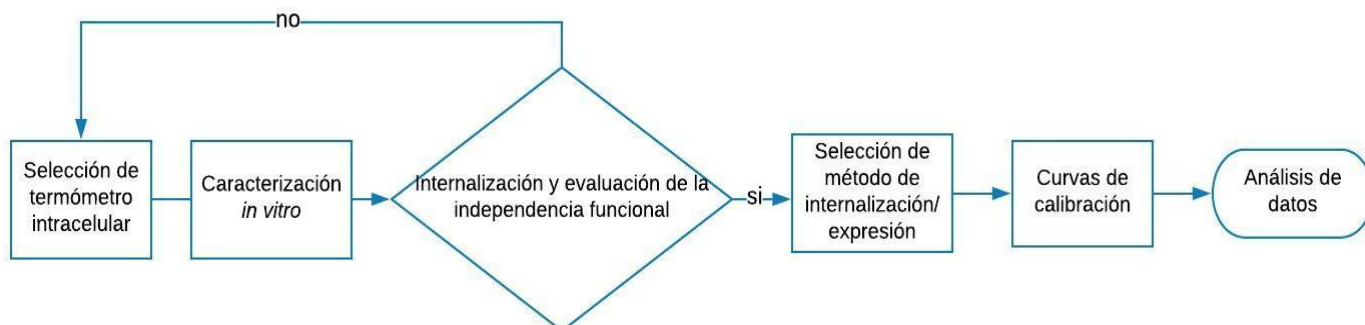
5 Objetivo general

Comparar la temperatura mitocondrial y citoplasmática en células de ovario de hámster chino (CHO)

6 Objetivos particulares

- Seleccionar un sensor de temperatura intracelular.
- Evaluar la independencia funcional de un termosensor, respecto a la concentración del sensor, pH y fuerza iónica.
- Comparar la temperatura mitocondrial y citoplasmática de células CHO

7 Estrategia experimental



8 Metodología

8.1 Selección de un sensor para medir la temperatura intracelular

A través de una revisión bibliográfica, se buscaron moléculas que pudieran funcionar como sensores de temperatura intracelular. De ello se evaluaron las siguientes opciones:

- Mito Thermo Yellow (MTY). Molécula fluorescente cuya estructura base es rosamina. Fue sintetizada por (Y. H. Ahn et al., 2007) y reportada como sensor de temperatura por (Arai et al., 2015a). MTY fue obtenida a través de química combinatoria, por lo que la ruta de síntesis original da como resultado un conjunto de 240 compuestos diferentes. En este trabajo se propusieron algunas adecuaciones a la secuencia original de reacciones en la ruta de síntesis. Dichas adecuaciones conducen a la síntesis de MTY como único producto (Apéndice 11.1 Ruta de síntesis de Mito Thermo Yellow).
La intención de generar esta ruta alternativa es que en el futuro pueda sintetizarse y analizarse.
- Termómetro polimérico fluorescente FDV-0005. Este polímero fluorescente fue sintetizado y reportado por (Uchiyama et al., 2015). Es un copolímero formado por un monómero termosensible, un monómero de naturaleza catiónica y dos monómeros fluorescentes. La unidad termosensible es termomórfica, por lo que las interacciones de la molécula con el solvente se modifican con el cambio de temperatura. Adicionalmente, los autores reportaron que puede atravesar fácilmente las membranas sin necesidad de emplear microinyección. FDV-0005 se encuentra disponible de manera comercial, por lo que se adquirió a través de Funakoshi (Tokio, Japón.2017).

-
- gTemp. Sensor fluorescente genéticamente codificado, compuesto por dos proteínas mutantes de GFP: Sirius y monomericTurbo-Sapphire ((Nakano et al., 2017a)). Para su expresión en células de mamífero, ambas secuencias se encuentran codificadas en el vector pcDNA3 . Además, se encuentran disponibles dos versiones del mismo vector, una para expresión citoplasmática (gTemp-Plásmido #89583) y otro para expresión mitocondrial(mito_gTemp -Plásmido #109117). Ambos plásmidos fueron adquiridos a través de Addgene (Watertown,Massachusetts, USA).

8.2 Producción de proteínas fluorescentes Sirius y mT-Sapphire para caracterización *in vitro* de gTemp

Para caracterizar gTemp, se produjeron ambas proteínas de forma independiente. Para ello, se emplearon cepas de *E. coli* productoras de Sirius (codificada en el plásmido pJOQ) y mT-Sapphire (codificada en el plásmido pRSET). Ambas cepas fueron proporcionadas por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA/IBt) y por el Dr. Takuya Nishigaki, respectivamente (Addgene Watertown, Massachusetts, USA).

De colonias frescas se generaron glicerolos de ambas cepas, que se resguardaron a -70°C . Se empleó una relación 1:1 de caldo de cultivo:glicerol al 80 % (750 μL :750 μL). Los crioviales se colocaron en hielo seco y tras unos minutos, se resguardaron en ultracongelación.

Para la producción de Sirius y mT-Sapphire, se sembraron inóculos en tubos de ensaye con 4 mL de medio LB, suplementados con el antibiótico indicado para cada cepa. Tras 12 h de incubación, se inocularon matraces bafleados de 500 mL con 100 mL de medio LB líquido. Los cultivos se incubaron durante 72 h a 25°C y 200 rpm. Posteriormente, el paquete celular fue recuperado por centrifugación (Eppendorf 5810R con rotor de cubo basculante) por 5 min a 4°C a 2500xg. Se ajustó la concentración a 200 g/L de biomasa y se adicionó el volumen necesario de lisozima (50 mg/mL) para ajustar a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La suspensión se incubó por 20 min a temperatura ambiente y se adicionaron 0.5 μL de benzonasa (Sigma Aldrich, 200 unidades/ μL) y el volumen necesario de solución 1 M MgCl_2 para ajustar a una concentración final de 1mM MgCl_2 . Las muestras se incubaron por 20 min adicionales y se completaron 5 ciclos de 15 s de sonicación por 45 s de descanso, hasta completar 60 s a una amplitud de 55 % (equipo Qsonica Q700). El lisado se centrifugó nuevamente y el sobrenadante se resguardó para el siguiente paso.

La purificación se realizó por cromatografía de afinidad a níquel con agarosa Ni-NTA (30210 QIAGEN, Dusseldorf, Alemania). La columna se empacó con 1 mL de agarosa y se permitió la

sedimentación. La columna se lavó con 20 mL de agua miliQ. Para la elución se empleó un gradiente de imidazol a concentraciones de 50, 100 y 200 mM de imidazol. Para seleccionar las fracciones puras, se realizaron geles de poliacrilamida al 12 %, en condiciones reductoras, teñidos con azul de Coomassie.

Las proteínas purificadas se resguardaron a 4°C, protegidas de la luz.

8.3 Obtención de espectros de emisión y evaluación de la dependencia de la intensidad de fluorescencia (IF) a la temperatura *in vitro*.

Para estos experimentos *in vitro* se empleó un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS55 acoplado a un sistema de control de temperatura conformado por los módulos PTP1 (Peltier Temperature Programer) y PCB 1500 (Water Peltier System). Se empleó una celda de cuarzo de volumen reducido. El volumen mínimo de muestra empleado fue de 150 µL. Las diluciones se prepararon en PBS filtrado por membrana de PVDF de 0.45 µM y degasificadas con N₂.

Se realizaron barridos de emisión para obtener los espectros a temperatura ambiente para verificar la longitud de onda de máxima emisión, a una velocidad de 300 nm/min, de 380 a 700 nm. Los espectros se realizaron de forma independiente para cada fluoróforo fijando la longitud de onda de máxima excitación correspondiente a cada molécula.

Para evaluar la dependencia de la intensidad de emisión respecto a la temperatura, se obtuvieron los espectros de emisión, modificando la temperatura en 5 °C, desde 25 °C a 50 °C. Estas determinaciones se realizaron por triplicado, empleando la misma muestra para evaluar todas las temperaturas, siendo todas las muestras independientes. Adicionalmente se extrajo el valor máximo de emisión del conjunto de datos de cada espectro y con ellos se determinó el comportamiento de la razón de las intensidades de fluorescencia respecto a la temperatura.

Para FDV-0005, se emplearon soluciones a concentración de 0.1 µg/µL del polímero y una longitud de onda de excitación de 458 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado con soluciones independientes.

Para gTemp, se realizaron determinaciones independientes para Sirius, mT-Sapphire y la combinación de ambas proteínas, a concentraciones de 0.05 µg/µL para cada proteína y cantidades equimolares para la mezcla. Las longitudes de onda de excitación fueron 399 nm para mT-Sapphire y 360

nm para Sirius y la combinación de ambas. Las determinaciones se realizaron por triplicado, empleando la misma solución para cada barrido completo de temperatura.

Además se realizaron 15 espectros consecutivos de la misma muestra. Estas determinaciones se realizaron a 25 y 50°C para Sirius y mT-Sapphire.

8.4 Evaluación de la sensibilidad de la señal de fluorescencia a condiciones ambientales *in vitro*

En la evaluación de la independencia de la señal de fluorescencia respecto a pH y fuerza iónica, se prepararon buffers de fosfatos ajustadas a pH 9, 7 y 5 y soluciones a concentración de 125, 150 y 175 mM de KCl. Cada solución fue filtrada por membrana de PVDF de 0.45 µm y degasificadas con N₂. Estas determinaciones se hicieron manteniendo fija la concentración del sensor.

Para evaluar la independencia respecto a la concentración del sensor, se realizaron soluciones a diferentes concentraciones de cada molécula.

Las determinaciones se realizaron por triplicado en un lector de microplacas Sinergy H1 Biotek. En todos los casos se registró la intensidad de fluorescencia en las longitudes de onda de interés, modificando la temperatura cada 10 °C, de 20°C a 50°C. Con ello, se determinó la razón de fluorescencia en cada condición

8.5 Cultivo celular

Las células CHO-S empleadas en los experimentos provinieron de un banco elaborado a partir del kit de Invitrogen Freedom™ CHO-S™(A1369601, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA). Para cultivar las células, se empleó medio Cellvento® 200 V ®, suplementado a 8 mM de glutamina, incubando a 37 °C, 130 rpm y 5 % de CO₂. Los subcultivos se realizaron al alcanzar una concentración celular de 4x10⁶ células/mL.

Para el monitoreo de la concentración celular, se utilizó un equipo Multisizer 3 Coulter Counter (Beckman Coulter, Indianapolis, USA) y para determinar la viabilidad se realizó conteo en cámara de Neubauer (BRAND), con azul de tripano (Sigma Aldrich T8154).

Para los conteos y determinación de eficiencias de transfección, se empleó un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon Eclipse TE3000, con un objetivo Plan Fluor 10x/0.3.

8.6 Internalización de FDV-0005 en células HEK-293

Se cultivaron células HEK-293 a 37°C y 5 % de CO₂, en medio DMEM (D0819 Sigma Aldrich), suplementado con 5 % de suero fetal bovino, en cajas T25.

Se sembraron 2mL de suspensión celular a 1x10⁶ células/mL en placas Fluorodish de 35 mm con fondo de vidrio (World Precision Instruments, USA). Al alcanzar entre 30 y 50 % de confluencia, las células fueron lavadas con solución de glucosa al 5 %. Posteriormente, en placas independientes se adicionaron soluciones de FDV-0005 a concentraciones de 0.5 y 1 µg/µL. Las células se incubaron por 10 min a 37°C. Finalmente se retiró la solución y se agregó medio Cellvento®.

8.7 Internalización de FDV-0005 en células CHO-S

Para las pruebas de internalización se utilizaron células CHO-S cultivadas por 48 h, a una viabilidad >96 %. Las células se centrifugaron por 10 min a 200 x g y se re-suspendieron en solución de glucosa al 5 % p/v. Se ajustó la concentración a 1x10⁶ células/mL. A la suspensión preparada, se adicionó el volumen correspondiente de solución stock de la sonda fluorescente para ajustar a concentraciones de 0.01 y 0.1 µg/µL. Se dejó incubar por 10 min a 25°C, protegiendo de la luz. Una vez transcurrido el tiempo, las células se lavaron con PBS y se re-suspendieron en medio Cellvento®.

Además, se probó una condición extra a una concentración de 0.1 µg/µL, incubando las células por 40 min.

8.8 Internalización de FDV-0005 en células CHO-S por electroporación

Como una estrategia alternativa de internalización, se electroporaron las células como se describe a continuación. Se emplearon células sub-cultivadas por 48 h previas al ensayo, éstas se encontraban en fase exponencial y con viabilidad superior al 95 %. Se centrifugaron por 5 min a 150 x g y se lavaron en 2 ocasiones con 20 mL de medio CD-CHO (10743029 Gibco, ThermoFisher Scientific). Finalmente, se ajustó la concentración celular a 16.7x10⁶ células/mL, de tal forma que al adicionar 60 µL a la celda de electroporación se tuviera 1x10⁶ células/mL. Se adicionaron 150 µg de polímero.

Se emplearon celdas de electroporación para bacterias (1 mm) y el pulso eléctrico fue de 360 volts/0.5 ms. Una vez electroporadas, las células se re-suspendieron en placas fluorodish con 2 mL de medio suplementado con 8 mM de glutamina. Se incubaron por 24 h a 37 °C.

Como controles se probaron los siguientes tratamientos:

-
- Células electroporadas sin adición de polímero
 - Células incubadas por 10 min a 37°C con 0.1 µg/µL
 - Células incubadas por 10 min a 37°C con 1 µg/µL
 - Células incubadas por 24 h a 37°C con 0.1 µg/µL
 - Células incubadas por 24 h a 37°C con 1 µg/µL

En todos los casos, las células fueron observadas en un microscopio confocal de disco giratorio 3I tipo Zeiss Observer Z.1 Invertido, acoplado a una cámara Andor iXon. (Disponible en el LNMA). Se ajustó una exposición de 100 ms. La longitud de onda de excitación fue de 440 nm y la emisión se colectó a longitudes de onda de 561 y 488 nm.

8.9 gTemp

8.9.1 Recuperación de vectores

Los plásmidos se recibieron como DNA adsorbido en papel filtro, por lo que fue necesaria su recuperación. Para ello, se recortó el papel filtro y se sumergió en 60 µL de buffer TE (Tris-EDTA). Se incubó por 10 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, se transformaron *E. coli* DH5α quimiocompetentes para la propagación de plásmido. Se mezclaron 4 µL de la solución de DNA extraída del papel filtro con las células. Se incubaron 20 min en hielo y se aplicó choque térmico a 44°C durante 1 min. Se incubaron nuevamente en hielo por 5 min. En seguida se adicionó 1 mL de medio LB y se incubó por 1 h a 37°C en agitación.

Transcurrido el tiempo, se plaquearon las células en medio LB sólido con ampicilina y se incubaron por 12 h. A continuación, se picaron colonias aisladas, se sembraron en medio LB líquido en tubos de ensaye y se incubaron a 37°C por 12 h. A partir de estos cultivos se generaron los glicerolos para conservar a -70°C a largo plazo. Se empleó una relación 1:1 de caldo de cultivo:glicerol al 80 % (750 µL:750 µL). Los crioviales se colocaron en hielo seco y tras unos minutos se resguardaron en ultracongelación.

Con el volumen restante de los cultivos líquidos se purificaron los plásmidos a través del kit ZymoPURE Plasmid MiniPrep (ZymoRESEARCH). Para esto se usó el protocolo reportado en el sitio web de ZymoRESEARCH (<https://www.zymoresearch.com/collections/zymopure-plasmid-kits/products/zymopure-ii-plasmid-miniprep-kit>).

Una vez concluido el protocolo de purificación de los plásmido, se determinó la concentración de DNA y las relaciones 260/280 y 260/230 a través de NanoDrop.

8.9.2 Verificación del patrón de restricción de plásmidos pcDNA3

Se realizaron digestiones para verificar el patrón de restricción de cada plásmido. Se emplearon 2 μL de NE Buffer™ 2.1 (New England, Biolabs), 2 μL del plásmido purificado, 1 μL de enzima BamH I (New England, Biolabs), y se ajustó el volumen a 20 μL con agua grado biología molecular. Se incubó a 37°C por 1.5 h, se tomó una alícuota de 5 μL para verificar el tamaño del plásmido linealizado. En seguida, se adicionó 1 μL de EcoR I (New England, Biolabs), se ajustó la concentración de buffer 2.1 a 10 % de la reacción, se completó el volumen a 20 μL y se incubó por 1.5 h más.

Una vez transcurrido el tiempo, se separó el DNA en un gel de agarosa a 0.8 %. Se tiñó por 30 min y se verificó el tamaño de las bandas obtenidas.

8.9.3 Verificación por PCR de plásmidos pcDNA3

Para el diseño de oligonucleótidos, se seleccionaron secuencias de 27 bases de longitud. A través del sitio web Oligo Analyzer (Integrated DNA technologies Inc, USA <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), se verificó que no existiera la formación de horquillas en las bases del extremo 3' y que no existieran más de tres bases que permitieran el apareamiento entre ellos (self-priming). La síntesis se realizó en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM (USSDNA/IBt).

Para la reacción, se empleó la enzima Phusion High Fidelity (New England, Biolabs) y se empleó la mezcla de reacción indicada en la Tabla 7.1

Tabla 8.1 Mezcla de reacción para PCR

Componente	Volumen (μL)	Concentración
5X Phusion HF	5	1X
10mM dNTP's	0.5	200 μM
10 μM forward primer	1.25	0.5 μM
10 μM reverse primer	1.25	0.5 μM
Templado	Variable	<250 ng

Phusion DNA polimerasa	0.25	1 unidad/50 μ L PCR
DMSO	0.75	3%
Agua libre de nucleasas	~25	-

Las condiciones de la reacción se indican en la Tabla 7.2. Se realizó un gradiente de temperatura entre 55 y 65 °C, eligiendo las temperaturas de 65, 61.1 y 55 °C como las más adecuadas.

Tabla 8.2 Protocolo de reacción de PCR

Condición	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	98	30
	98	10
Ciclos	65, 61.1, 55	30
	72	30
Extensión final	72	600

Se realizó un gel de agarosa 0.8 % para verificar el tamaño de los productos de PCR.

8.9.4 Propagación de vectores de transfección para expresar gTemp

Para producir el stock de los plásmidos para transfectar, se realizaron cultivos en matraz de 500 mL con 100 mL de volumen de llenado en medio LB con ampicilina. Los pre-inóculos se generaron en tubos de ensayo inoculados con los crioviales preparados previamente. En ambos casos, los cultivos se incubaron a 37 °C y 200 rpm por 12 h.

Transcurrido el tiempo, los plásmidos se purificaron en esterilidad a través del Kit QIA filter Plasmid MaxiPrep (QIAGEN Cat.12262,Dusseldorf, Alemania). Además, se determinó la concentración de DNA por NanoDrop y se determinaron las relaciones 260/280 y 260/230 para asegurar su pureza.

Para verificar la esterilidad de los plásmidos purificados, se realizó una prueba en placas de 96 pozos. Se colocaron 200 μ L de medio Cellvento® en diferentes pozos. En forma independiente se inocularon por triplicado 2 μ L de cada plásmido, agua estéril (control negativo) y agua corriente (control positivo). La placa se incubó por 72 h y posteriormente se sembró en LB sólido. A su vez, dicho cultivo se incubó durante 72 h y acto seguido, se realizó inspección visual para determinar si existía crecimiento bacteriano.

8.10 Selección de método de transfección para expresar gTemp

8.10.1 Lípidos catiónicos

Para transfectar células CHO-S con lípidos catiónicos se utilizó el kit Freestyle Max (A1369601 ThermoFisher Scientific) , cuyo protocolo se describe a continuación: 24 h previas a la transfección, las células se subcultivaron entre $5 - 6 \times 10^5$ células/mL. El día de la transfección, se verificó que la viabilidad se encontrase por arriba del 95 %.

