



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTUDIO PROTEÓMICO COMPARATIVO DE MITOCONDRIAS DE CÉLULAS CHO PRODUCTORAS DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-IL8

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

PRESENTA:

MIGUEL ANGEL ROBLES RÓMAN

TUTOR O TUTORES PRINCIPALES

**DRA. NORMA ADRIANA VALDEZ CRUZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DRA. CLARITA CARRANZA OLVERA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**

**DR. MARTÍN GUSTAVO PEDRAZA ALVA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA CD. MX., JULIO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se realizó bajo la tutoría de la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz en su laboratorio, perteneciente al Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México. Los experimentos fueron llevados a cabo en los laboratorios C-132 y C-036, así como en la Unidad de Bioprocesos (a cargo del Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán), del mismo instituto. Durante la realización de este proyecto se contó con los apoyos económicos de los proyectos PAPIIT-UNAM IN210822, IV201220, IN210419, IN209116, IN 208415, otorgados a la Dra. Valdez. También se contó con el apoyo del Programa de Investigación de Producción de Biomoléculas.

La revisión de la introducción, resultados y discusión a lo largo de la maestría tuvo apoyo por parte de la Dra. Clarita Olvera Carranza y el Dr. Gustavo Martín Pedraza Alva que formaron parte del comité tutor y aportaron sus críticas a lo largo del desarrollo de este trabajo.

La revisión final del presente trabajo se llevó a cabo por el comité sinodal conformado por los doctores: Elda Guadalupe Espín Ocampo, Bertha Espinoza Gutiérrez, María del Carmen Beltrán Núñez, Luis Padilla Noriega y Lilian González Segura.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi madre Celia Román ya que con tus esfuerzos impresionantes y tu amor me has brindado educación y me has proporcionado cada una de las cosas que he necesitado en mi vida. Tu apoyo es fundamental para seguir con mi formación y por ti soy quien soy.

A mis hermanos Jorge Isaac y Eunice Anahí por estar presentes en los momentos buenos y malos de mi vida personal y contar con su apoyo. Además, por ayudarme a reír en tiempos complicados.

A mis tíos Florencio Guzmán y Minerva Román por apoyarme de manera incondicional en uno de los cambios más bruscos de mi vida.

A mi familia ya que he aprendido cosas valiosas de ustedes y estuvieron apoyándome durante el desarrollo de mi tesis.

A Luisa García por brindarme soporte y apoyo en mis situaciones académicas y personales. Por motivarme continuamente a lograr mi objetivo e instaurar nuevas metas en mi vida.

A mis maestros, compañeros y a la universidad por brindarme buenas herramientas y conocimiento para poder enfrentarme al mundo laboral.

A mis tutores por sus críticas constructivas para la mejora continua de la presente tesis.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.....	I
AGRADECIMIENTOS PERSONALES.....	II
ÍNDICE.....	III
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE ANEXOS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	XII
RESUMEN.....	XV
SUMMARY.....	XVI
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Impacto e importancia de las células CHO en el ámbito biotecnológico y farmacéutico.....	1
1.2 Ventajas de las células CHO como sistema de expresión de PR.....	1
1.3 Generalidades fisiológicas y metabólicas de las células CHO.....	2
2 ANTECEDENTES.....	3
2.1 Particularidades metabólicas de las células CHO.....	3
2.2 Implicación del metabolismo energético mitocondrial en la productividad de PR en estudios “Ómicos” de células CHO.....	5
2.3 Caracterización cinética y metabólica de células CHO productoras de PR.....	7
2.4 Importancia y ventajas de los estudios proteómicos subcelulares.....	8
2.5 Fraccionamiento y obtención de los datos proteómicos analizados en este estudio.....	8
2.6 Proteómicas en células CHO recombinantes y el metabolismo energético.....	11
2.7 Papel del estado redox (NAD ⁺ /NADH) en la producción de PR.....	13
2.8 Biogénesis mitocondrial asociada a una mayor productividad de PR.....	16
3 HIPÓTESIS.....	18
4 OBJETIVOS.....	18
4.1 GENERAL.....	18
4.2 ESPECÍFICOS.....	18
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5.1 Caracterización cinética y estequiométrica de las células CRL-12444 y CRL-12445.....	19