Se sembraron 1×10^6 células/mL en 27 mL de medio CD FortiCHO suplementado con glutamina 8 mM. Se prepararon por separado tubos que contenían 1.45 mL de medio OptiPRO, al que se adicionaron 50 μ L de Freestyle y un tubo más que contenía 1.4 mL de OptiPRO con 50 μ g de DNA. Se adicionó el medio que contenía Freestyle al DNA. Se incubó por 10 min y finalmente se adicionó gota a gota al matraz previamente preparado.

Las células se incubaron a 37°C, 8 % de CO₂ y 130 rpm. Se determinó la viabilidad y eficiencia 48 h post-transfección. Para determinar la eficiencia de transfección, se empleó una lámpara de mercurio, acoplada a un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon eclipse TE3000, con objetivo 10x/0.3. Empleando una cámara de Neubaer optimizada, se contabilizaron el número de células fluorescentes y el número total de células.

8.10.2 Electroporación

Para realizar las transfecciones por electroporación se utilizó un sistema Xcell Gene Pulser de Bio-Rad, con celdas para células de mamífero de 0.4 cm.

Las células fueron tratadas como se indicó en el apartado 8.8 . El volumen de trabajo en la celda fue de 700 μ L a una concentración celular 12×10^6 /mL y se adicionaron 40 μ g de plásmido.

El protocolo empleado fue un pulso exponencial de 280 V, 800 mF con resistencia infinita. Una vez electroporadas, las células se re-suspendieron en cajas T75 en medio Cellvento® suplementado con glutamina 6 mM. Se incubaron a 37°C / 5 % de CO₂ durante 48 h. Transcurrido el tiempo se determinó viabilidad y eficiencia de transfección.

8.11 Estandarización de las condiciones de microscopía para experimentos *in vivo* con gTemp

Para establecer las condiciones de captura de imágenes por microscopía de epifluorescencia, se emplearon células a 48 h post transfección, que fueron centrifugadas, lavadas y resuspendidas en PBS.

Las imágenes fueron capturadas en un microscopio Nikon Eclipse TE300 con un objetivo de 60 X oil inmersión (PlanApo N, con apertura numérica de 1.42). Como fuente de iluminación se empleó un LED que emite luz a 360 nm.

El sistema de captura cuenta con una cámara Andor (Andor Technology, Belfast, Northern Ireland), con el software de adquisición Andor IQ2 (Oxford Instruments, Ireland). Para los experimentos que requerían temperaturas específicas, se empleó un controlador TC-202A, de Warner Instruments.

Se empleó un tiempo de exposición de la cámara de 1500 ms y la ganancia máxima del equipo (1224). En esas condiciones, la relación señal/ruido (SNR) encontrada era baja, por lo que se empleó un factor binning (B_n) de 4x4. Este factor es una estrategia utilizada en análisis de imágenes, en la que previo a la digitalización se combinan los datos de profundidad de un número definido de píxeles. Aunque este proceso disminuye la resolución espacial, permite mejorar la relación señal-ruido (SNR).

Respecto a los filtros de emisión, se empleó el D425/60x para capturar la señal de Sirius entre 395 nm-455 nm. Mientras que para mT-Sapphire se empleó el filtro de emisión HQ560/50M que permite capturar señales entre 535 nm-585 nm.

8.12 Curvas de calibración de gTemp *in vivo*

Para realizar la curva de calibración, se emplearon células a 48 h post-transfección, lavadas y resuspendidas en PBS degasificado. De dicha suspensión celular se colocaron 500 μ L en un cubreobjetos circular montado en una cámara celular Attofluor de 35 mm de diámetro.

Empleando la configuración seleccionada para cada proteína en microscopio de epifluorescencia (Sección 8.11), se eligieron campos con al menos 10 células fluoresciendo y se tomaron imágenes a diferentes temperaturas.

Las determinaciones se realizaron de 30 a 50°C, con incrementos de 5°C y permitiendo que el sistema se equilibrara por 5 min en cada incremento.

8.13 Ensayos *in vivo* con FCCP Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona)

Las células fueron tratadas como se indicó en el apartado 8.8 y sembradas en placas Fluorodish a una concentración celular de 0.5×10^6 /mL. Se incubaron a las condiciones antes mencionadas. Previo al ensayo se retiró el medio, se lavaron las células y se adicionaron 0.5 mL de PBS degasificado y precalentado a 37°C.

Se capturó una imagen inicial de campo claro. Posteriormente se grabaron videos de 10 min, adicionando a los 30 segundos después de iniciar la captura de imágenes, una solución de FCCP 100 μ M. Como control de fotoblanqueo, se tomó video de la misma duración en el que no se adicionó reactivo alguno. Posteriormente se realizó el análisis de la intensidad de fluorescencia por célula presente en el campo, a lo largo del tiempo.

9 Resultados y discusión

Uno de los aspectos fundamentales de este trabajo fue la selección de una herramienta de medición. Pese a que se han reportado varias decenas de sondas que detectan cambios de temperatura (Bai & Gu, 2016; Okabe et al., 2018), resulta necesario valorar las características que favorecen y limitan su desempeño. De esta forma, se puede realizar una selección racional de las moléculas a evaluar.

Dentro de los criterios que se consideraron, se encuentran los antecedentes publicados, el método de detección, la forma de incorporación a las células, las propiedades fotofísicas, si se encontraban disponibles de manera comercial o si necesitaban sintetizarse, así como el costo.

A través de análisis de estos criterios, se propuso el uso de 3 herramientas: Mito Thermo Yellow, FDV-0005 y gTemp, que fueron descritas con anterioridad.

En el caso de MTY únicamente se propusieron algunas adecuaciones a la ruta de síntesis, que se reportan en el Apéndice 11.1.

Respecto al sensor polimérico FDV-0005 y gTemp los resultados se describen a continuación.

9.1 Caracterización *in vitro* de FDV-0005

Se realizaron espectros de emisión de fluorescencia de FDV en los que se observó la existencia de dos picos, uno en 495 nm y otro en 535 nm (Figura 8.7 A). Este último corresponde a la unidad DBDThD, cuya intensidad de fluorescencia incrementa proporcionalmente a la temperatura, al igual que la razón entre ambas señales (Figura 8.7 B)

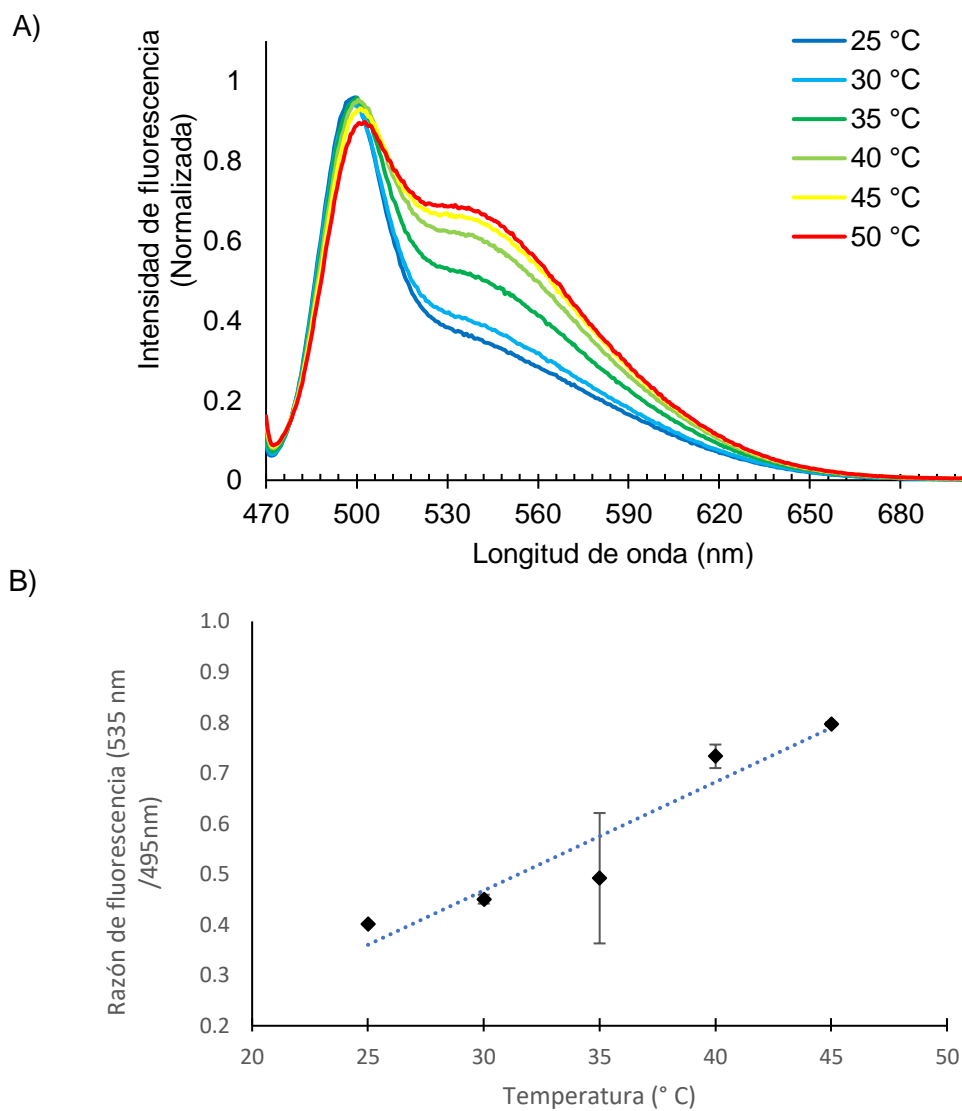


Figura 9.1 Comportamiento *in vitro* de la intensidad de fluorescencia y razón entre las señales del polímero fluorescente FDV-0005 respecto a la temperatura. (A) Se determinaron los espectros de emisión del sensor con excitación a 458 nm. Se empleó un espectrofluorímetro con control de temperatura y una celda de cuarzo de volumen reducido. La dilución del sensor se realizó en PBS filtrado. (B) Del conjunto de datos del espectro se determinó la razón de la intensidad máxima (535 nm/495nm), para cada uno de los fluoróforos que componen a FDV-0005. Las barras de error indican el resultado de 3 determinaciones independientes.

De los valores de intensidad máxima obtenida en cada uno de los espectros de emisión, puede determinarse el comportamiento de la intensidad de ambas unidades fluorescentes. La fluorescencia de DBDThD a 535 nm muestra un aumento de +1.9 % de IF/°C (Figura 8.8). Mientras que la señal proveniente del BODIPY, a 495 nm, tiene una reducción de -0.76 % de IF/°C.

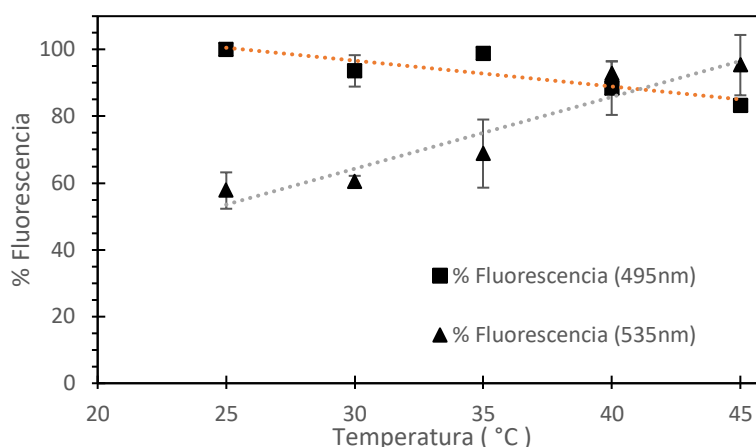


Figura 9.2 Determinación de la sensibilidad de la intensidad de fluorescencia de DBDThD y el BODIPY, que componen al polímero fluorescente FDV-0005 respecto a la temperatura. Los datos se obtuvieron a partir de los espectros de emisión mostrados en la Figura 9.2 (A).

Uchiyama et al.,(2015) reportaron que el intervalo en que funcionaba el polímero es de 25 a 45°C. Para verificar dicha información, se realizaron determinaciones hasta 50°C. Con ello, se observó que a partir de los 45°C la sensibilidad del sensor se reduce de 0.021 a 0.013 %/°C es decir que disminuye 40% respecto al valor inicial. Por lo tanto, en dicho intervalo la resolución respecto a la temperatura sería menor.

Cabe señalar que, aunque la respuesta se observa a través de la modificación de la temperatura, la emisión de DBDThD está relacionada con la polaridad y la formación de puentes de hidrógeno con el solvente, tal como se explicó previamente (sección 3.3.2). A su vez, el BODIPY tiene menor sensibilidad a la polaridad (Uchiyama et al., 2012, 2015).

Si bien la señal no se ve afectada en forma directa por el cambio de la temperatura, si impacta en la estructura del sensor (Figura 8.9). Es así como se modifica el carácter polar o apolar alrededor de los fluoróforos y, por lo tanto, el cambio en la intensidad de fluorescencia.

9.1.1 Evaluación de la sensibilidad a condiciones ambientales en FDV-0005

Idealmente, se esperaría que si existe alguna perturbación en el medio, aunque las intensidades individuales se viesen afectadas la razón entre ellas permanezca constante. Verificar que la razón de las intensidades es independiente de los cambios en el medio es relevante debido a que se sabe que en la célula existen gradientes y compartimentos con condiciones de pH y fuerza iónica distintas. De esta forma, puede asegurarse que las mediciones en los distintos organelos son efecto de la temperatura y no de las condiciones inherentes al sitio de estudio.

Otro de los factores que es importante evaluar es la concentración del sensor. Es necesario probar que la razón es independiente a diferentes concentraciones del fluoróforo, pues la accesibilidad del polímero a los compartimentos celulares es heterogénea.

En la Figura 8.10 A, se observa que la razón de las señales obtenida en función de la temperatura tiene el mismo comportamiento sin importar la concentración del sensor a la que se encuentre.

Respecto a las condiciones de pH (Figura 8.10 B) y fuerza iónica (Figura 8.10 C), la razón de fluorescencia sigue prácticamente la misma tendencia de los 25 a los 45 °C.

Pese a que se observa una tendencia similar entre las condiciones, para emplearse en determinaciones *in vivo* debe realizarse una calibración del sensor. Esto implica la determinación de la intensidad de fluorescencia en las condiciones en que se realizan los ensayos, a diferentes temperaturas. De este modo, puede considerarse la variación que proviene de factores alternos a la temperatura.

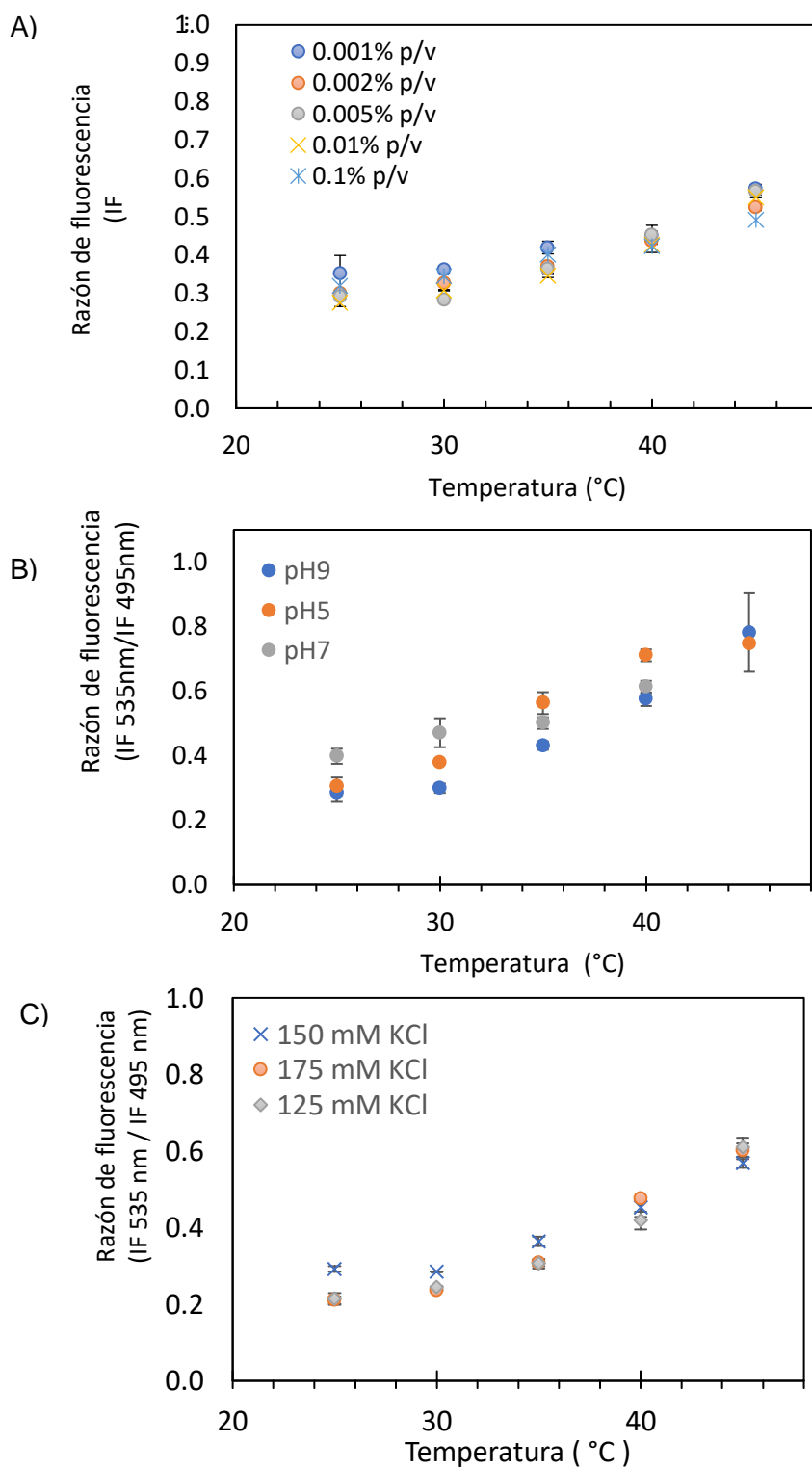


Figura 9.3 Evaluación del comportamiento de la razón de fluorescencia de FDV-0005 a diferentes concentraciones del sensor (A), valores de pH (B) y fuerza iónica(C) pH. Se determinó la intensidad de fluorescencia de DBDThD y el BODIPY empleando una longitud de onda de excitación a 458 nm en un lector de microplacas Sinergy H1 Biotek. Las diluciones se realizaron en PBS y la evaluación de pH en buffer de fosfatos. Las barras de error indican el resultado de 3 determinaciones independientes.

9.1.2 Internalización de FDV-0005 en células HEK-293

Como control positivo de internalización de FDV-0005 se realizaron pruebas con células HEK-293. (Uchiyama et al., 2015) reportaron la síntesis del polímero FDV-0005 junto con el protocolo de internalización para esta línea celular. Ellos encontraron que el polímero se distribuía de manera uniforme al interior de las células, sin importar si el crecimiento era adherente o en suspensión (Figura 8.11). En el presente trabajo, se realizaron ensayos tal y como indican los autores anteriores, pero a diferencia de lo reportado no se observó una distribución homogénea al interior de la célula. Por el contrario, la señal se encontraba distribuida heterogéneamente, tal y como puede apreciarse en la Figura 8.12. Únicamente se observó fluorescencia en algunos sitios, donde la señal se concentra, como si el polímero se encontrara ocluido o acumulado. La distribución heterogénea podría estar relacionada al mecanismo de internalización o bien, al funcionamiento del sensor.