5.1.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	19
5.1.2 Medición de metabolito.....	19
5.1.3 Determinación de la productividad específica (<i>qp</i>).....	20
5.1.4 Análisis estadístico.....	20
5.2 Identificación de las proteínas diferenciales asociadas al metabolismo energético entre las líneas CRL-12444 y CRL-12445.....	20
5.2.1 Fraccionamiento subcelular y precipitación de proteínas.....	20
5.2.2 Análisis MS/MS.....	21
5.2.3 Procesamiento, comparación y clasificación de datos proteómicos.....	22
5.3 Validación de los resultados de la proteómica diferencial.....	25
5.3.1 Validación de los datos proteómicos por WB.....	25
5.3.2 Validación indirecta de los datos proteómicos por actividad enzimática de la citrato sintasa.....	27
5.3.3 Análisis estadístico.....	28
5.4 Relación NAD ⁺ /NADH y número de mitocondrias de las líneas CRL-12444 y CRL-12445.....	28
5.4.1 Determinación de la relación NAD ⁺ /NADH.....	28
5.4.2 Extracción y cuantificación de ADN.....	29
5.4.3 Diseño de oligonucleótidos para la qPCR.....	29
5.4.4 PCR cuantitativa (qPCR).....	30
5.4.5 Análisis estadístico.....	32
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1 Caracterización cinética y estequiométrica de las líneas celulares CRL-12444 y CRL-12445.....	33
6.2 Discusión sobre caracterización cinética y estequiométrica de ambas líneas celulares.....	37
6.3 Toma de muestras.....	38
6.4 Identificación de las proteínas diferenciales asociadas al metabolismo energético mitocondrial entre las líneas CRL-12444 y CRL-12445.....	39
6.4.1 Las proteínas relacionadas en el metabolismo energético mitocondrial se encontraron reguladas a la baja en las células de mayor productividad.....	39
6.4.2 Los términos GO muestran un enriquecimiento de proteínas diferenciales mitocondriales y del metabolismo energético.....	41
6.4.3 La cobertura del estudio proteómico subcelular es mayor que los enfocados en célula completa de células CHO.....	43

6.4.4 El ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones se encontraron expresadas a la baja en las células con mayor productividad durante la fase exponencial.....	45
6.5 Validación de los resultados de la proteómica diferencial.....	49
6.5.1 La acumulación diferencial de los candidatos proteicos mediante WB se comportó acorde a los resultados proteómicos.....	49
6.5.2 La actividad de la citrato sintasa es acorde al comportamiento de esta enzima en los resultados proteómicos.....	52
6.6 Discusión sobre el análisis proteómico de la fracción mitocondrial.....	53
6.6.1 El ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) se encontró regulado a la baja en las células CRL-12445 durante la fase exponencial.....	54
6.6.2 La cadena de transporte de electrones (CTE) se encontró regulada a la baja en las células de mayor productividad durante la fase exponencial.....	57
6.6.3 Enzimas de glucólisis se encontraron sobreexpresadas en la línea CRL-12445 durante la fase exponencial.....	59
6.6.4 Discusión sobre el metabolismo energético y sus implicaciones con la productividad de PR en las células CRL-12445.....	60
6.7 Relación NAD ⁺ /NADH celular y número de mitocondrias entre las líneas CRL-12444 y CRL-12445.....	62
6.7.1 Un estatus redox (NAD ⁺ /NADH) más reductor puede estar asociado con un aumento en la productividad de PR.....	62
6.7.2 El número de mitocondrias no estaría asociado con la diferencia de productividad específica entre ambas clonas.....	63
6.8 Discusión sobre el estado redox (NAD ⁺ /NADH) y la cuantificación de ADN mitocondrial.....	66
7 CONCLUSIONES.....	68
8 PERSPECTIVAS.....	69
9 ANEXOS.....	70
9.1 Anexo 1. Diagramas de Venn de los análisis de convergencia en las fracciones nuclear, microsomal y el citosol.....	70
9.2 Anexo 2. Mapas de calor de las proteínas totales expresadas diferencialmente e identificadas exclusivamente en la fracción mitocondrial.....	72
9.3 Anexo 3. Mapa de calor de las proteínas que convergieron entre las tres metodologías de imputación pertenecientes a la “fracción mitocondrial”.....	76
9.4 Anexo 4. Mapa de calor de las proteínas expresadas diferencialmente identificadas exclusivamente en la fracción mitocondrial (Bandas: B4 – B6) relacionadas con el metabolismo energético mitocondrial, glucólisis y biogénesis mitocondrial.....	78