En cuanto al mecanismo de internalización, se ha hipotetizado que este tipo de polímeros

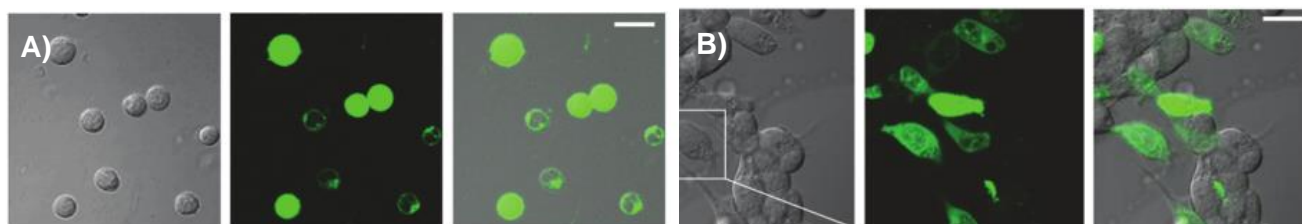


Figura 9.4 Internalización del polímero fluorescente FDV-0005 en células MOLT-4(A) y HEK-293(B). Tomadas de Uchiyama et al, 2015

fluorescentes ingresan a la célula por la vía de endocitosis mediada por clatrina o permeación

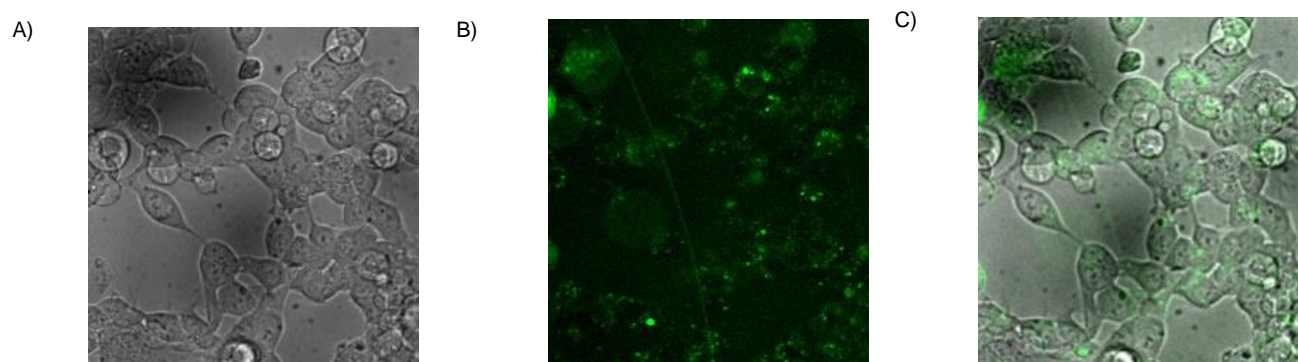


Figura 9.5 Experimentos de internalización de FDV-0005 en células HEK-293. En el panel (A) se muestra la imagen en campo claro, en (B) la emisión a 535 nm (LUT Green) y en (C) la sobreposición de A y B. Las imágenes se tomaron por microscopía confocal de disco giratorio ubicado en el LNMA, con láser de excitación a 440 nm y la emisión se colectó a longitudes de onda de 560 nm. Las células se sembraron en placas Fluorodish hasta alcanzar 5% de confluencia. Posteriormente se adicionó FDV-0005 y se incubó por 10 min a 37°C. Se observaron al microscopio una vez concluida la incubación.

química (Tsuji et al., 2013). En ese sentido, se sabe que en células eucariontes es posible la captación de macromoléculas a través de la formación de vesículas o endosomas.

Una vez dentro los endosomas transitan a una etapa temprana en la que se seleccionan moléculas que deben ser recicladas y devueltas a la membrana celular (receptores de superficie que activan la vía de endocitosis). En seguida, se vuelven endosomas tardíos que al fusionarse con vesículas hidrolíticas (provenientes del aparato de Golgi) se convierten en lisosomas. A través de este proceso es como los materiales endocitados son degradados; sin embargo, cuando la sustancia no puede digerirse, permanece en el interior del lisosoma formando cuerpos residuales. Lo que podría explicar el aspecto de la Figura 8.12.

La distribución homogénea reportada por (Tsuji et al., 2013; Uchiyama et al., 2015)) indicaría que si la internalización ocurriera por endocitosis, la molécula debería ser liberada desde el interior de las vesículas al citoplasma. Sin embargo, los autores no realizaron experimentos para describir el mecanismo de entrada.

Respecto a la permeación química, tampoco se brinda mayor evidencia. Sin embargo, existen algunos ejemplos en la literatura en los que moléculas de gran tamaño pueden translocarse a través de las membranas celulares. Este es el caso de los Nanotubos de Carbón Funcionalizados (CNT's), que, aunque pueden tener longitudes de 300-1000 nm, logran ingresar a la célula tras incubarlos por 60 min a 37°C. En dicho caso, tampoco se ha logrado esclarecer el mecanismo de internalización, pues la evidencia se contrapone y en ocasiones se sugiere que podría ser una combinación de mecanismos, por lo que no se ha llegado a un consenso (Kostarelos et al., 2007); (Lacerda et al., 2012).

En suma, al no tener certeza sobre el mecanismo de internalización, no puede asegurarse que el polímero se incorpore a la célula y se distribuya en forma homogénea.

La otra posible explicación tiene que ver con el funcionamiento de los polímeros termosensibles y de las unidades monoméricas que las conforman.

En la literatura, existen reportes de cómo se comportan algunos monómeros populares, como NIPAM y NNPAM; sin embargo, es deseable conocer cómo se modifica cada estructura en forma particular, ya que, incluso empleando el mismo monómero el comportamiento puede llegar a ser contrario. Por ejemplo, para los polímeros de NIPAM reportados por (Qiao et al., 2012; Uchiyama et al., 2003)),

encontraron una transición opuesta (de globular a extendida y de extendida a globular respectivamente) con el aumento de la temperatura.

En el caso de FDV-0005, no se ha reportado el comportamiento del radio hidrodinámico respecto a la temperatura, por lo que no se tiene certeza de la estructura que debería adoptar respecto al cambio de temperatura. Pese a ello, el comportamiento de la intensidad de fluorescencia podría proporcionar información relevante puesto que se observa una correlación entre el cambio de temperatura y la intensidad de fluorescencia.

Se ha reportado que la molécula DBThD muestra una intensidad de fluorescencia menor en ambientes polares, respecto a los apolares. Dichas determinaciones han sido realizadas a través de espectros de emisión ((Uchiyama et al., 2015)) y al rendimiento cuántico en diferentes solventes (Tabla 9.4) Esto indicaría que la señal aumenta cuando el polímero pasa de una estructura extendida (ambiente polar) a una globular (ambiente apolar).

Al observar los espectros de emisión en la Figura 8.7 A, se tiene que la intensidad de fluorescencia aumenta en forma directa a la temperatura; por lo que podría asumirse que la estructura del polímero se modifica de forma extendida a globular con el aumento de temperatura.

Para ejemplificar como se observa el cambio en la intensidad de fluorescencia de un polímero, cuyo componente fluorescente tiene un comportamiento similar al de FDV-0005, se muestran algunas imágenes de (Qiao et al., 2012). En ese trabajo se reportaron polímeros sintetizados con NIPAM, cuya intensidad de fluorescencia disminuye al pasar del ambiente apolar (estructura globular) a un ambiente polar (estructura extendida).

Cabe resaltar las estructuras que se observa en la Figura 8.10 A. Estas podrían corresponder a estructuras globulares en las que se favorecen las interacciones hidrofóbicas y el aumento en la intensidad de fluorescencia (como se ilustra en la Figura 8.9). A la vez, puede observarse la similitud entre la Figura 8.13 Figura 9.6A y Figura 8.12 B

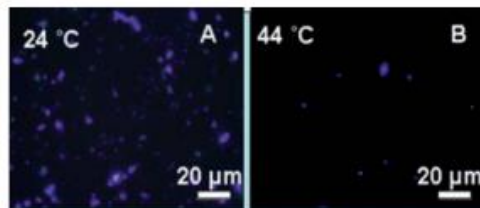


Figura 9.6 Cambio en la intensidad de fluorescencia de un polímero de NIPAM, cuya intensidad de fluorescencia disminuye en ambientes polares. Imágenes tomadas de Qiao et al, 2012..

Pese a que estos argumentos ayudarían a explicar la distribución heterogénea observada en este trabajo, es necesario realizar experimentos adicionales para determinar con certeza lo que ocurre. Por ejemplo, la determinación del radio hidrodinámico a diferentes temperaturas permitiría correlacionar el cambio estructural con la variación en la intensidad de fluorescencia. Dicha información contribuiría a entender la discordancia entre los resultados aquí mostrados y los reportados por (Uchiyama et al., 2015).

Ahora bien, es necesario aclarar que aunque la distribución del polímero no es homogénea, eso no impide registrar la temperatura al interior de la célula.

9.1.3 Internalización de FDV-0005 en células CHO-S

En células CHO se siguió el protocolo de internalización sugerido para células en suspensión MOLT-4 (Figura 8.11 A). Además de estas condiciones, se probaron otras concentraciones semejantes y se prolongó el tiempo de incubación, sin observar resultados positivos. A diferencia de las células HEK-293, en células CHO-S se observó que la internalización del polímero era casi nula, pues el número de células que mostraron señal de fluorescencia era muy bajo.

Uno de los argumentos de (Uchiyama et al., 2015)) es que la internalización depende del tipo de célula. Lo que se corrobora con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que se observa esta diferencia entre las líneas celulares empleadas.

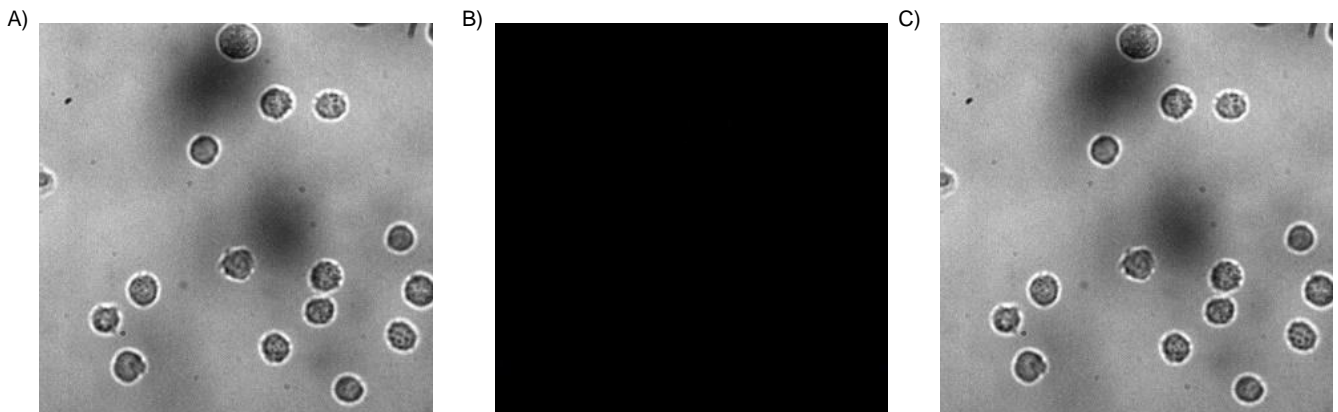


Figura 9.7 Experimentos de internalización de FDV-0005 en células CHO-S. En el panel (A) se muestra la imagen en campo claro, en (B) la emisión a 535 nm (LUT Green) y en (C) la sobreposición de A y B. Las imágenes se tomaron por microscopía confocal, con láser de excitación a 440 nm y la emisión se colectó a 560 nm. Las células se sembraron en placas Fluorodish a 1×10^6 células/mL. Posteriormente se adicionó FDV-0005 y se incubó por 10 min a 37°C. Se observaron al microscopio una vez concluida la incubación.

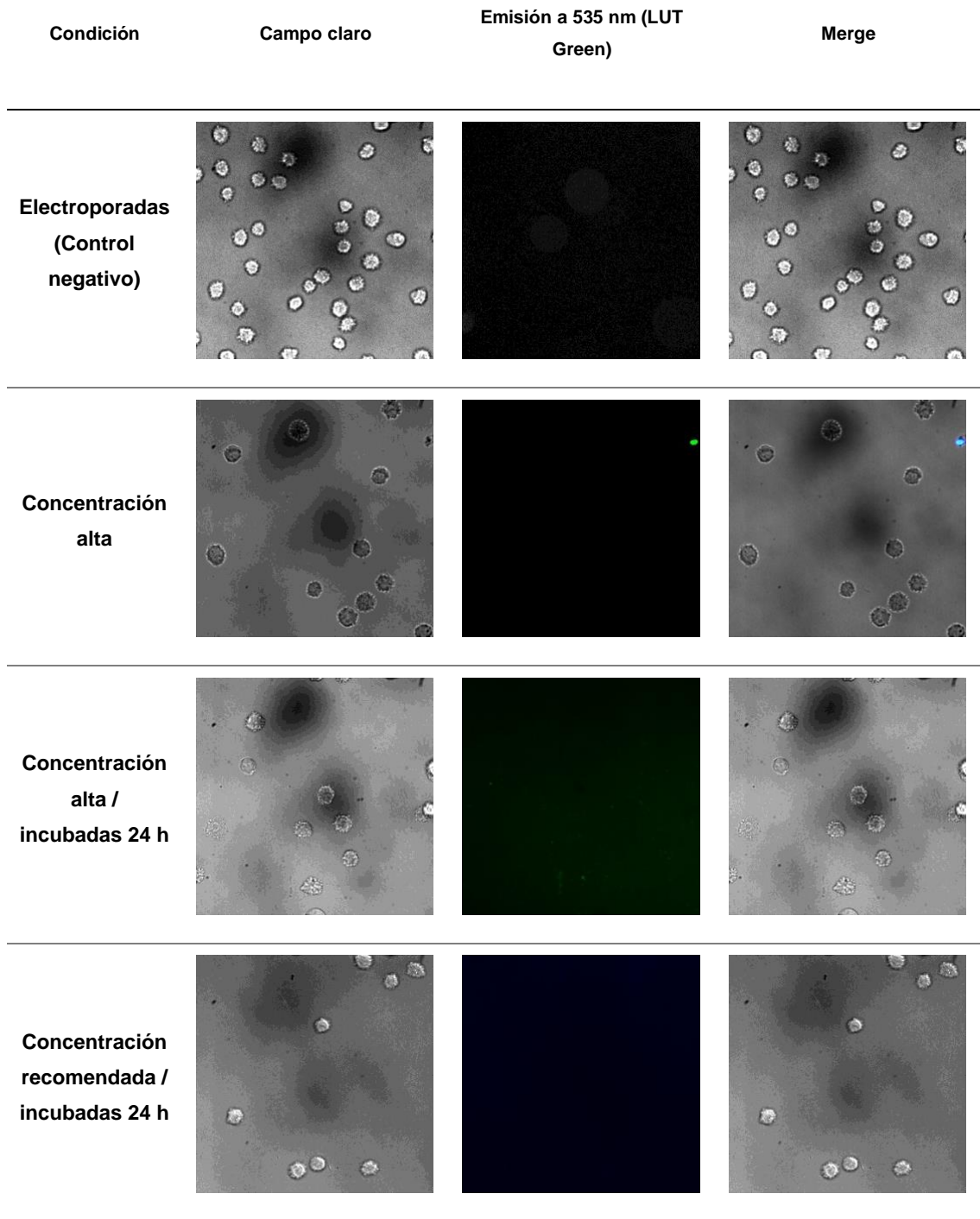
9.1.4 Internalización en células CHO-S por electroporación

Como una alternativa a el método de internalización propuesto por (Uchiyama et al., 2015)), las células se electroporaron en presencia del polímero. Como control negativo, se electroporaron células sin polímero, para verificar que la señal no fuese autofluorescencia o un efecto del procedimiento. El resto de las condiciones probadas permiten descartar que ni la concentración elevada de polímero, ni el tiempo de incubación favorecen la internalización, puesto que tal como se observa en la ninguna de ellas incrementa el número de células a las que el polímero puede ingresar.

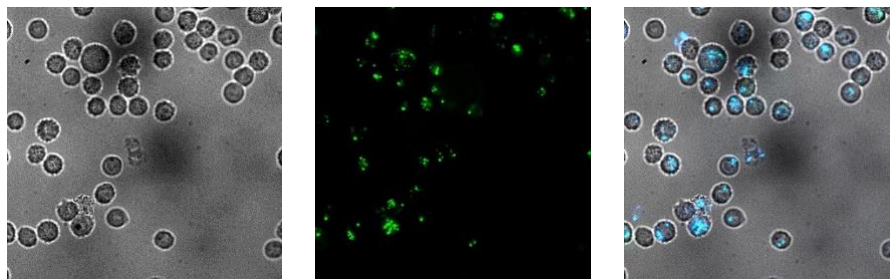
La electroporación al ser un protocolo que genera poros en la membrana celular permite la internalización del polímero en un porcentaje del 62 % de las células (Tabla 9.5). Este resultado sugiere que la membrana celular es la principal barrera que impide la internalización.

Pese a que a través de esta estrategia se podrían realizar mediciones de temperatura, existen varias desventajas. La primera de ellas es que la distribución del polímero es heterogénea y aleatoria. Esto implica que los sitios de medición se modificarían en cada experimento y no podrían realizarse réplicas exactas. Por otro lado, debido a la dificultad observada para atravesar las membranas en este tipo celular, es muy probable que no puedan realizarse mediciones al interior de organelos. Finalmente, la electroporación es un método que implica la aplicación de un campo eléctrico, lo que modifica el estado celular, produciendo deterioro y estrés. Por ello, las mediciones podrían verse alteradas por efecto del protocolo de internalización, más que por el estado celular.

Figura 9.8 Experimentos de internalización de FDV-0005 en células CHO-S por electroporación. Se muestran las imágenes en campo claro, la emisión a 535 nm (LUT Green) y la superposición de A y B para cada condición. Las imágenes de tomaron por microscopía confocal, con láser de excitación a 440 nm y la emisión se colectó a 560 nm. Las células se sembraron en placas Fluorodish a 1×10^6 células/mL. Posteriormente se adicionó FDV-0005 y se incubó por 10 min a 37°C. Se observaron al microscopio una vez concluida la incubación.



**Electroporadas
con polímero**



Observando en conjunto los resultados obtenidos de la caracterización del polímero, así como de la distribución e internalización en células CHO-S, se decidió probar el sensor gTemp como una alternativa para realizar las mediciones.

Tabla 9.1 Eficiencia de internalización de FDV-0005 en células CHO-

Condición	Eficiencia de internalización (%)
Electroporadas (Control negativo)	0
Concentración alta	~0
Concentración alta / incubadas 24 h	~0
Concentración recomendada / incubadas 24 h	~0
Electroporadas con polímero	62

9.2 Producción de proteínas fluorescentes Sirius y mT-Sapphire

Para realizar la caracterización del sensor, fue necesario producir por separado ambas proteínas. Tras la purificación por cromatografía de afinidad, los geles de poliacrilamida muestran que para Sirius el proceso fue exitoso pues únicamente se observa una banda que coincide con el peso molecular esperado, de 26.7 kDa (Figura 8.16 B). No así para mT-Sapphire, donde se observan una serie de bandas extras a la que corresponde al peso esperado de 26.9 kDa (Figura 8.16 C).

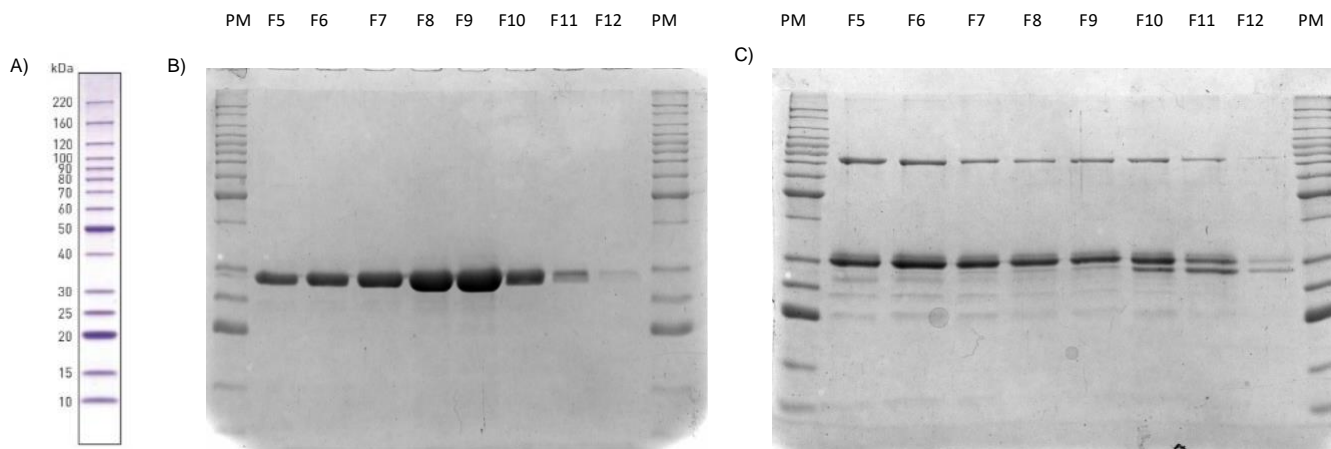


Figura 9.9 Verificación de la purificación por cromatografía de afinidad de Sirius y mT-Sapphire por geles de poliacrilamida al 12 %. En el panel A se muestra el marcador de Peso Molecular Benchmark Thermofisher. En B y C se observan las bandas obtenidas en las fracciones F5-F12 en la purificación de Sirius y mT-Sapphire, respectivamente.

La presencia de estas bandas no esperadas en los geles indica dos posibles escenarios: el primero de ellos podría ser que en la cepa productora de mT-Sapphire existen proteínas con una alta afinidad a la agarosa o segundo, que dicho hospedero genera proteólisis de la proteína producida. Si ocurriera el segundo escenario, se explicarían las bandas de pesos moleculares menores; sin embargo, se observa una banda de peso molecular de alrededor de 70 kDa. Esto podría corresponder con un dímero de la proteína. Como es bien sabido, las proteínas fluorescentes tienden a expresarse de forma asociada y a interactuar entre ellas, aunque las mutaciones que presenta la versión monomérica de T-Sapphire, teóricamente impedirían la formación de dichos agregados.

La relevancia de que la proteína empleada para los experimentos estuviese purificada radica en que las impurezas pudiesen representar una interferencia en las determinaciones. Sin embargo, al realizar el espectro de emisión para mT-Sapphire, se observó que el pico máximo de emisión corresponde con el reportado en la literatura (Figura 8.17) y que no existen máximos de emisión adicionales, por lo que se decidió continuar con los siguientes experimentos.

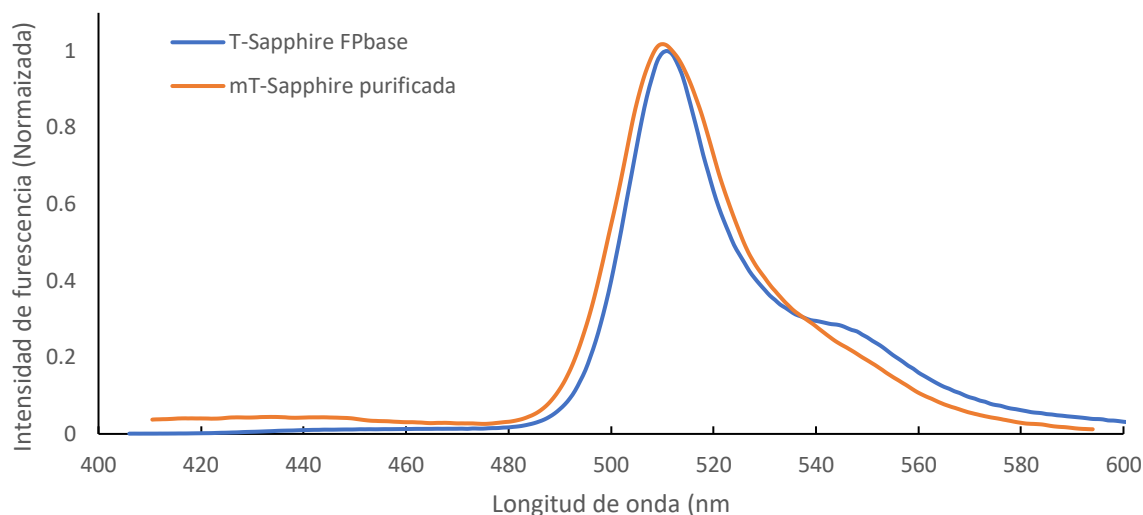


Figura 9.10 Comparación del espectro de emisión reportado en Fluorescent Protein Data Base (FPbase) y espectro obtenido de la purificación de mT-Sapphire. El espectro de mT-Sapphire purificada se obtuvo con un espectrofluorímetro con control de temperatura y una celda de cuarzo de volumen reducido. La dilución de mT-Sapphire se realizó en PBS filtrado.

Para realizar la caracterización de las proteínas emulando la expresión del sensor, se realizaron mezclas equimolares de las proteínas fluorescentes. Fue necesario determinar la concentración de mT-Sapphire en las fracciones purificadas. Para ello, se analizaron las imágenes de los geles de agarosa por densitometría en Image J. Dicha determinación indicó que la banda de mT-Sapphire corresponde a una fracción del 46 % de la proteína total; por lo que con ese dato se realizó el ajuste de concentración de proteína de interés.

9.3 Caracterización *in vitro* de gTemp

Las longitudes de onda de máxima emisión determinadas de los espectros fueron de 425 nm para Sirius y 511 nm para mT-Sapphire (Figura 8.18) Se observa que la intensidad de la emisión tiene una disminución inversamente proporcional a la temperatura; comportamiento que es lineal en ambas proteínas.

Se encontró que el decremento en la intensidad de fluorescencia de Sirius es de -2.2 % de IF/°C y de -0.7 % de IF/°C para mT-Sapphire, tal como está reportado en la literatura. Al realizar las mezclas equimolares, se obtiene el espectro mostrado en la Figura 8.18 A. La razón de las intensidades de ambas proteínas (Figura 8.18 Figura 9.11 B) muestran un aumento proporcional a la temperatura con una tendencia lineal.

Las réplicas con que se elaboraron estos espectros se analizaron para el barrido completo de temperatura, lo que implica que se realizaron una serie de lecturas consecutivas en la misma muestra. Por ello, surge la pregunta de si dicha estrategia provoca el descenso en la IF por fotoblanqueo.

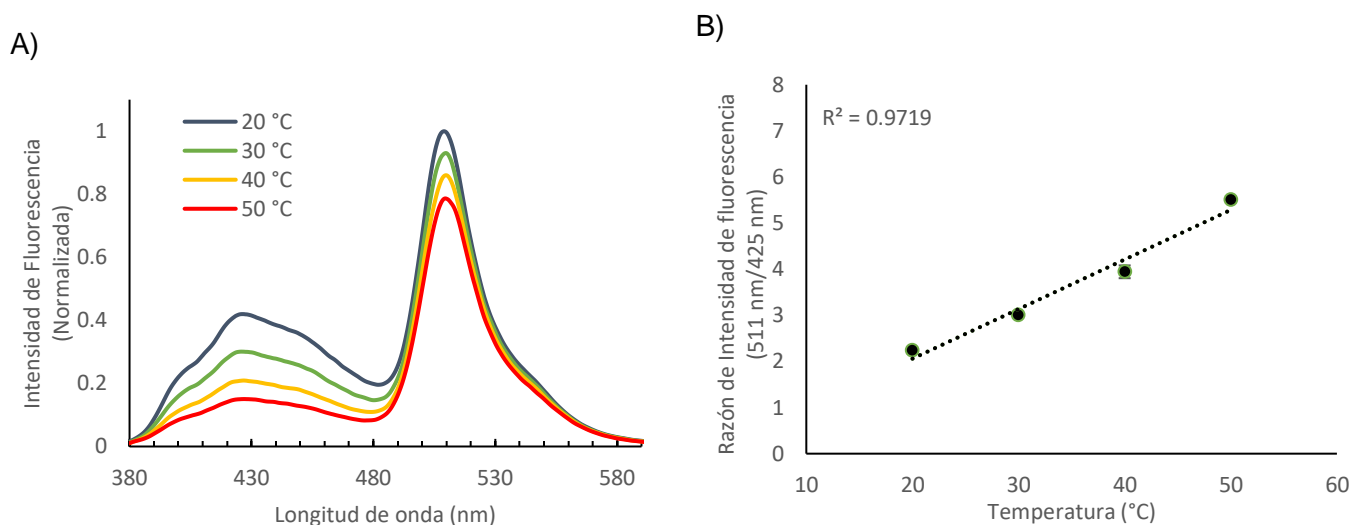


Figura 9.11 Comportamiento *in vitro* de la intensidad de fluorescencia y razón entre las señales de gTemp respecto a la temperatura. (A) Se determinaron los espectros de emisión del sensor con excitación a 360 nm. Se empleó un espectrofluorímetro con control de temperatura y una celda de cuarzo de volumen reducido. La dilución del sensor se realizó en PBS filtrado. (B) Del conjunto de datos del espectro se determinó la razón de la intensidad máxima (511nm/425nm) para cada uno de los fluoróforos que componen a gTemp. Las barras de error indican el resultado de 3 determinaciones independientes.

Para resolver dicha incógnita, se realizó una secuencia de múltiples espectros de emisión que permitiera descartar la disminución en la intensidad de fluorescencia como resultado de las condiciones experimentales empleadas.

Se observa que tras 15 ciclos de excitación, la intensidad de fluorescencia permanece constante a 25 y 50°C, mostrando una disminución únicamente con el aumento de la temperatura (Figura 8.19).

9.3.1 Evaluación de la sensibilidad de gTemp a condiciones ambientales

En la Figura 8.20 se muestran los resultados de la determinación de la razón de fluorescencia en diferentes condiciones de fuerza iónica, pH y concentración.

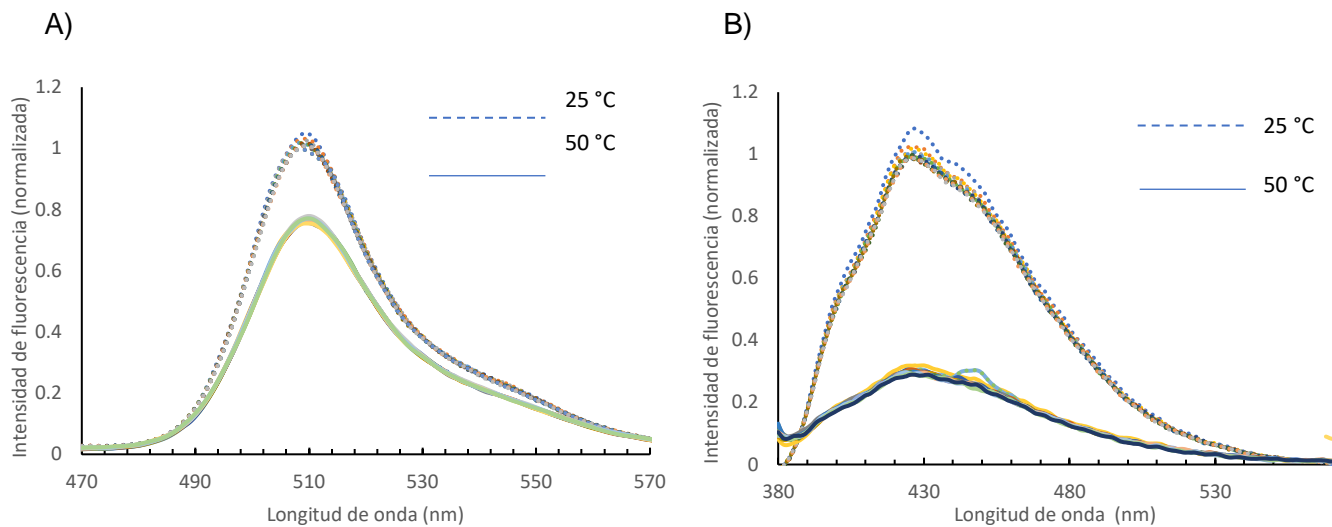


Figura 9.12 Prueba de fotoblanqueo para Sirius (A) y mT-Sapphire (B). Se tomó una secuencia de 15 espectros de emisión a 25 °C (líneas punteadas) y 50 °C (líneas continuas) para descartar fotoblanqueo por condiciones experimentales. Se empleó un espectrofluorímetro con control de temperatura y una celda de cuarzo de volumen reducido. La dilución de las proteínas purificadas se realizó en PBS filtrado.

Se observa que el comportamiento de la razón de fluorescencia es independiente de la fuerza iónica (A), así como de la concentración del sensor (C), tal como se esperaba. Sin embargo, al evaluar el comportamiento a diferentes condiciones de pH (B), se observa que a pH ácido si hay un impacto sobre la razón de la fluorescencia. Este resultado es particularmente importante en las determinaciones de temperatura en mitocondria, pues se sabe que en el espacio intermembranal puede existir una diferencia de pH de hasta 1 unidad respecto al citoplasma. Esta diferencia se debe al gradiente de protones que se mantiene entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembranal. El efecto del pH sobre la intensidad de fluorescencia deberá considerarse en la curva de calibración, puesto que el sensor, se localiza en la membrana mitocondrial interna (secuencia de direccionamiento a la subunidad VIII de la enzima Citocromo Oxidasa), por lo que podría sufrir el impacto de las condiciones del medio.

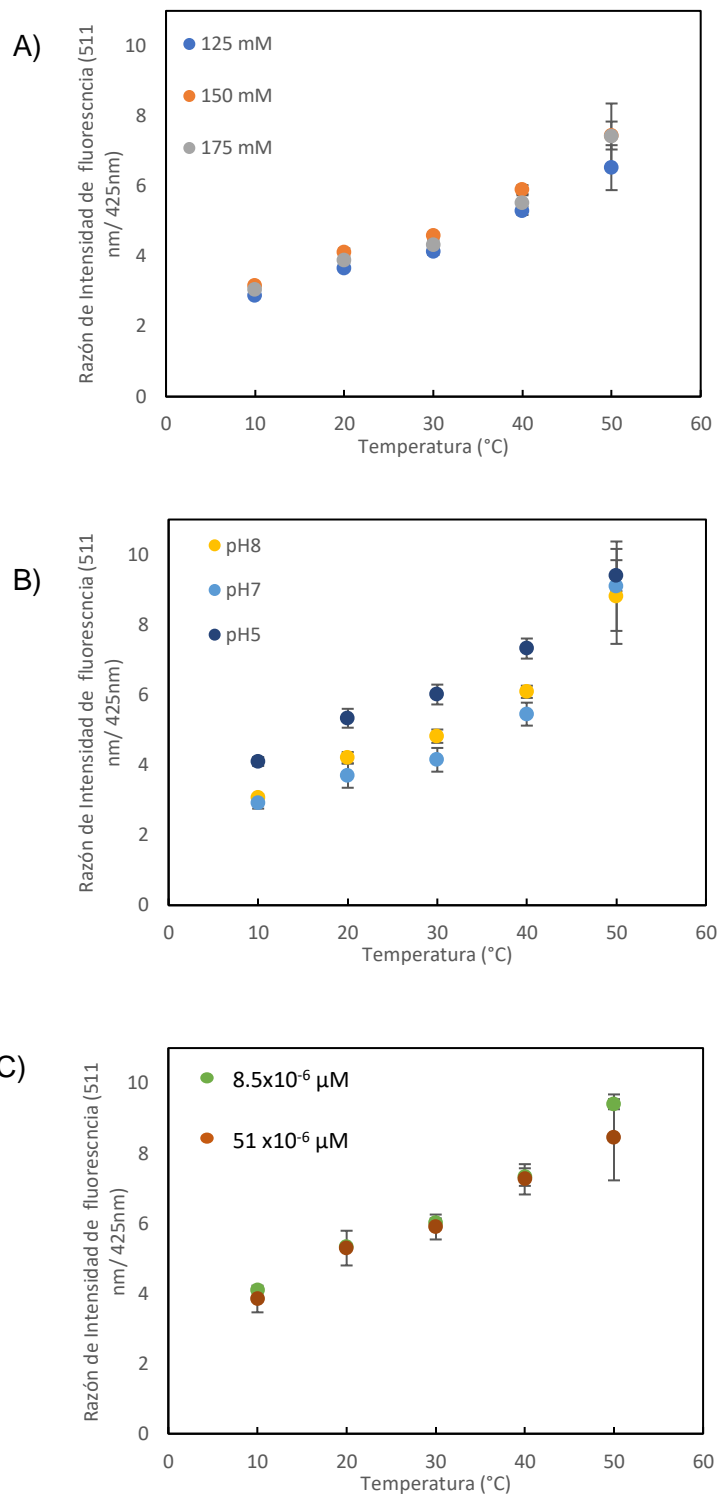


Figura 9.13 Evaluación del comportamiento de la razón de fluorescencia de gTemp a diferente fuerza iónica (A), valores de pH (B) y concentraciones del sensor (C). Se determinó la intensidad de fluorescencia de sirius y mT-Sapphire empleando una longitud de onda de excitación a 360 nm en un lector de microplacas Sinergy H1 Biotek. Las diluciones se realizaron en PBS y la evaluación de pH en buffer de fosfatos. Las barras de error indican el resultado de 3 determinaciones independientes.

Adicionalmente se determinó el decremento de la intensidad de fluorescencia de cada una de las proteínas con respecto a la temperatura (Figura 8.21). Consistentemente con lo que se había observado en los espectros de emisión, el decaimiento de la intensidad de fluorescencia en las diferentes condiciones fue de -1.3% de $IF/^\circ C$ para Sirius y de -0.2% de $IF/^\circ C$ para mT-Sapphire. Esto indica que el decremento en la intensidad, respecto a la temperatura es independiente de la condición en la que se encuentre.

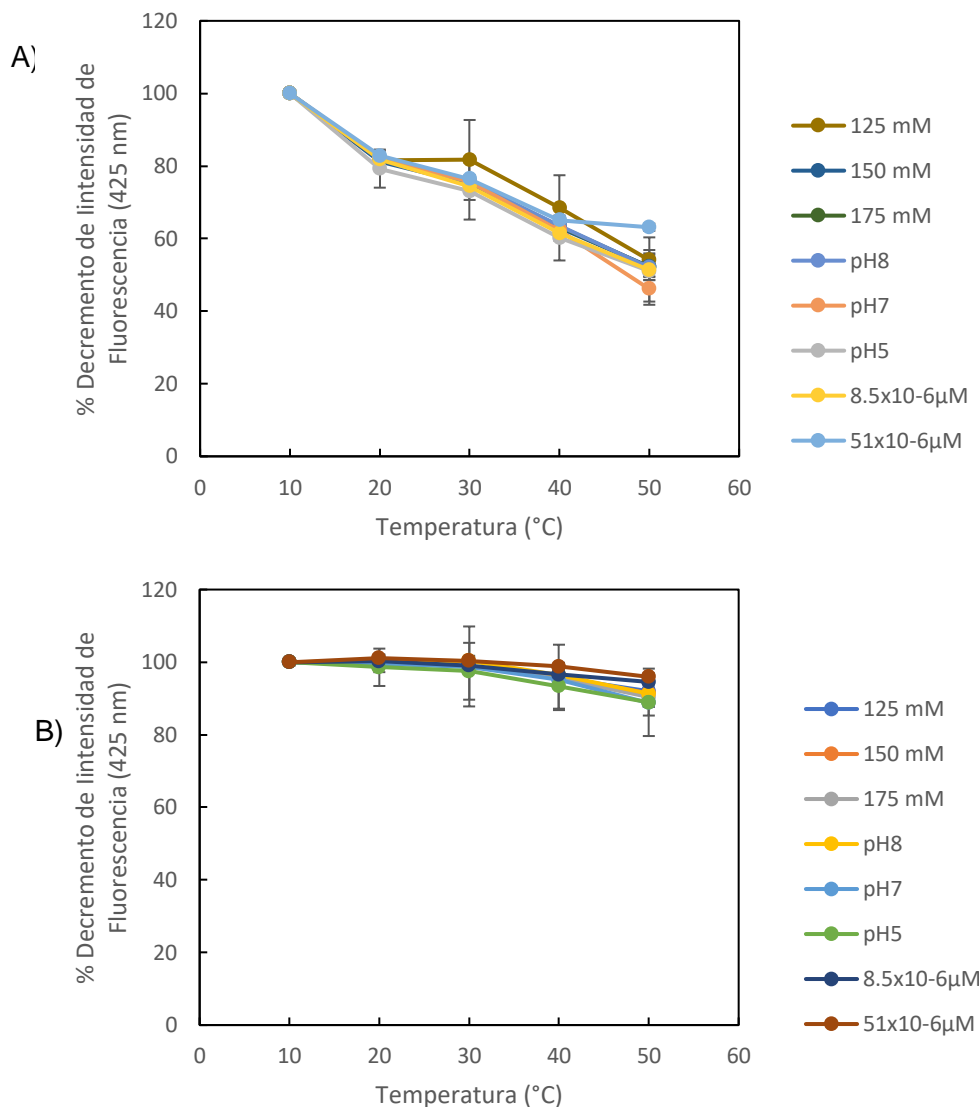


Figura 9.14 Determinación de la sensibilidad de la señal de fluorescencia de Sirius(A) y mT-Sapphire(B) en diferentes condiciones respecto a la temperatura. Se determinó la intensidad de fluorescencia de sirius y mT-Sapphire empleando una longitud de onda de excitación a 360 nm en un lector de microplacas Sinergy H1 Biotek. Las diluciones se realizaron en PBS y la evaluación de pH en buffer de fosfatos. Las barras de error indican el resultado de 3 determinaciones independientes.