9.5 Anexo 5. Geles SDS – PAGE y membranas completas de PVDF utilizados para el WB de las proteínas GRP78, Histona H3, ACO2, HIBADH y HSP60 para la validación de la proteómica.....	80
10 REFERENCIAS.....	84

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Diferencias entre el efecto Warburg y la ruta convencional de glucólisis.....	4
Fig. 2. Diferentes rutas de catabolismo de glutamina (Proceso de glutaminólisis).....	4
Fig. 3. Proceso de centrifugación diferencial para la obtención de los precipitados celulares por Pérez-Rodríguez et al., (2020b).....	9
Fig. 4. Caracterización de compartimentos subcelulares mediante TEM.....	9
Fig. 5. Enriquecimiento de organelos: núcleos, mitocondrias y microsomas en gradientes de sacarosa.....	10
Fig. 6. Composición subcelular de las bandas o fracciones (B1-B9) obtenidas por centrifugación diferencial e isopícnic de homogenizados de células CHO.....	10
Fig. 7. Proteínas expresadas al alza y a la baja relacionadas con el metabolismo energético mitocondrial en diferentes estudios proteómicos de la literatura.....	12
Fig. 8. Proteínas expresadas al alza y a la baja relacionadas con la biogénesis mitocondrial en diferentes estudios proteómicos de la literatura.....	17
Fig. 9. Diagrama de flujo comparando el procesamiento de datos proteómicos realizado por Pérez-Rodríguez et al., (2020b) (rojo) y el aplicado en esta tesis (azul cielo).....	24
Fig. 10. Cinéticas de crecimiento, conteo de viabilidad y medición de metabolitos.....	34
Fig. 11. Título de anticuerpo monoclonal anti IL-8. Se determinó la concentración (ng/mL) de anticuerpo anti-IL8 de las células CRL-12444 (gris) y CRL-12445 (negro) por el método de ELISA.....	35
Fig. 12. Toma de muestras para experimentos posteriores durante la cinética de crecimiento de las líneas CRL-12444 y CRL-12445.....	39
Fig. 13. Bandas o fracciones (B4 – B6) correspondientes al gradiente mitocondrial obtenidas por centrifugación diferencial e isopícnic de homogenizados de células CHO.....	40
Fig. 14. Diagramas de Venn (R Core Team, 2020) de la cantidad de proteínas diferenciales ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) que convergieron entre DEP y Normalyzer + DEP en la fracción mitocondrial (Bandas B4 – B6).....	40
Fig. 15. Análisis de ontología de las proteínas diferenciales ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) de la línea CRL-12445 respecto a la CRL-12444 mediante ShinyGO.....	42
Fig. 16. Análisis de ontología de las proteínas diferenciales ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) de la línea CRL-12445 respecto a la CRL-12444 mediante DAVID.....	42
Fig. 17. Localización subcelular de las proteínas identificadas en los estudios proteómicos de células CHO de Carlage et al., (2009) (A y B), Xu et al., (2019) (C) y el presente estudio (D).....	45
Fig. 18. Mapa de calor de las proteínas expresadas diferencialmente ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) relacionadas con el metabolismo energético mitocondrial identificadas en la fracción mitocondrial.....	46