9.3.2 Expresión de gTemp: verificación de patrón de restricción y productos de PCR

Previo a la expresión en células de mamífero, era importante corroborar la integridad del DNA, así como verificar que la secuencia nucleotídica corresponde a la esperada. El patrón de restricción es una forma sencilla y rápida de corroborar la identidad de un plásmido, pues permite comparar experimentalmente la posición y el tamaño del material genético insertado en el vector.

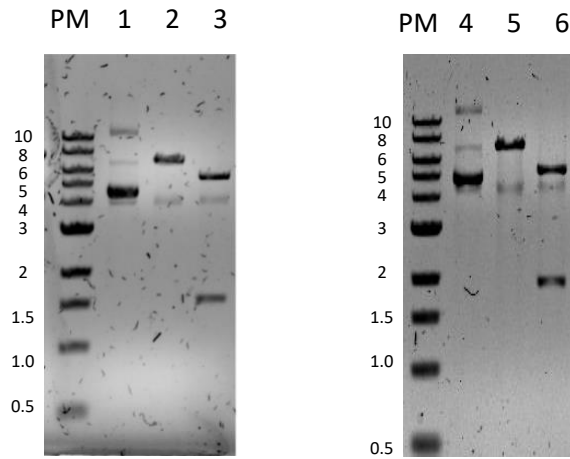


Figura 9.15 Verificación por patrón de restricción. gTemp 1) Vector sin digerir, 2) Linealización con BamH1 (6939 pb), 3) Doble digestión con BamH1/EcoR1 (5424 pb/1515 pb). mito_gTemp 4) Vector sin digerir, 5) Linealización con BamH1 (7658 pb) y 6) Doble digestión

En el análisis de los plásmidos adquiridos en Addgene, los fragmentos de ADN obtenidos de las digestiones con las enzimas de restricción corresponden a los tamaños esperados para ambos plásmidos. Para gTemp, en la linealización se observa una banda que corresponde a las 6.9 kb teóricas (Figura 8.22, carril 2). En la doble digestión, se observan una banda que corresponde a las 1.5 kb teóricas de la secuencia que codifica para el par de proteínas y una banda adicional que corresponde a las 5.4 kb del vector vacío (Figura 8.22, carril 3). En las digestiones para mito_gTemp, en la linealización del plásmido se observa una banda que migra de acuerdo con las 7.6 kb teóricas (Figura 8.22, carril 5) y en la doble digestión la banda que corresponde a las 2.3 kb del inserto y una a 5.4 kb del vector vacío (Figura 8.22, carril 6).

Cabe señalar que aunque ambos plásmidos codifican para el mismo par de proteínas, el tamaño del inserto varía, debido a que en mito_gTemp se incluye la secuencia de la subunidad VIII de la citocromo C oxidasa. Además, se realizó una prueba de PCR, con la intención de amplificar un sitio específico del vector y así corroborar el tamaño del fragmento esperado.

A continuación, se muestran las características de los oligonucleótidos diseñados

- Clave: T2A reverse Longitud: 27

Secuencia (5'->3'): GTTCTCCTCCACGTCGCCGCAGGTCAG

C+G (%): 66.67 Tm (1): 75.54 Tm (2): 90.00

- Clave: Compl_gTEMP Longitud: 28

Secuencia (5'->3'): GGGGCACAAGCTGGAGTACAACGGGATA

C+G (%): 57.14 Tm (1): 72.82 Tm (2): 88.00

En la Figura 8.23 se observa que las bandas de los productos de PCR para ambos plásmidos corresponden al tamaño de las bandas esperadas de entre 366-358 pb.

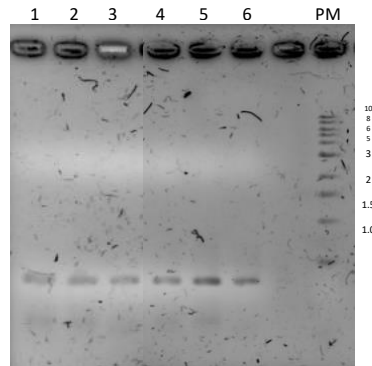


Figura 9.16 Verificación por productos de PCR 1) mito_gTemp 65 °C 2) mito_gTemp 61 °C 3) mito_gTemp 55 °C 4) gTemp 65 °C, 5) gTemp 61 °C, 6) gTemp 55 °C

Con los resultados de estas dos técnicas se puede inferir que los plásmidos se encuentran íntegros y que corresponden a las secuencias esperadas.

9.3.3 Selección del método de transfección

Considerando los fines de este trabajo, se buscó un método que permitiera realizar transfecciones periódicas con alta eficiencia, a un costo medido. Se emplearon los métodos de lipofección y electroporación. En la Tabla 9.6 se muestran los resultados de los dos métodos probados. Se observa que la eficiencia de transfección es 4.75 veces más alta para gTemp y 1.6 veces más alta para mito_gTemp, cuando se emplea electroporación. Esta característica es relevante, puesto que es deseable tener un alto porcentaje de células fluoresciendo, sobre todo en los experimentos de microscopía; así, puede hacerse el mayor número de determinaciones por campo.

Tabla 9.2 Resultados de método de transfección propuestos

Método	Plásmido	Eficiencia (%)	Viabilidad (%)	Observaciones
Lípidos catiónicos	gTemp	22.8	98	-
	mito_gTemp	11.9	98	-
Electroporación	gTemp	38	62	La eficiencia es alta, aunque no se observa adhesión de las células
	mito_gTemp	46	78	La eficiencia es alta, aunque no se observa adhesión de las células

Se observa que las células tratadas por lipofección, alcanzaron una viabilidad de 98 % a 48 h post-transfección; mientras que las células electroporadas mostraron una viabilidad por debajo de 80 %. Este es un factor importante, debido a que una viabilidad elevada permite asegurar que la mayoría de las células analizadas pueden reaccionar a los estímulos externos y se reduce la posibilidad de tener artefactos en el análisis de resultados. Además de esto, se observó que las células electroporadas no se adherían a las superficies a pesar de cultivarse de forma estática. La adhesión es una característica altamente deseable debido a que en los experimentos de microscopía se buscaba adicionar desacopladores de la CTE. La adición de un volumen de solución de FCCP o PBS a la placa podría generar un flujo que moviera a las células del campo de visión una vez que el experimento iniciara.

9.3.4 Caracterización de gTemp *in vivo*

Como un primer acercamiento, se realizaron los espectros de emisión de células transfectadas que fueron lavadas y resuspendidas en PBS. Como un control de autofluorescencia, se preparó una suspensión de células sin transfectar a la misma concentración.

En la Figura 8.24 se muestran los espectros obtenidos para ambas transfecciones, gTemp (A) y mito_gTemp (B). En ambos casos se observó que la intensidad de fluorescencia de Sirius, principalmente, decae con el aumento de la temperatura. Con esto se comprueba que, una vez expresada la proteína, esta es capaz de responder a los cambios de la temperatura

Sin embargo, un aspecto que llama la atención es la proporción de intensidad de ambas proteínas.

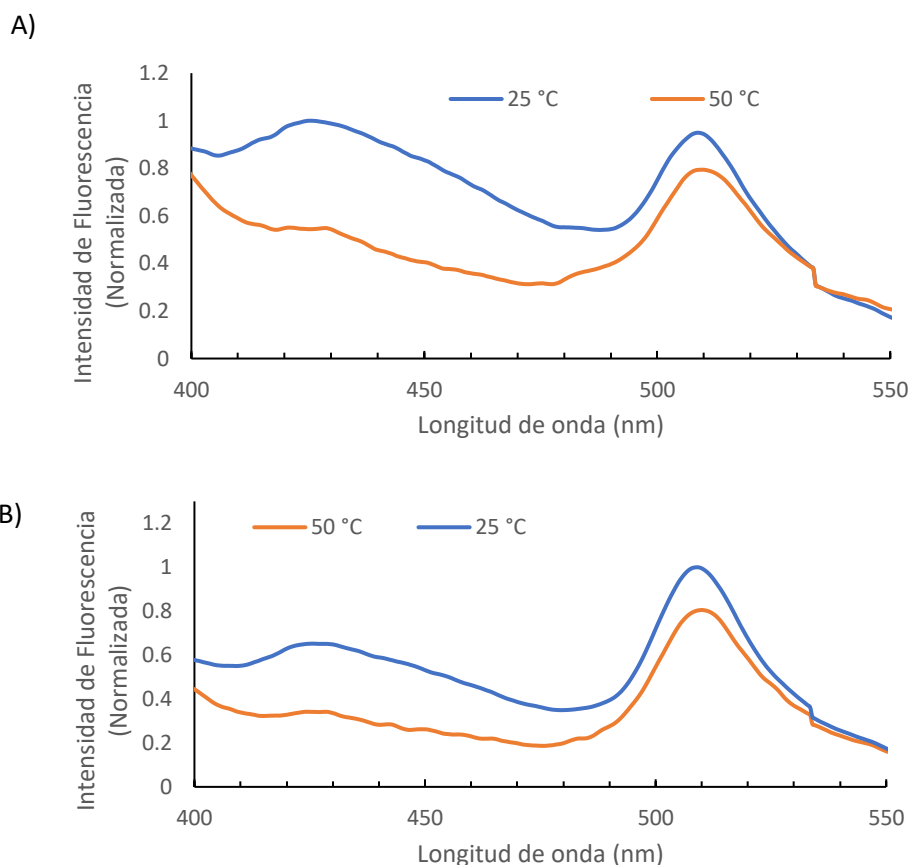


Figura 9.17 Espectros de emisión de células CHO-S expresando gTemp en citoplasma(A) y mitocondria (B). A 48 h post-transfección las células se lavaron y resuspendieron en PBS. Se determinaron los espectros de emisión con excitación a 360 nm. Se empleó un espectrofluorímetro con control de temperatura y una celda de cuarzo de volumen reducido. La dilución del sensor se realizó en PBS filtrado.

Al analizar el espectro de emisión de la mezcla equimolar de Sirius y mT-Sapphire (Figura 8.18) se tiene que la proporción de las intensidades es de 1:2.5. Sin embargo, *in vivo* se observa que dicha proporción es distinta a la esperada, pues se encontraron valores de 1:1 y de 1:1.6. Este comportamiento se repite en diferentes transfecciones, independientemente del sitio de expresión (Figura 8.25).

Debido a las características de rendimiento cuántico y el coeficiente de extinción molar (Tabla 9.3) se esperaría que en una relación equimolar, mT-Sapphire presentase una mayor intensidad, puesto que puede excitarse más eficientemente y la proporción de fotones que puede emitir respecto a la cantidad con que se excita es mayor que Sirius. Por ello, las relaciones de intensidad encontradas sugieren que *in vivo*, ocurre algún fenómeno por el que ambas proteínas no se encuentran en la proporción esperada.

Como se mencionó anteriormente, la función del péptido T2A incluido en el vector de expresión, es favorecer la transcripción equimolar. Sin embargo, existen ciertos puntos a los que vale la pena prestar atención.

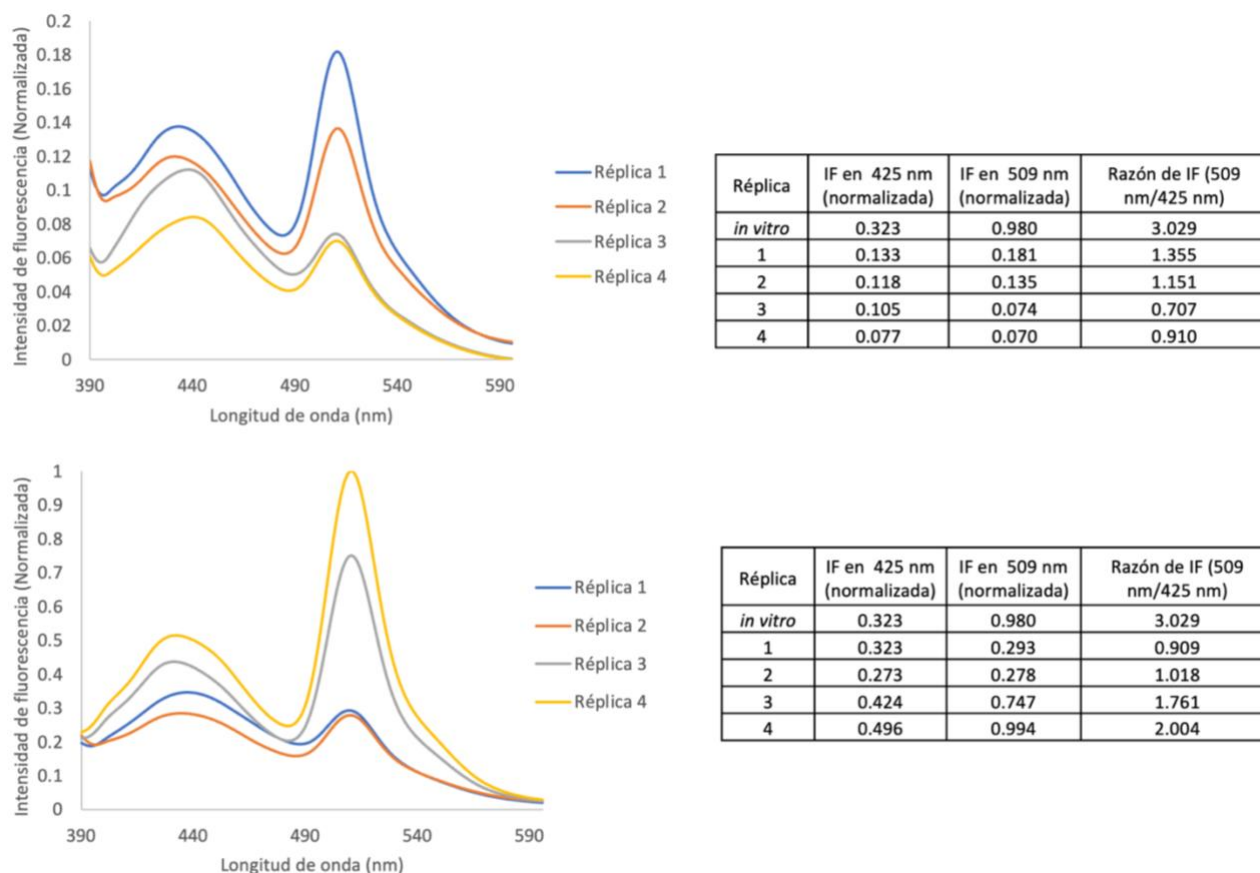


Figura 9.18 Espectros de emisión de gTemp en transfecciones independientes en citoplasma (A) y mitocondrial (B).

Los péptidos 2A son secuencias de 18-22 aminoácidos, que en forma natural se encuentran en el genoma de algunos virus (**P2A** Teschovirus porcino-2A; **T2A**, *Thoseaasigna* virus 2A; **E2A**, virus de rinitis equina (ERAV) 2A; **F2A**, Foot-Mouth Disease Virus 2A). Estos, se ubican entre la secuencia de dos proteínas independientes que se transcribe en un solo mRNA.

A través del reconocimiento de motivos específicos (D(V/I)EXNPGP), se auto escinde entre la glicina y prolina localizadas en el C-terminal. Pese a que existen algunos reportes que sugieren que la estrategia es efectiva, también existen algunos otros en los que se propone que la relación en que se traducen ambas proteínas puede ser variable.

(Donnelly et al., 2001), realizaron un trabajo *in vitro*, en el que se encontró que puede llegar a producirse un desequilibrio en la traducción de las proteínas. Aquella secuencia que se encuentra río arriba del péptido 2A puede llegar a traducirse de 2 a 5 veces más que la proteína que se encuentra en el carboxilo terminal. Dicho argumento, ayudaría a explicar por qué mT-Sapphire que se localiza río abajo del linker T2A se encuentra en una proporción más baja que Sirius. Otra posible explicación es que una fracción de mT-Sapphire no esté adquiriendo el plegamiento correcto y que por lo tanto no emita señal; o bien, que la maduración de la proteína no se esté completando. Sin embargo, el último escenario parecería menos probable, puesto que el tiempo de maduración es de 157 min (FPbase, n.d.) y las determinaciones se realizan a las 48 h post-transfección.

Una forma de discernir lo que ocurre es determinar la cantidad de mRNA y la cantidad de proteína, para Sirius y mT-Sapphire. De esa forma podría tenerse una idea más certera de por qué se observan relaciones proteína-proteína diferentes a la esperada.

Independientemente de la razón por la que ocurra este fenómeno, es necesario considerar que no es posible realizar una única curva de calibración; puesto que, al modificarse la proporción de ambas proteínas, las intensidades también tendrán una razón distinta entre las diferentes transfecciones.

9.4 Sistemas de captura de imágenes y calibración

Para realizar las determinaciones de temperatura celular se montaron dos sistemas de captura de imágenes. Uno de ellos es de captura independiente de las señales, mientras que con el segundo sistema pueden registrarse ambas señales al unísono. Dicho sistema dual se describe en el Apéndice 11.2

Para efectos de este trabajo, se empleó la configuración de captura de una sola señal en los experimentos de medición de temperatura. Se seleccionó la emisión de Sirius puesto que es la señal que presenta mayor sensibilidad al cambio de temperatura.

Aunque la expresión de gTemp permite realizar la determinación por la razón de las intensidades, en un primer acercamiento se utilizó el descenso porcentual. Dicha variable es una herramienta útil puesto que es independiente de la concentración de proteína, con la ventaja de que no se requiere realizar calibraciones rutinarias.

Para poder realizar las determinaciones a través de la razón de intensidades se requiere emplear el sistema de captura dual para así observar el cambio en las intensidades en paralelo. En tal caso, se requerirían realizar calibraciones en cada transfección dada la variabilidad observada (Caracterización de gTemp).

Aunque el descenso porcentual en la intensidad de fluorescencia en función de la temperatura ya se había caracterizado *in vitro*, es necesario determinarlo en las condiciones en las que se desarrolla el experimento de medición. Es necesario asegurar que se conoce el comportamiento en el ambiente celular, considerando también el efecto que pueda tener la fuente de iluminación del microscopio. Para determinar el cambio de temperatura a través del descenso porcentual, se obtuvo

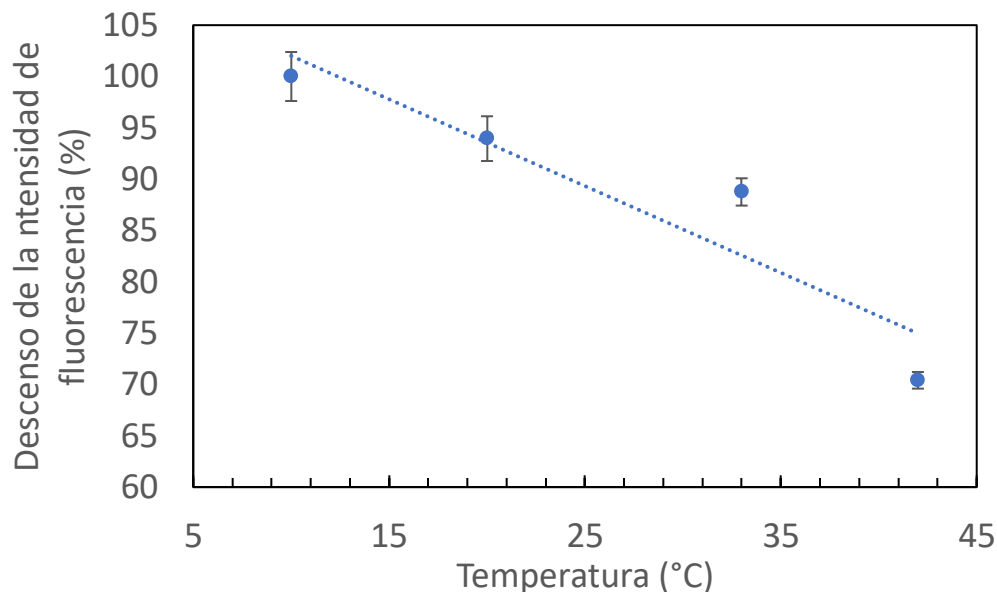


Figura 9.19 Calibración del descenso porcentual de la intensidad de fluorescencia de Sirius respecto a la temperatura. Las células se resuspendieron en PBS y se colocaron en cubreobjetos circulares montado en una cámara celular Attofluor. Se capturaron imágenes en microscopio de epifluorescencia en diferentes campos, se usó un LED de 360 nm como fuente de excitación y se colectó la señal entre 395 nm-455 nm.

la proporción con que dicho parámetro desciende. Para ello se determinó la intensidad emitida por Sirius en distintos pools de células, a diferentes temperaturas.

Dada la variación que pudiese existir respecto a la expresión, se empleó la mediana como medida de tendencia central.

A través de la determinación del coeficiente $r^2=0.87$ se tiene, que el cambio en la temperatura explica el descenso en la intensidad de fluorescencia en forma lineal. Por ello, a través del intervalo de temperaturas estudiado y el descenso, se determinó que la señal de fluorescencia desciende 1.045 % de IF/°C.

9.5 Ensayos de adición de FCCP(Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona)

Una de las desventajas de no realizar determinaciones a través de la razón de las intensidades, es que no pueden lograrse determinaciones puntuales de temperatura, sino que solo puede determinarse la magnitud del cambio. Por ello, una vez determinada la tasa de cambio con que desciende la intensidad de fluorescencia, es posible determinar el cambio de temperatura que se produce bajo ciertas condiciones en las células.

Para realizar determinaciones puntuales, existen 2 posibles estrategias dentro del contexto de este trabajo.

La primera de ellas es emplear puntos de referencia en los que se hagan determinaciones en paralelo en otro organelo o la membrana celular. En tal caso, sería necesario emplear fluoróforos cuyas emisiones (longitud de onda) eviten la contaminación entre canales y que permitan distinguir los pixeles que reportan la señal de uno u otro organelo; de lo contrario se podrían generar artefactos en las mediciones.

En la segunda estrategia, usando gTemp se podría asignar un valor absoluto en el medio circundante a la membrana celular. Para ello sería necesario elaborar una mezcla equimolar de proteína purificada y realizar la determinación a través de la razón de intensidades de ambas proteínas. Sin embargo, dicha determinación no se podría realizar en paralelo a la determinación de temperatura de citoplasma o mitocondria, puesto que no habría manera de distinguir los pixeles cuya señal proviene del medio o del interior de la célula, dificultando así el análisis de las imágenes (específicamente, la segmentación). Además, es necesario recordar que dado que estos

experimentos se realizan en microscopio de epifluorescencia, no es posible seleccionar la emisión proveniente de un plano definido, sino que se captura la luz de todos los planos focales.

Para ambos casos se requiere un sistema de captura de diferentes señales al unísono, tal como el sistema de captura propuesto en el apartado: Sistema de captura de imágenes con divisor de imágenes. Sin embargo, el alcance de este trabajo solamente empleó el sistema de captura de una sola señal.

Dentro de la literatura, una de las formas empleadas para conocer la temperatura que puede alcanzarse al interior de las células es la adición de FCCP. El FCCP (carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona) es un ionóforo que transporta protones a través de la membrana mitocondrial interna hacia la matriz. Al aumentar la permeabilidad de la membrana, se rompe el gradiente electroquímico; por lo que, en el intento de restablecer la condición inicial, los complejos proteicos de la cadena transportadora de electrones bombean los protones hacia el exterior de la matriz. Dado que este fenómeno está acoplado a la reacción de oxidación de NADH, se espera un aumento en la producción de calor y, por tanto en la temperatura.

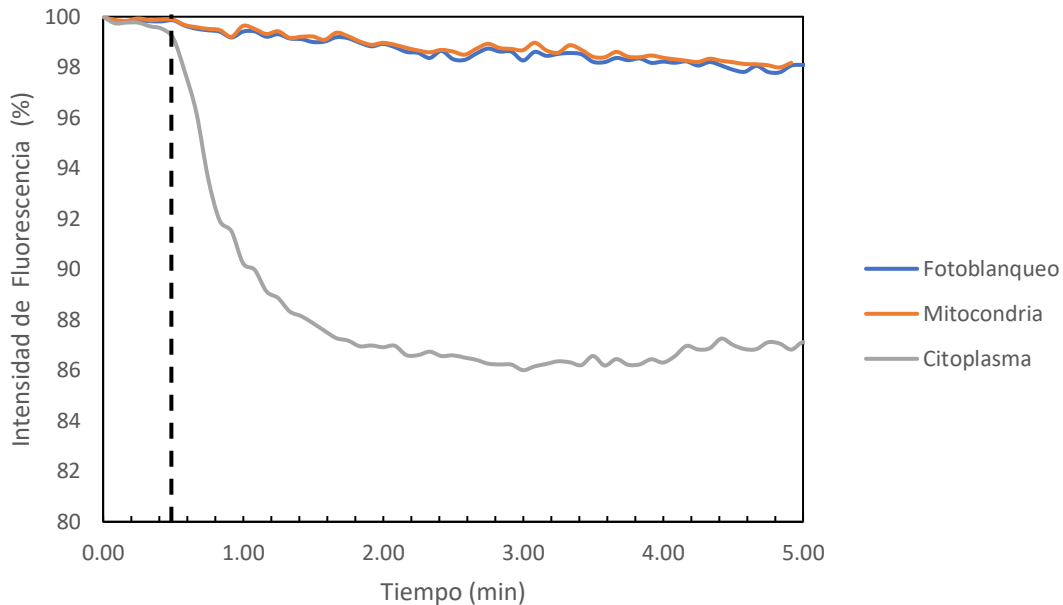


Figura 9.20 Respuesta de la intensidad de fluorescencia (%) de Sirius al desacoplar la OXPHOS. A 48 h post transfección las células se resuspendieron en PBS y se colocaron en cubreobjetos circulares montados en una cámara celular Attolfluor. Se capturaron videos en un microscopio de epifluorescencia con un LED de 360 nm como fuente de excitación y se colectó la señal entre 395 nm-455 nm. Para desacoplar la OXPHOS se adicionó una solución de FCCP después de 30 segundos de iniciado el video, la línea a los 0.5 min indica la adición del FCCP. Los trazos representan la mediana de 43 y 47 datos obtenidos para mitocondria y citoplasma, respectivamente.

Como un primer acercamiento al estudio de la temperatura en células CHO, se realizó un ensayo en el que se adicionó FCCP a un cultivo de células que expresan gTemp, de tal forma que pueda determinarse la magnitud del cambio cuando se desacopla la OXPHOS. En la Figura 8.27 se muestra el comportamiento de la intensidad de fluorescencia en los timelapse.

La determinación del descenso de la intensidad de fluorescencia como producto del fotoblanqueo es relevante, debido a que nos permite conocer la magnitud del cambio debida únicamente a dicha variable y considerarla como un artefacto que puede afectar al resultado final.

Tal como se observa en la Figura 8.27 las células que expresan gTemp en mitocondria, mostraron un efecto prácticamente idéntico al fotoblanqueo, de -4.7 % de IF después de 5 min. Sin embargo, para las células con la expresión citoplasmática, después de 5 min se observa un decremento de la intensidad de -11.95 % de IF lo que indica que en dichas células si existe una respuesta a la adición

del

ionóforo.

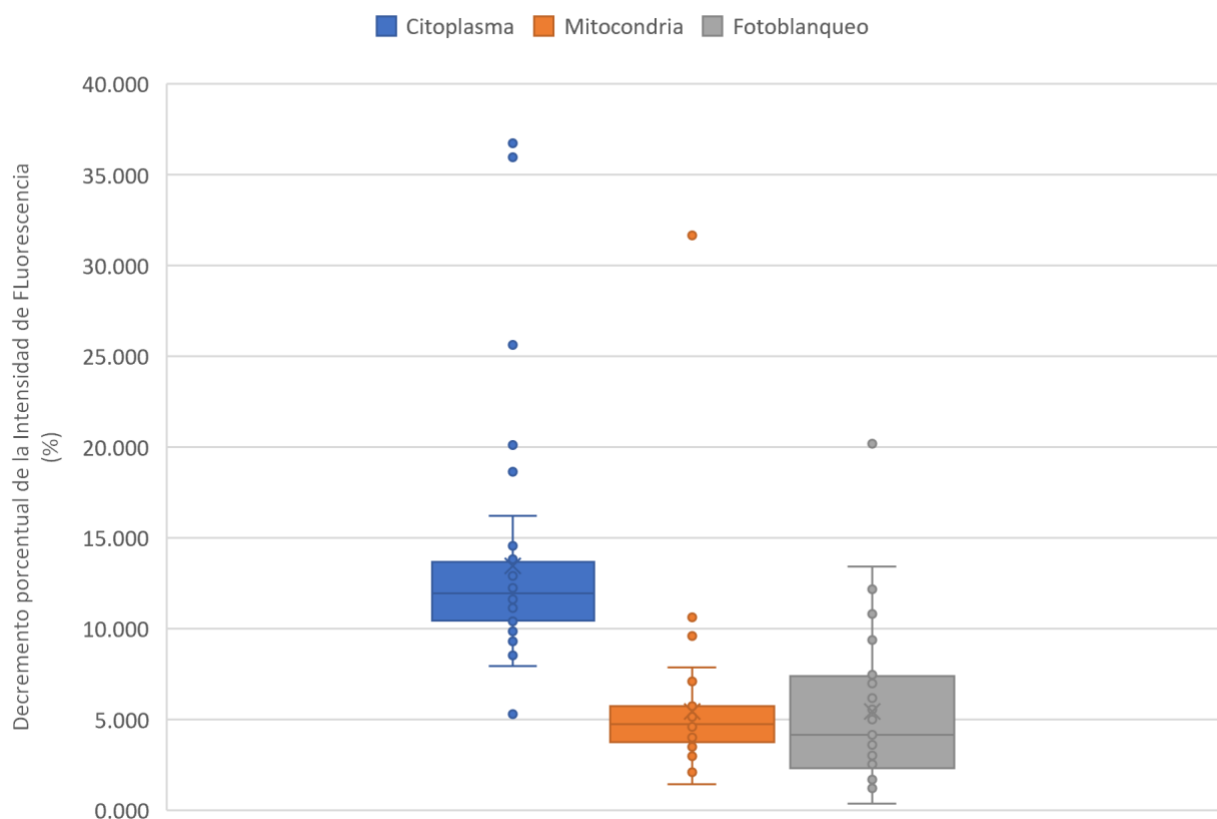


Figura 9.21 Valor de descenso global de la intensidad de fluorescencia en mitocondria y citoplasma al desacoplar la OXPPOS. Los datos presentados son los valores finales de los videos capturados. Se realizó un control de fotoblanqueo de duración equivalente a los experimentos (5 min) para considerar dicho efecto. Cada valor fuera de las cajas representan células individuales con comportamiento distinto a la mediana.

Al considerar el descenso en la IF producido por el fotoblanqueo es posible corregir el dato obtenido en las determinaciones para mitocondria y citoplasma (Tabla 9.7).

Tabla 9.3 Valores de descenso porcentual de la intensidad de fluorescencia corregidos

Determinación	Número de células	Descenso porcentual crudo (%)	Descenso porcentual corregido
Fotoblanqueo	33	4.16	-
Citoplasma	49	11.95	7.79
Mitocondria	38	4.72	0.55

De esta forma, considerando la sensibilidad del sensor, de 1.045 %/°C, se tienen que el descenso porcentual observado en citoplasma se traduce en un aumento de temperatura de 7.4°C. Tal dato que se encuentra dentro de los valores de temperatura intracelular reportados con anterioridad (1-12°C).

Respecto a las determinaciones mitocondriales, se observa que el efecto sobre la intensidad de fluorescencia es de la misma magnitud que el producido por el fotoblanqueo, por lo que el cambio no puede considerarse como una variación en la temperatura en dicho organelo.

A pesar de que el tratamiento para todas las células fue el mismo se observa respuesta únicamente en citoplasma. Ya que se conoce el mecanismo de acción del FCCP, se asume que la energía que genera el aumento de temperatura proviene de las mitocondrias, pues es ahí donde se generan las reacciones exotérmicas que dan lugar a los cambios. Por ello, se podría pensar que la falta de respuesta no se debe al tiempo de difusión, pues se asume que, para observar una respuesta en el citoplasma, el FCCP debió lograr el desacople de la OXPHOS.

Las determinaciones aquí mostradas son un primer acercamiento al estudio de la temperatura intracelular. Será necesario realizar réplicas adicionales para corroborar la información obtenida, puesto que aunque el aumento de temperatura observado en citoplasma se encuentra dentro de los valores reportados, la evidencia experimental aún es limitada. Por lo anterior, será necesario complementar experimentalmente, ya sea a través de replicas de adición de FCCP, pero sobre todo, generar información con el sistema de captura de imágenes dual, en el que la captura de la señal de mT-Sapphire, fungirá también como un control que permita descartar artefactos adicionales.

9.6 Aproximaciones teóricas para el cálculo de la temperatura intracelular

Durante los últimos 10 años, se ha generado evidencia científica sobre la existencia de gradientes de temperatura en los organelos de distintos tipos celulares. Debido a que este hecho podría tener implicaciones importantes en cómo se ha concebido la biología y los procesos celulares, diversos autores se han dado a la tarea de analizar teóricamente, si dichos cambios son posibles y cuáles son las variables que podrían estar implicadas. Uno de los primeros análisis que se realizaron, fue el de (Baffou et al., 2015), quien sugirió que las variaciones de temperatura registradas, no podían ser explicadas como un efecto único de la termogénesis celular. Para llegar a dicha conclusión, analizó dos escenarios a través de la ecuación de difusión de calor (1):

$$\Delta T = \frac{P}{2\pi kL}$$

dónde:

ΔT = incremento de temperatura, K

P= energía liberada por célula, W

k = conductividad térmica, $Wm^{-1}k^{-1}$

L= diámetro de la fuente de calor

En el primer escenario, se asume una célula de 10 μm de diámetro, con una conductividad térmica igual a la del agua ($1 Wm^{-1}k^{-1}$) y una liberación de energía de 100 pW, que fue determinada por micro calorimetría (Baffou et al., 2014). Como resultado de este cálculo, se encontró que el cambio en la temperatura podría ser únicamente del orden de 10^{-5} K (equivalentes a $^{\circ}C$). Dicho valor dio lugar a “el problema de la brecha de 10^{-5} ”, concepto que hace referencia a la incongruencia que existe entre el cálculo teórico y la evidencia experimental.

El segundo escenario considera que los 100 pW se generan en alguno de los organelos y por lo tanto, se reduce el diámetro de la fuente de calor. Para ello consideraron 500 nm como el tamaño de una mitocondria. Al emplear dicho valor, la brecha se reduce a 10^{-4} K, debido a que el cambio únicamente es de un orden de magnitud en el tamaño de la fuente de calor.

Como parte de la discusión alrededor de este tema, (Baffou et al., 2015; Kiyonaka et al., 2015; Suzuki et al., 2015), han elaborado contra argumentos para apoyar la existencia de los gradientes intracelulares de temperatura. Dentro de las consideraciones que se han señalado, es que debe tomarse en cuenta, que 100 pW podría ser un valor poco representativo, puesto que existen reportes de células que podrían liberar hasta 1600 nW (Suzuki et al. 2015). Sin embargo, dichos valores corresponden a adipocitos marrones, que se sabe son células especializadas con función termogénica. Este argumento apoya el hecho de que el metabolismo puede ser muy variable entre líneas celulares y que dicha variación debería ser tomada en cuenta.

Otro de los argumentos que se han discutido es sobre el tamaño de las fuentes de generación de calor. En ese sentido, se ha señalado que las mitocondrias son de tamaño variable, por lo que podría asumirse un valor de entre 100 y 500 nm. Por otro lado, (Kiyonaka et al., 2015) sugieren que sería

más preciso considerar el tamaño de los complejos enzimáticos en donde se libera la energía, de tal forma que se considerase un tamaño de 10-100nm.

Además del tamaño de la fuente de calor y de la energía liberada, la conductividad térmica es otro factor que podría intervenir de forma importante en la generación de gradientes de temperatura. En este contexto, las bicapas funcionarían como un material de baja conductividad, que evitaría que el calor difundiera a la velocidad que lo haría en ambientes acuosos. A partir de análisis teóricos y computacionales, se había estimado que la conductividad térmica de las bicapas lipídicas podía ser de 2 a 6 veces más pequeño que el ambiente acuoso; sin embargo, recientemente se determinó experimentalmente que el valor de k es de $0.2 \text{ Wm}^{-1}\text{k}^{-1}$ (Bastos et al., 2019), es decir, 5 veces menor al del agua. Al realizar el cálculo del cambio de temperatura, con $k=0.2 \text{ Wm}^{-1}\text{k}^{-1}$ y los valores más favorables para obtener un gradiente de temperatura (1.6 nW y 100 nm de diámetro), se obtiene un ΔT de 10^{-2} K , es decir, una décima de grado.

Como puede observarse, aún con las consideraciones señaladas e incluso con la nueva evidencia experimental, sigue existiendo una brecha entre las determinaciones experimentales de ΔT y los cálculos teóricos. Cabe destacar que hasta este punto solo se han considerado las reacciones del metabolismo, puesto que el registro de la energía generada por micro calorimetría se realiza en condiciones en las que solo interviene la actividad celular basal. Recientemente, fue publicado un estudio que podría aportar información relevante para resolver algunas de estas incógnitas. (Rajagopal et al., 2019)), construyeron un termopar, que les permite realizar mediciones de temperatura intracelular a través de cambios de voltaje. Estos autores encontraron que al desacoplar la cadena transportadora de electrones con la molécula BAM15, se observa un aumento en la temperatura que alcanzan hasta 7.5°C por arriba de la temperatura basal. No obstante, se reporta que el cambio en la temperatura es transitorio, puesto que se observan dos fases de decaimiento: una rápida en la que en el primer segundo se observa una disminución de 4.8°C y una segunda fase lenta de alrededor de 30 segundos. Además de proporcionar evidencia experimental que apoya la existencia de cambios intracelulares de temperatura de más de 1°C , este trabajo es sumamente relevante, debido a que emplea un sensor que detectan señales distintas a las de fluorescencia. Esto resulta oportuno puesto que uno de los argumentos en contra de las determinaciones hasta ahora reportadas, es que en su mayoría utilizan sensores basados en señales de fluorescencia; por lo que podrían verse afectadas por otras condiciones no consideradas y los resultados podrían interpretarse erróneamente.