Fig. 19. Proteínas diferenciales (FC ≥ 2, FDR ≤ 0.05) involucradas con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos.....	47
Fig. 20. Subunidades proteicas expresadas diferencialmente (FC ≥ 2, FDR ≤ 0.05) pertenecientes a los complejos de la cadena de transporte de electrones.....	48
Fig. 21. Proteínas diferenciales (FC ≥ 2, FDR ≤ 0.05) involucradas en la ruta de glucólisis..	49
Fig. 22. Análisis de convergencia de las proteínas diferenciales (FC ≥ 2, FDR ≤ 0.05) mediante tres métodos de imputación diferentes.....	50
Fig. 23. Comparación de inmunodetección de las proteínas ACO2 (82 – 85 kDa), HIBADH (35 kDa), Histona H3 (12 kDa), GRP78 (78 kDa) y HSP60 (60 kDa) para la validación del estudio proteómico.....	51
Fig. 24. Ensayos de actividad específica (µmol/min*mg proteína) de la enzima citrato sintasa durante las fases: exponencial y estacionaria.....	53
Fig. 25. Relación entre la cadena de transporte de electrones y el ciclo de Krebs.....	58
Fig. 26. Determinación de la relación NAD ⁺ /NADH (Pmol NAD ⁺ /Pmol NADH) durante las fases: exponencial y estacionaria.....	62
Fig. 27. Proteínas expresadas a la baja relacionadas con la biogénesis mitocondrial en las células CRL-12445 respecto a la línea CRL-12444.....	63
Fig. 28. Número de copias de ADN mitocondrial (mtADN) en las clonas CRL-12444 y CRL-12445 mediante dos genes mitocondriales (<i>mit</i> y <i>16smt</i>) y usando como referencia el gen <i>β2m</i> nuclear.....	64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracterizaciones cinéticas y metabólicas de células CHO en la literatura.....	7
Tabla 2. Componentes con su concentración en la solución madre, volumen y concentraciones finales requeridos para llevar a cabo la medición de actividad de la enzima citrato sintasa.....	27
Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos para la cuantificación relativa de ADNmt (mitocondrial) utilizadas en este proyecto.....	30
Tabla 4. Condiciones de amplificación por qPCR para el análisis de los genes <i>16smt</i> , <i>mit</i> y <i>β2m</i>	30
Tabla 5. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cinética de crecimiento de células CRL-12444 y CRL-12445.....	35
Tabla 6. Comparación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las células CRL-12444 y CRL-12445 obtenidos en este proyecto con los medidos por Pérez-Rodríguez et al., (2020b).....	36
Tabla 7. Comparación de las relaciones de qP de la línea CRL-12445 en contraste con la CRL-12444 determinadas en este proyecto y por Pérez-Rodríguez et al., (2020b).....	36
Tabla 8. Porcentajes de cobertura en el análisis proteómico de la fracción mitocondrial...	43
Tabla 9. Comparación de porcentajes de cobertura de estudios proteómicos de célula completa comparados con los obtenidos en este estudio y por Pérez-Rodríguez et al., (2020b).....	44
Tabla 10. Comparación de las veces de cambio entre la densitometría de bandas por ImageJ y el análisis proteómico.....	52
Tabla 11. Relación de ADN mitocondrial (mtADN) entre ambas clonas usando los genes <i>mit</i> y <i>16smt</i> durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria en ambos tipos celulares.....	65