10 Conclusiones

De la revisión en la literatura, se seleccionaron 3 moléculas como posibles sensores de temperatura intracelular.

De ellos, Mito Thermo Yellow no fue evaluado puesto que no se encuentra disponible de forma comercial. Sin embargo, al mostrar un gran potencial, se propuso una ruta de síntesis orgánica que permita evaluarla en trabajos posteriores evaluarla.

El polímero FDV-0005 fue descartado debido a que la internalización en células CHO-S únicamente se logró por electroporación. Además, la distribución no es homogénea y es aleatoria.

Finalmente, se propuso el sensor gTemp. Éste mostró capacidad de respuesta *in vivo* e *in vitro* a los cambios de temperatura, sin embargo, el perfil de intensidad parece no corresponder con expresión equimolar.

Se propuso el decremento en la intensidad de fluorescencia como una alternativa a la razón. A través de dicho parámetro se determinó el cambio de temperatura al desacoplar la OXPPOS.

Se encontró un aumento de temperatura de 7.4°C en citoplasma, mientras que a nivel mitocondrial no se observaron cambios. Se requieren experimentos adicionales para corroborar las mediciones.

En este trabajo se realizó un acercamiento a la determinación de temperatura intracelular, sin embargo, se requiere ahondar en múltiples aspectos que permitan robustecer y sustentar los análisis y la información generada, tales como el o los sensores utilizados, el sistema de captura y los métodos de transfección/marcaje.

Dado que la termometría intracelular es un rama de investigación en crecimiento y dado sus implicaciones es necesario estudiar el fenómeno desde aspectos básicos, como la actividad enzimática, la composición de los organelos y/o análisis teóricos.

11 Perspectivas

Uno de los aspectos fundamentales para lograr entender la generación de calor y las diferencias de temperatura al interior de la célula, es conocer la temperatura en condiciones basales. Por ello, realizar determinaciones puntuales es sumamente relevante. Aunque el alcance de este trabajo no permitió realizar dichas mediciones, se sugiere emplear puntos de referencia como otros organelos o el medio circundante. Aunque se observó que la expresión de gTemp es variable entre transfecciones, una estrategia para realizar determinaciones puntuales es efectuar una calibración por cada transfección, de tal forma que se considere las condiciones específicas de cada experimento. Para ello es necesario capturar imágenes con el sistema Optosplit para coleccionar ambas señales en paralelo (Apéndice 11.2)

Otro aspecto clave para entender las diferencias de temperatura intracelular es determinar el papel del metabolismo en la generación de calor. En el contexto de este trabajo, se propone determinar si existen diferencias de temperatura, particularmente entre mitocondrias y citoplasma de células CHO con diferentes perfiles metabólicos (líneas celulares modificadas); así como evaluar el efecto de crecer las células a diferentes velocidades de crecimiento, concentración celular o al producir proteínas recombinantes. Dicha información permitiría evaluar si la respuesta de temperatura correlaciona con la actividad celular.

Respecto al sensor, se podría considerar hacer adecuaciones que permitan obtener una relación equimolar de ambas proteínas, como la generación de formas quiméricas de Sirius y mT-Sapphire; o bien la evaluación de sensores adicionales de interés, como Mito Thermo Yellow.

Como se mencionó anteriormente, en la sección 8.6 “Aproximaciones teóricas al cálculo de la temperatura intracelular”, uno de los argumentos que desestiman las determinaciones se relaciona con la señal de detección empleada (fluorescencia), por lo que se propone realizar determinaciones independientes a través del uso de señales alternas como el potencial de membrana.

12 Apéndices

12.1 Ruta de síntesis de Mito Thermo Yellow

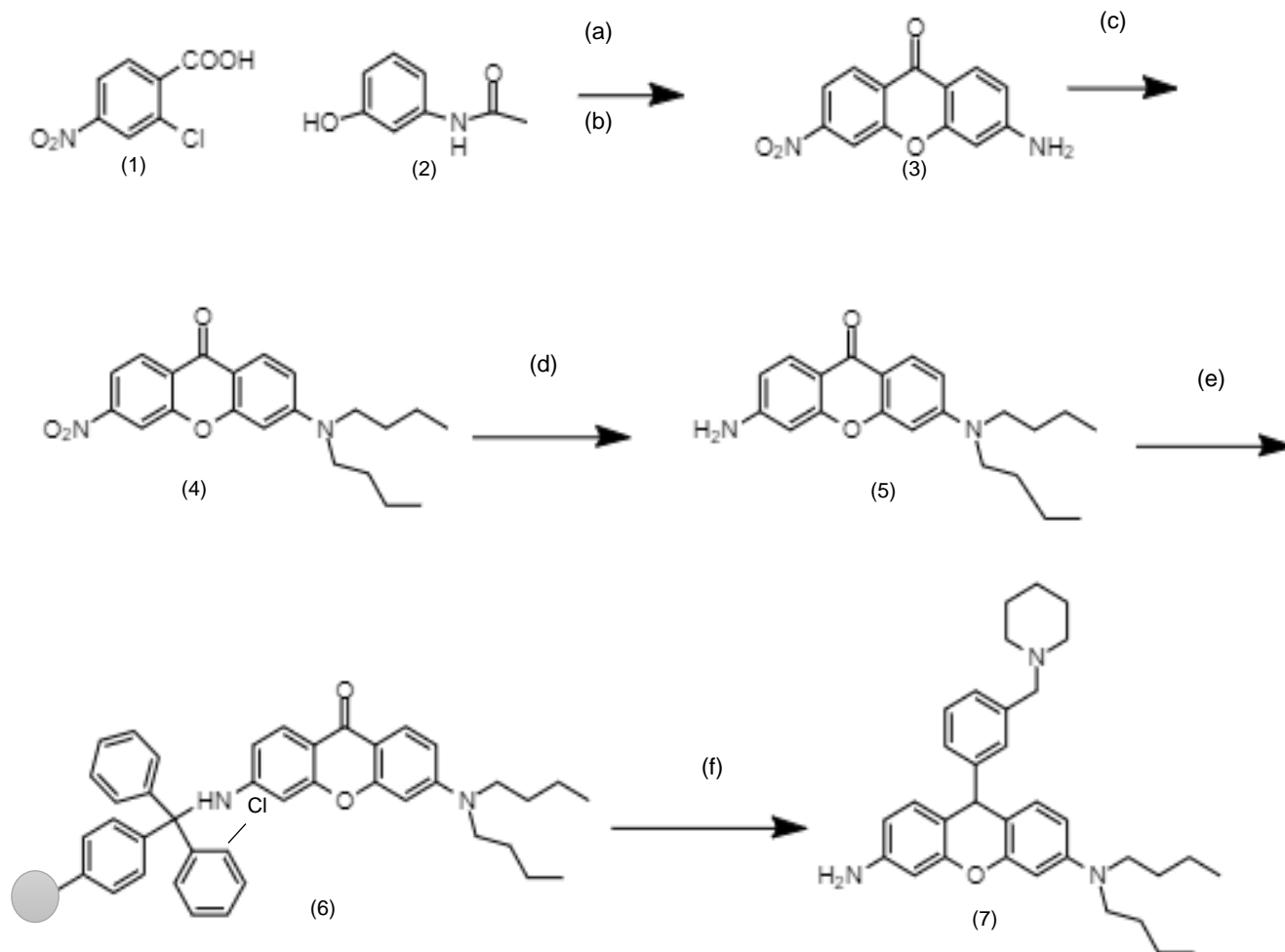
Mito Thermo Yellow es una sonda que se obtuvo a través de química combinatoria (Y. Ahn et al., 2007; Y. H. Ahn et al., 2007). Dicha técnica permite sintetizar una batería de moléculas que comparten una estructura base, a la que se incorporan una variedad de sustituyentes. Al conjunto de nuevas estructuras que se generan se les denomina librería.

Dado que el comportamiento de cada molécula está determinado por los átomos presentes y su disposición en el espacio, en las librerías se diversifican las propiedades del compuesto precursor.

Durante la caracterización realizada por Ahn et al. (2017), se encontró que la molécula MTY funciona como un sensor de temperatura. Se sugiere que la ausencia del grupo carboxilo en la posición 2 del fenilo, le confiere flexibilidad o libertad de rotación; característica fundamental que brinda a los fluoróforos sensibilidad a la temperatura.

Debido a las características mencionadas, MTY es un candidato relevante para efectos del presente trabajo. Pese a que, por razones de tiempo, no se efectuó la síntesis y evaluación del compuesto, en este apartado se reporta la ruta de síntesis orgánica y se proponen reacciones alternativas que permiten adecuar el proceso para la obtención de un solo producto final, en vez de la librería completa; así como las síntesis de algunos precursores que no se encuentran ya disponibles de manera comercial.

Dentro de la ruta de síntesis original (Figura 11.1), los autores proponen en la reacción (e), el uso del soporte sólido cloruro de 2-clorotitrilo. Este tipo de resinas se emplean en síntesis orgánica en fase sólida y son particularmente útiles en la generación de librerías combinatorias. La incorporación de este soporte cumple dos funciones principales: la protección de la amina primaria del intermediario (5) y facilitar la purificación del producto. Sin embargo, para efectos de la síntesis de una sola molécula objetivo (MTY), pueden emplearse métodos mucho más accesibles y sencillos.



- (a) K_2CO_3 , Cu, DMF, 130 °C
 (b) H_2SO_4 concentrado
 (c) Iodobutano, NaH, DMF
 (d) SnCl_2 , EtOH
 (e) Resina de cloruro de clorotritilo, DMF, Piridina
 (f) Bromuro de [3-(1-piperidinilmetil) fenil] magnesio

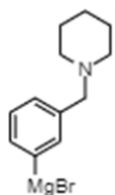


Figura 12.1 Ruta de síntesis orgánica de Mito Thermo Yellow

Una estrategia alternativa para proteger aminas primarias es a través de la incorporación de dicarbonato de diterc-butilo (Boc_2O) (9), como se muestra en la Figura 11.2. Esta reacción (g) sustituiría a la reacción (e), por lo que después de la reacción con la sal de Grignard (f), debe realizarse la eliminación del grupo protector, a través de un reflujo a $65\text{ }^\circ\text{C}$, en Tolueno, en presencia de HCl , que daría como resultado el producto final (7)

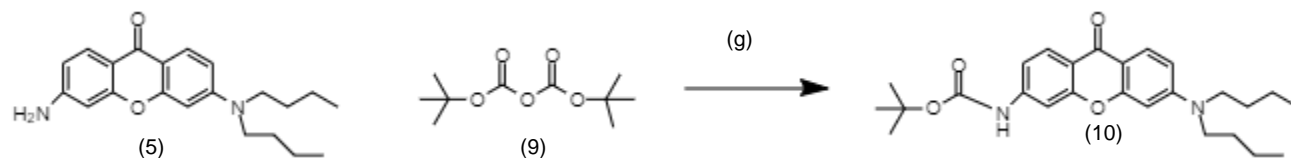


Figura 12.2 Protección de grupo amina en (5) por Boc_2O

12.2 Sistema de captura de imágenes con divisor de imágenes

Para realizar la captura de imágenes en paralelo, se configuró un sistema compuesto por un microscopio de epifluorescencia, acoplado a un divisor de imágenes Optosplit Cairn II. Debido a que la captura de dos regiones distintas del espectro es necesario emplear un objetivo 60 x Apocromático, que ayude a disminuir la aberración cromática. Dentro del divisor de imágenes, se requieren de la presencia de 2 filtros y un espejo dicróico que permita separar y filtrar las señales (Figura 11.3).

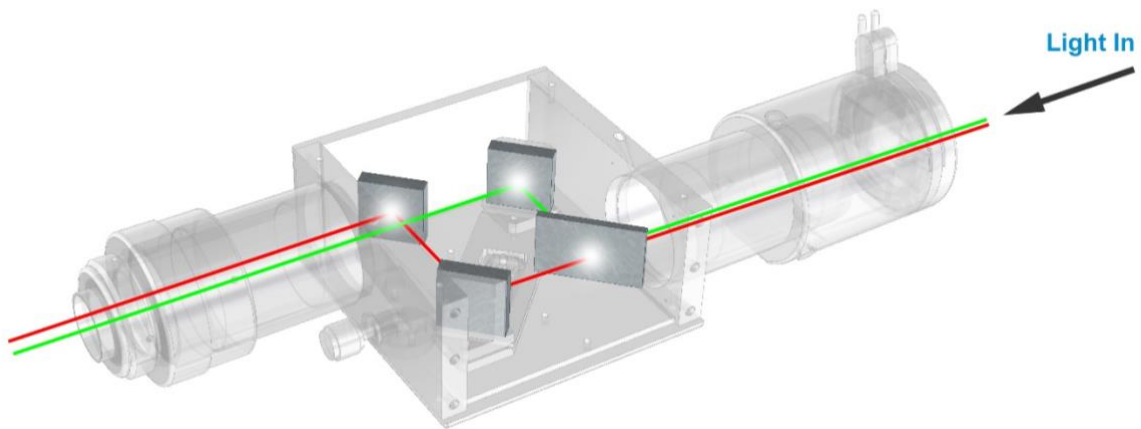


Figura 12.3 Esquema del divisor de imágenes Optosplit Cairn II

El espejo dicróico seleccionado fue el T470Lpxr, que permite el paso de longitudes de onda mayores a 470 nm y refleja por debajo de esas longitudes de onda. Así, pueden separarse las señales de ambas proteínas. Para asegurar que no haya contaminación de la señal de cada una de las proteínas, se emplearon 2 filtros:

-D425/60x. Permite la captura de señales que se sitúan entre 355 nm-455 nm; es decir, permite capturar la longitud de máxima emisión de Sirius.

-HQ560/50M. Permite la captura de señales entre 535 nm-585 nm. Para mT-Sapphire se seleccionó la porción final del espectro, en vez de las longitudes de onda cercanas al máximo de emisión.

Esta decisión se tomó dado que en las condiciones seleccionadas de captura para obtener relaciones señal-ruido para Sirius adecuadas, la señal de mT-Sapphire se sobreexpone en las imágenes, si se

captura la máxima emisión. Así, que al emplear un filtro que permita capturar una zona de menor intensidad de emisión, se logra obtener señales adecuadas para ambas proteínas (Figura 11.4).

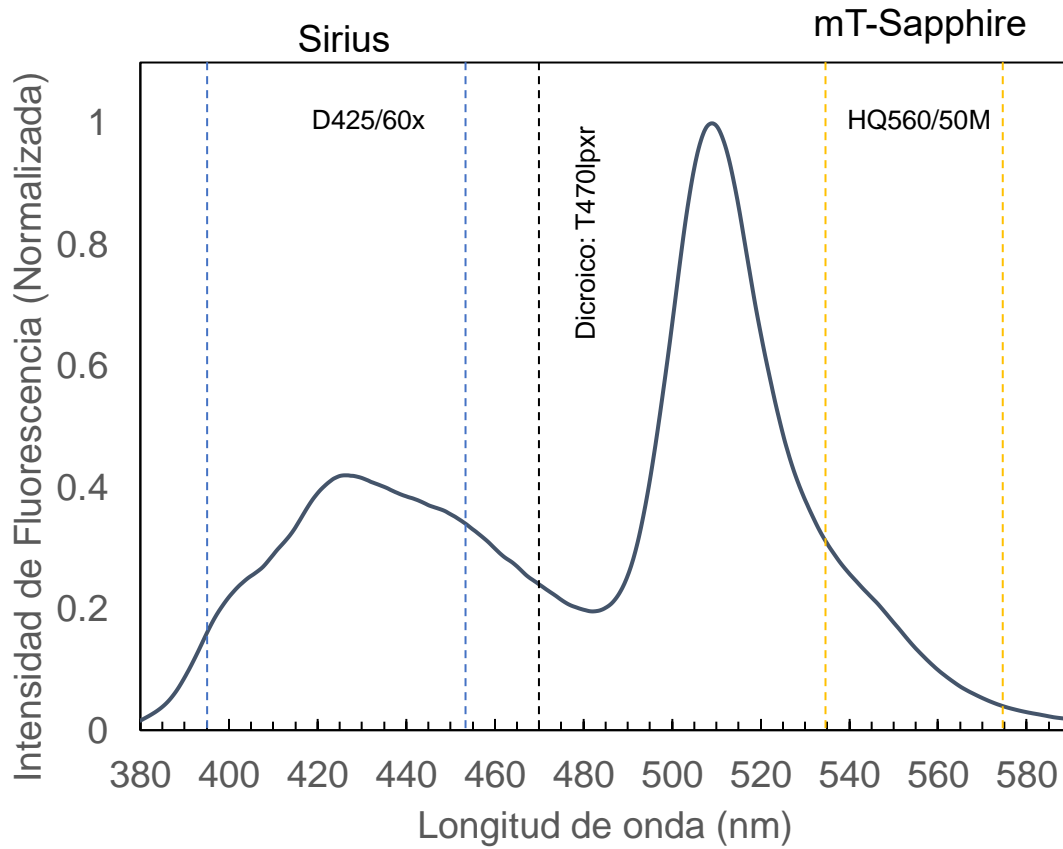


Figura 12.4 Separación y filtración de las señales de Sirius y mT-Sapphire en el sistema dual de captura de imágenes. Con la línea negra se indica la división de ambas señales a través del espejo dicroico seleccionado; con líneas azules la porción del espectro de Sirius y en líneas amarillas, la porción del espectro de mT-Sapphire

12.3 Optimización de las condiciones de electroporación

Aunque en primera instancia la lipofección resulta una mejor opción (Tabla 9.6), se buscó optimizar un protocolo de electroporación como una alternativa para obtener mejores resultados que el protocolo inicialmente propuesto.

Pese a que el proceso en sí afecta en forma importante a la viabilidad y la adhesión, es posible adecuar el protocolo para mejorar ambas características, sin perder eficiencia.

El protocolo de electroporación rutinario dentro del laboratorio para células CHO-S es 280 V / 800 μ F. Adicionalmente se contaba con un protocolo de referencia de 160 V /15 ms, que se indica como un protocolo para células de mamífero. Ambas condiciones se emplearon como referencia para proponer las condiciones alternativas. Se modificó el medio de electroporación y la duración del pulso a través del voltaje. Todas las pruebas se realizaron con el plásmido mito_gTemp, para poder comparar los resultados.

Se había observado que el protocolo a 280 V / 800 μ F permitía obtener eficiencias altas, pero provocaba efectos no deseados (baja viabilidad y problemas de adhesión). Sin embargo, al modificar las condiciones a 160 V /15 ms, se observó una eficiencia de transfección nula. Esto indicaba, que un campo eléctrico bajo, tampoco es benéfico pues se pierde la eficiencia del proceso.

Con base en lo anterior, se programaron condiciones en las que se mantuviera el campo eléctrico. Así, la capacitancia se mantuvo constante y se empleó voltaje de 200 y 240 V. Como consecuencia, al disminuir el voltaje, el tiempo del pulso se alarga.

Por otro lado, se decidió evaluar el medio de electroporación puesto que, de acuerdo con la literatura, la composición del medio puede tener un efecto importante sobre la eficiencia del proceso y el estado celular. Las condiciones propuestas se probaron en el medio CD-CHO, que es el de uso rutinario y en PBS. De los resultados obtenidos para las diferentes condiciones de voltaje, se observa que la adhesión se recupera y la viabilidad mejora de forma importante, pues se alcanzan valores cercanos al 100 % en todas las pruebas (Tabla 12.1). Al evaluar el efecto del medio, se observa que la eficiencia es más alta en las células electroporadas en el medio CD-CHO, por lo que el PBS fue descartado.

Finalmente, se seleccionó la condición de 240 V / 800 μ F, puesto que se obtiene la eficiencia más alta, en la que además se obtiene viabilidad alta y adhesión celular.

Al realizar un balance del costo y el beneficio entre los métodos de lipofección y electroporación, el nuevo protocolo reúne todas las características deseables a un bajo costo. Por ello, se propone que en futuros experimentos con el sistema de captura de imágenes dual, se empleen células transfectadas con el protocolo aquí reportado.

Tabla 12.1 Selección de condiciones de electroporación de células CHOS-S.

Condiciones programadas		Condiciones observadas		Viabilidad (%)	Eficiencia (%)	Observaciones
Voltaje (V)	Capacitancia (μ F)	Voltaje (V)	Tiempo (ms)			
280	800	275	17.2	78	46	Protocolo de referencia/ sin adhesión
160	-	-	15	79	~0	Protocolo precargado/adhesión
200	800	198	17.4	98	27.7	CD CHO /adhesión
240	800	236	16	98	51	CD CHO/adhesión
200	800	199	14.8	97	7	PBS /adhesión
240	800	235	12	95	22.4	PBS /adhesión

13 Referencias

- Ahn, Y. H., Lee, J. S., & Chang, Y. T. (2007). Combinatorial rosamine library and application to in vivo glutathione probe. *Journal of the American Chemical Society*, 129(15), 4510–4511. <https://doi.org/10.1021/ja068230m>
- Ahn, Y., Lee, J., & Chang, Y. (2007). Supporting Information Combinatorial Rosamine Library and Application to in vivo Glutathione probe. *Synthesis*, 3(40 mL), 1–15.
- Allied Market Research. (2017). *Global Protein Therapeutics Market, oportunities and forecasts, 2017-2023*. LS: Pharmaceuticals. <https://www.alliedmarketresearch.com/protein-therapeutics-market>
- Arai, S., Lee, S.-C., Zhai, D., Suzuki, M., & Chang, Y. T. (2014). A molecular fluorescent probe for targeted visualization of temperature at the endoplasmic reticulum. *Scientific Reports*, 4(liv), 2–7. <https://doi.org/10.1038/srep06701>
- Arai, S., Suzuki, M., Park, S., Yoo, J. S., Wang, L., Kang, N., Ha, H., & Chang, Y. (2015a). Mitochondria-targeted fluorescent thermometer monitors intracellular temperature gradient†. *Chemical Communications*, 51(0), 8044–8047. <https://doi.org/10.1039/C5CC01088H>
- Arai, S., Suzuki, M., Park, S., Yoo, J. S., Wang, L., Kang, N., Ha, H., & Chang, Y. (2015b). monitors intracellular temperature gradient †. *Chemical Communications*, 51(0), 8044–8047. <https://doi.org/10.1039/C5CC01088H>
- Baffou, G., Rigneault, H., Marguet, D., & Jullien, L. (2014). A critique of methods for temperature imaging in single cells. *Nature Methods*, 11(9), 899–901. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3073>
- Baffou, G., Rigneault, H., Marguet, D., & Jullien, L. (2015). Reply to: Validating subcellular thermal changes revealed by fluorescent thermosensors and The 10 5 gap issue between calculation and measurement in single-cell thermometry. *Nature Methods*, 12(9), 803. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3552>

-
- Bai, T., & Gu, N. (2016). Micro/Nanoscale Thermometry for Cellular Thermal Sensing. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 12(34), 4590–4610. <https://doi.org/10.1002/smll.201600665>
- Bastos, A. R. N., Brites, C. D. S., Rojas-Gutierrez, P. A., DeWolf, C., Ferreira, R. A. S., Capobianco, J. A., & Carlos, L. D. (2019). Thermal Properties of Lipid Bilayers Determined Using Upconversion Nanothermometry. *Advanced Functional Materials*, 29(48), 1–10. <https://doi.org/10.1002/adfm.201905474>
- Bottcher, H., & Furst, P. (1997). Direct microcalorimetry as a technique in cell cultures. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 11(4), 739–752. [https://doi.org/10.1016/S0950-351X\(97\)81006-3](https://doi.org/10.1016/S0950-351X(97)81006-3)
- Brites, C. D. S., Lima, P. P., Silva, N. J. O., Millán, A., Amaral, V. S., Palacio, F., & Carlos, L. D. (2012). Thermometry at the nanoscale. *Nanoscale*, 4(16), 4799. <https://doi.org/10.1039/c2nr30663h>
- Bulté, D. B., Palomares, L. A., Parra, C. G., Martínez, J. A., Contreras, M. A., Noriega, L. G., & Ramírez, O. T. (2020). Overexpression of the Mitochondrial Pyruvate Carrier reduces lactate production and increases recombinant protein productivity in CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, April. <https://doi.org/10.1002/bit.27439>
- Chrétien, D., Bénit, P., Hyung-Ho Ha, Susanne Keipert, R. E., & Khoury, Young-Tae Chang, Martin Jastroch, Howard T. Jacobs, Pierre Rustin, M. R. (2018). Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 ° C. *PLOS Biology*, 16(1), 1–17.
- Chung, J. Y., Lim, S. W., Hong, Y. J., Hwang, S. O., & Lee, G. M. (2004). Effect of Doxycycline-Regulated Calnexin and Calreticulin Expression on Specific Thrombopoietin Productivity of Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(5), 539–546. <https://doi.org/10.1002/bit.10919>
- Compan, V., Pierredon, S., Krznar, P., Marchiq, I., & Zamboni, N. (2015). Monitoring Mitochondrial Pyruvate Carrier Activity in Real Time Using a BRET-Based Biosensor: Investigation of the Warburg Effect Technology Monitoring Mitochondrial Pyruvate Carrier Activity in Real Time Using a BRET-Based Biosensor: Investigation of t. 491–501. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.035>
-

-
- David, K. (1966). The localization of the respiratory processes in the tissues. In *The History of Cell Respiration and Cytochrome* (pp. 34–81).
- Deshpande, O. A., & Mohiuddin, S. S. (2019). *Biochemistry, Oxidative Phosphorylation*. StatPearls NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553192/>
- Donnelly, M. L. L., Luke, G., Mehrotra, A., Li, X., Hughes, L. E., Gani, D., & Ryan, M. D. (2001). Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein “cleavage” mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: A putative ribosomal “skip.” *Journal of General Virology*, 82(5), 1013–1025. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-5-1013>
- Doyle, C., & Butler, M. (1990). The effect of pH on the toxicity of ammonia to a murine hybridoma. *Journal of Biotechnology*, 15(1–2), 91–100. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(90\)90053-E](https://doi.org/10.1016/0168-1656(90)90053-E)
- Engelhardt, W. A., & Ljubimowa, M. N. (1939). Myosine and Adenosinetriphosphatase. *Nature*, 144(3650), 668–669. <https://doi.org/10.1038/144668b0>
- Fenzl, A., & Kiefer, F. W. (2014). Brown adipose tissue and thermogenesis. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 19(1), 25–37. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2014-0022>
- FPbase. (n.d.). *mT-Sapphire- Fluorescent Protein Base*. <https://www.fpbase.org/protein/mt-sapphire/>
- Fritz, L. (1941). Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (pp. 100–158).
- Gao, L., Zhang, C., Li, C., & Wang, L. V. (2017). *Intracellular temperature mapping with fluorescence-assisted*. 193705(2013).
- Giepmans, B., Adams, S., Ellisman, M., & Tsien, R. (2006). The Fluorescent Toolbox for Assessing. *Science*, 312, 217–225.
- Hacker, D. L., De Jesus, M., & Wurm, F. M. (2009). 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells - Where do we go from here? *Biotechnology Advances*, 27(6), 1023–1027. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.05.008>
- Hart, J. S., Heroux, O., & Depocas, F. (1956). Cold Acclimation and the electromyogram of unanesthetized rats. *Journal of Applied Physiology*, 9(3), 404–408.
-

-
- Hir, L., Nott, A., & Moore, M. J. (2003). How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(4), 215–220. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00052-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00052-5)
- Jarmuszkiewicz, W., Woyda-Ploszczyca, A., Antos-Krzeminska, N., & Sluse, F. E. (2010). Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1797(6–7), 792–799. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.12.005>
- Jastroch, M., Hirschberg, V., & Klingenspor, M. (2012). Functional characterization of UCP1 in mammalian HEK293 cells excludes mitochondrial uncoupling artefacts and reveals no contribution to basal proton leak. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(9), 1660–1670. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.05.014>
- Jayapal, K., Wlaschin, K., Hu, W., & Yap, G. (2007). Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*, 103(10), 40–47.
- Jinyou, Z. (2012). Biopharmaceutical Production Technology. *Biopharmaceutical Production Technology*, 104. <https://doi.org/10.1002/9783527653096>
- Kang, J. S. (2017). Theoretical Model and Characteristics of Mitochondrial Thermogenesis. *ArXiv*, 4(2), 63–67. <https://doi.org/10.1007/s41048-018-0054-2>
- Kayser, K., Lin, N., Allison, D., Donahue, L., & Caple, M. (2006). Cell Line Engineering Methods for Improving Productivity. *BioProcess International*, 4, 6–13.
- Keilin, D., & King, T. E. (1958). Reconstitution of the succinic oxidase system from soluble succinic dehydrogenase and a particulate cytochrome system preparation. *Nature*, 181(4622), 1520–1522. <https://doi.org/10.1038/1811520a0>
- Kim, J. Y., Kim, Y. G., & Lee, G. M. (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 917–930. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3758-5>
- Kiyonaka, S., Sakaguchi, R., Hamachi, I., Morii, T., Yoshizaki, T., & Mori, Y. (2015). Validating subcellular thermal changes revealed by fluorescent thermosensors. *Nature Methods*, 12(9), 801–802. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3548>

-
- Kostarelos, K., Lacerda, L., Pastorin, G., Wu, W., Wieckowski, S., Luangsivilay, J., Godefroy, S., Pantarotto, D., Briand, J. P., Muller, S., Prato, M., & Bianco, A. (2007). Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nature Nanotechnology*, 2(2), 108–113. <https://doi.org/10.1038/nnano.2006.209>
- Lacerda, L., Russier, J., Pastorin, G., Herrero, M. A., Venturelli, E., Dumortier, H., Al-Jamal, K. T., Prato, M., Kostarelos, K., & Bianco, A. (2012). Translocation mechanisms of chemically functionalised carbon nanotubes across plasma membranes. *Biomaterials*, 33(11), 3334–3343. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.024>
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Springer, Ed.; Third).
- Li, S., Gao, X., Peng, R., Zhang, S., Fu, W., & Zou, F. (2016). FISH-based analysis of clonally derived CHO cell populations reveals high probability for transgene integration in a terminal region of chromosome 1 (1q13). *PLoS ONE*, 11(9), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163893>
- Lowell, B. B., & Spiegelman, B. M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, 404(6778), 652–660. <https://doi.org/10.1038/35007527>
- Lucia, U., Grazzini, G., Montrucchio, B., Grisolia, G., Borchiellini, R., Gervino, G., Castagnoli, C., Ponzetto, A., & Silvagno, F. (2015). Constructal thermodynamics combined with infrared experiments to evaluate temperature differences in cells. *Scientific Reports*, 5(February), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep11587>
- Makrides, S. C. (1999). Components of Vectors for Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. *Protein Expression and Purification*, 202, 183–202.
- Monti, M., Nilsson-Ehle, P., Sörbris, R., & Wadsö, I. (1980). Microcalorimetric measurement of production heat in isolated human adipocytes. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 40(6), 581–587. <https://doi.org/10.3109/00365518009091968>
- Mozo, J., Ferry, G., Studeny, A., Pecqueur, C., Rodriguez, M., Boutin, J. A., & Bouillaud, F. (2006). Expression of UCP3 in CHO cells does not cause uncoupling, but controls mitochondrial activity in the presence of glucose. *Biochemical Journal*, 393(1), 431–439. <https://doi.org/10.1042/BJ20050494>

-
- Nakano, M., Arai, Y., Kotera, I., Okabe, K., Kamei, Y., & Nagai, T. (2017a). Genetically encoded ratiometric fluorescent thermometer with wide range and rapid response. *PLOS ONE*, *12*(2), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172344>
- Nakano, M., Arai, Y., Kotera, I., Okabe, K., Kamei, Y., & Nagai, T. (2017b). Genetically encoded ratiometric fluorescent thermometer with wide range and rapid response. *PLoS ONE*, *12*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172344>
- Nakano, M., & Nagai, T. (2017). Thermometers for monitoring cellular temperature. In *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2016.12.001>
- Nath, S. (2016). The thermodynamic efficiency of ATP synthesis in oxidative phosphorylation. *Biophysical Chemistry*, *219*, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2016.10.002>
- Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A., & Cannon, B. (2001). *UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency*. *1504*, 82–106.
- Okabe, K., Inada, N., Gota, C., Harada, Y., Funatsu, T., & Uchiyama, S. (2012). fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nature Communications*, *3*, 705–709. <https://doi.org/10.1038/ncomms1714>
- Okabe, K., Sakaguchi, R., Shi, B., & Kiyonaka, S. (2018). Intracellular thermometry with fluorescent sensors for thermal biology. *European Journal of Physiology*, *470*, 717–731.
- Pagliarini, D. J., & Rutter, J. (2013). Hallmarks of a new era in mitochondrial biochemistry. *Genes and Development*, *27*(24), 2615–2627. <https://doi.org/10.1101/gad.229724.113>
- Park, H., Kim, I., Kim, I., Kim, K., & Kim, H. (2000). Expression of carbamoyl phosphate synthetase I and ornithine transcarbamoylase genes in Chinese hamster ovary dhfr⁻ cells decreases accumulation of ammonium ion in culture media. *Journal of Biotechnology*, *81*, 129–140.
- Paulik, M., Buckholz, R., MaryLancaster, Dallas, W., Hull-Ryde, E., Weiel, J., & Lenhard, J. (1998). Development of Infrared Imaging to measurement thermogenesis in cell culture: thermogenic effects of uncoupling protein-2, Troglitazone, and B-adrenoreceptor agonist. *Pharmaceutical Research*, *15*(6), 944–949.

-
- Peng, R. W., & Fussenegger, M. (2009). Molecular engineering of exocytic vesicle traffic enhances the productivity of chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(4), 1170–1181. <https://doi.org/10.1002/bit.22141>
- PhRMA. (2017). *Chart Pack – Biopharmaceuticals In Perspective* (p. 152).
- Prusiner, S., & Poe, M. (1968). Thermodynamic considerations of mammalian thermogenesis. *Nature*, 220(5164), 235–237.
- Qiao, J., Qi, L., Zhao, L., Qi, C., Shanguan, D., Mao, L., & Chen, Y. (2012). Thermal responsive fluorescent block copolymer for intracellular temperature. *Chemistry, Journal of Materials*, 22, 11543–11549. <https://doi.org/10.1039/c2jm31093g>
- Rajagopal, M. C., Brown, J. W., Gelda, D., Valavala, K. V., Wang, H., Llano, D. A., Gillette, R., & Sinha, S. (2019). Transient heat release during induced mitochondrial proton uncoupling. *Communications Biology*, 2(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0535-y>
- Research, B. (2019). *2019 Biotechnology Research Review*. <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/biotechnology-research-review.html>
- Richards, E. J., & Elgin, S. C. R. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: Rounding up the usual suspects. *Cell*, 108(4), 489–500. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00644-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00644-X)
- Ronquist, G., & Waldenström, A. (2003). Imbalance of plasma membrane ion leak and pump relationship as a new aetiological basis of certain disease states. *Journal of Internal Medicine*, 254(6), 517–526. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2003.01235.x>
- Santesson, C. G. (1923). *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1922*. Les Prix Nobel. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1922/ceremony-speech/>
- Smith, R. E. (1964a). Brown fat in the rat: adaptive changes in cold. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 9(1–4), 187–196. <https://doi.org/10.1007/BF01610032>
- Smith, R. E. (1964b). Thermoregulatory and adaptive behavior of brown adipose tissue. *Science*, 146(3652), 1686–1689. <https://doi.org/10.1126/science.146.3652.1686>

-
- Smith, R., & Hock, R. (1963). Brown Fat : Thermogenic Effector of Arousal in Hibernators Author (s): Robert E . Smith and Raymond J . Hock Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1710991>. *Science*, 140(3563), 199–200.
- Stoward, P. (1962). Thermodynamics of Biological Growth. *Nature*, 196, 952–953.
- Suzuki, M., Zeeb, V., Arai, S., Oyama, K., & Ishiwata, S. (2015). The 105 gap issue between calculation and measurement in single-cell thermometry. *Nature Methods*, 12(9), 802–803. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3551>
- Tsuji, T., Yoshida, S., Yoshida, A., & Uchiyama, S. (2013). *Cationic Fluorescent Polymeric Thermometers with the Ability to Enter Yeast and Mammalian Cells for Practical Intracellular Temperature Measurements*. <https://doi.org/10.1021/ac402128f>
- Uchiyama, S., Gota, C., Tsuji, T., & Inada, N. (2017). Intracellular temperature measurements with fluorescent polymeric thermometers. *Chem. Commun.*, 53, 10976–10992. <https://doi.org/10.1039/C7CC06203F>
- Uchiyama, S., Kimura, K., Gota, C., Okabe, K., Kawamoto, K., Inada, N., Yoshihara, T., & Tobita, S. (2012). Environment-sensitive fluorophores with benzothiadiazole and benzoselenadiazole structures as candidate components of a fluorescent polymeric thermometer. *Chemistry - A European Journal*, 18(31), 9552–9563. <https://doi.org/10.1002/chem.201200597>
- Uchiyama, S., Matsumura, Y., Silva, A. P. De, & Iwai, K. (2003). *Fluorescent Molecular Thermometers Based on Polymers Showing Temperature-Induced Phase Transitions and Labeled with Polarity-Responsive Benzofurazans*. 75(21), 5926–5935. <https://doi.org/10.1021/ac0346914>
- Uchiyama, S., Tsuji, T., Ikado, K., & Yoshida, A. (2015). A cationic fluorescent polymeric thermometer for the ratiometric sensing of intracellular temperature. *Analyst*, 140, 4498–4506. <https://doi.org/10.1039/c5an00420a>
- Vazquez-Duhalt, R. (2002). Flujos energéticos celulares. In AGT Editor (Ed.), *Termodinámica biológica* (p. 223).

-
- Wahrheit, J., Niklas, J., & Heinzle, E. (2014). Metabolic control at the cytosol-mitochondria interface in different growth phases of CHO cells. *Metabolic Engineering*, 23, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.02.001>
- Wiebe, M., Becker, F., Lazar, R., May, L., Casto, B., & Semense, M. (1989). A Multifaceted approach to ensure that recombinant tPA is free of adventitious virus. *Advances in Animal Cell Biology and Technology for Processes*, 68–71.
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1393–1398. <https://doi.org/10.1038/nbt1026>
- Wurm, F. M., & Hacker, D. (2011). First CHO genome. *Nature Biotechnology*, 29(8), 718–720. <https://doi.org/10.1038/nbt.1943>
- Yang, M., & Butler, M. (2000). Effects of Ammonia on CHO Cell Growth, Erythropoietin Production, and Glycosylation. *Biotechnol Bioeng*, 68, 370–380. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000520\)68:4<370::AID-BIT2>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000520)68:4<370::AID-BIT2>3.0.CO;2-K)
- Yu, X. X., Mao, W., Zhong, A., Schow, P., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H., & Pan, G. (2000). Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation. *The FASEB Journal*, 14(11), 1611–1618. <https://doi.org/10.1096/fj.99-0834com>
- Zagari, F., Jordan, M., Stettler, M., Broly, H., & Wurm, F. M. (2013). Lactate metabolism shift in CHO cell culture: The role of mitochondrial oxidative activity. *New Biotechnology*, 30(2), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.05.021>
- Zhu, J. (2012). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1158–1170. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.022>
- Zohar, O., Ikeda, M., Shinagawa, H., Inoue, H., Nakamura, H., Elbaum, D., Alkon, D. L., & Yoshioka, T. (1998). Thermal Imaging of Receptor-Activated Heat Production in Single Cells. *Biophysical Journal*, 74(1), 82–89. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77769-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77769-0)