LISTA DE ANEXOS

9 ANEXOS.....	70
9.1 Anexo 1. Diagramas de Venn de los análisis de convergencia en las fracciones nuclear, microsomal y el citosol.....	70
Anexo 1. Fig. 1. Diagramas de Venn de la cantidad de proteínas diferenciales que convergieron entre DEP y Normalyzer + DEP en la fracción nuclear (Bandas B1 – B3).....	70
Anexo 1. Fig. 2. Diagramas de Venn de la cantidad de proteínas diferenciales que convergieron entre DEP y Normalyzer + DEP en la fracción microsomal (B7 – B9).....	70
Anexo 1. Fig. 3. Diagramas de Venn de la cantidad de proteínas diferenciales que convergieron entre DEP y Normalyzer + DEP en el citosol.....	71
9.2 Anexo 2. Mapas de calor de las proteínas totales expresadas diferencialmente e identificadas exclusivamente en la fracción mitocondrial.....	72
Anexo 2. Fig. 1. Mapa de calor de las proteínas totales expresadas diferencialmente en la banda #4 de la fracción mitocondrial.....	72
Anexo 2. Fig. 2. Mapa de calor de las proteínas totales expresadas diferencialmente en la banda #5 de la fracción mitocondrial.....	73
Anexo 2. Fig. 3. Mapa de calor de las proteínas totales expresadas diferencialmente en la banda #6 de la fracción mitocondrial.....	75
9.3 Anexo 3. Mapa de calor de las proteínas que convergieron entre las tres metodologías de imputación pertenecientes a la “fracción mitocondrial”.....	76
Anexo 3. Fig. 1. Mapa de calor de las proteínas expresadas diferencialmente que convergieron en las tres metodologías de imputación consideradas como candidatas para la validación del análisis proteómico.....	76
9.4 Anexo 4. Mapa de calor de las proteínas expresadas diferencialmente identificadas exclusivamente en la fracción mitocondrial (Bandas: B4 – B6) relacionadas con el metabolismo energético mitocondrial, glucólisis y biogénesis mitocondrial.....	78
Anexo 4. Fig. 1. Mapa de calor de las proteínas expresadas diferencialmente en la fracción mitocondrial (Bandas B4 – B6), relacionadas con el metabolismo energético mitocondrial y biogénesis mitocondrial.....	78
9.5 Anexo 5. Geles SDS – PAGE y membranas completas de PVDF utilizados para el WB de las proteínas GRP78, Histona H3, ACO2, HIBADH y HSP60 para la validación de la proteómica.....	80
Anexo 5. Fig. 1. Detección de GRP78 (78 kDa) y la histona H3 (12 kDa) mediante Western Blot por triplicado biológico.....	80
Anexo 5. Fig. 2. Detección de ACO2 (82 – 85 kDa) mediante Western Blot por triplicado biológico.....	81

Anexo 5. Fig. 3. Detección de HIBADH (35 kDa) mediante Western Blot por triplicado biológico.....	82
Anexo 5. Fig. 4. Detección de HSP60 (60 kDa) mediante Western Blot por triplicado biológico.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

°C – grados Celsius

μ - velocidad específica de crecimiento

μg – microgramos

α -gal – galactosa-alfa-1,3-galactosa

μm – micrometros

μM – micromolar

Ac.CoA – acetil coenzima A

ADP – adenosina difosfato

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AMP – adenosina monofosfato

ARN – Ácido ribonucleico

ATCC – colección americana de cultivos tipo

ATP – adenosina trifosfato

CHO – Células de ovario de hámster chino

CK – Ciclo de Krebs

CTE – Cadena de transporte de electrones.

DEP – Differential Enrichment analysis of Proteomics

DHFR (-) – dihidrofolato reductasa deficiente

FDR – tasa de descubrimiento falso

FO – fosforilación oxidativa.

GFP – proteína verde fluorescente

GMP – guanosina monofosfato

GRAS – generally recognized as safe

GS (-) – deficiente en glutamina sintetasa

miRNA – micro ácidos ribonucleicos

IgG – inmunoglobulina G

GSH – glutatión

GTP – guanosina trifosfato

h – hora

HPLC – cromatografía líquida de alta resolución

HSP – chaperonas de choque térmico

CO₂ – dióxido de carbono

IL-8 – Interleucina 8

IVCD – integral de células viables

L – litros

LdhA – lactato deshidrogenasa

mAb – anticuerpo(s) monoclonal(es)

MCS – sistema de acarreadores mitocondrial

nmol – nanomol

mg – miligramos

min – minutos

mL – mililitros

mM – milimolar

MS – espectrometría de masas

MTP – Modificaciones postraduccionales

mtADN – ADN mitocondrial

NAD⁺/NADH – relación dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado/ dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido.

NADP⁺ – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

nanoHPLC MS/MS - nano cromatografía líquida de alta resolución acoplada a dos análisis de espectrometría de masas continuos.

Neu5Gc – ácido N-glicolilneuramínico

NeuAc – ácido siálico

Pg – pico gramo

pH – potencial de hidrógeno

Pmol – pico mol

PR – Proteína recombinante

qAla – producción de alanina

qAsp – consumo de asparagina

qP – Productividad específica

r.p.m – revoluciones por minuto

RE – retículo endoplásmico

ROS – especies reactivas de oxígeno

TCA – ácidos tricarbónicos

td – tiempo de duplicación

EGFR – factor de crecimiento epidermal

PYC – piruvato carboxilasa

TEM – microscopía electrónica de transmisión

WB – Western blot

x g – veces de la fuerza de gravedad

RESUMEN

Los medicamentos basados en proteínas recombinantes (PR) de uso terapéutico representan un mercado de miles de millones de dólares que posee una tendencia que se incrementa conforme pasa el tiempo. Las células de ovario de hámster chino (CHO) son fundamentales para la obtención de estos biofármacos por su capacidad de producir PR con niveles de calidad suficientes para su aplicación en humanos. Por lo anterior, se han visto sujetas a análisis profundos para descifrar los mecanismos metabólicos que estarían detrás de una mayor productividad específica (qP). Estos análisis han utilizado tecnologías “Ómicas” destacando la proteómica, que facilita la búsqueda de marcadores proteicos cruciales que pueden aumentar la producción de PR. La identificación y posterior incorporación de estos blancos proteicos mediante ingeniería genética ayudaría a generar células más productivas, impactando en el precio de muchos biofármacos.

Las rutas metabólicas cruciales para obtener más PR serían las relacionadas a la generación de energía o adenosina trifosfato (ATP), porque este proceso conlleva un gasto energético en la célula, por ende, si las células productoras poseen un metabolismo energético mejorado producirían mayor cantidad de producto. En la literatura, la identificación de marcadores proteicos relacionados con el metabolismo energético se ha llevado a cabo mediante metodologías proteómicas de homogenizados celulares y dadas sus limitaciones para estudiar organelos poco representados en la célula como las mitocondrias, se aplicó en esta tesis un enfoque de proteómica subcelular. Esto con el objetivo de incrementar la cobertura e identificación de marcadores relacionados con el metabolismo energético mitocondrial, que podrían ser actores principales en la promoción de un aumento de productividad específica (qP).

El enriquecimiento de organelos mediante centrifugación diferencial e isopícnica y su análisis mediante espectrometría de masas se llevó a cabo por Pérez-Rodríguez et al., (2020b) obteniendo una matriz de datos y su posterior análisis bioinformático. Los datos aquí analizados provienen de fracciones subcelulares de las líneas celulares CHO con dos niveles de productividad, CRL-12444 y CRL-12445 productoras de un anticuerpo monoclonal anti-interleucina 8 (IL-8) humana cultivadas en matraces agitados. La diferencia de qP del anticuerpo recombinante fue de aproximadamente 25 veces, siendo la clona CRL-12445 la de mayor productividad. En el análisis proteómico se identificaron 150 proteínas con una acumulación diferencial entre ambas líneas celulares en la fracción mitocondrial, de las cuales 17 se relacionaron con el ciclo de Krebs (CK) y de la cadena de transporte de electrones (CTE). Aunque se encontraron expresadas a la baja las proteínas relacionadas a estas rutas metabólicas en las células CRL-12445 durante la fase exponencial, se observó mayor acumulación de anticuerpo entre la fase exponencial y la estacionaria. Aunado a una reducción del estado redox (NAD^+/NADH) y un decremento de la cantidad de mitocondrias en la fase estacionaria. Esto indicaría que el CK y la CTE podrían activarse durante la fase estacionaria acompañando la producción del anticuerpo recombinante.

La cobertura del proteoma fue dos veces mayor al estudio de célula completa de la literatura con mayor cobertura, por lo que este enfoque de proteómica subcelular puede aplicarse para un análisis más profundo de compartimentos poco representados en células productoras de PR. La identificación de proteínas involucradas en el metabolismo energético asociadas a un aumento en la qP y su posterior sobreexpresión en células productoras de PR serviría para corroborar su efecto positivo sobre la qP.

SUMMARY

Medicines and drugs based on recombinant proteins (RP) for therapeutic use represent a market of billions of dollars that has a trend that increases over time. Chinese hamster ovary (CHO) cells are essential for obtaining these biopharmaceuticals due to their ability to produce RP with sufficient quality levels for their application in humans. Due to the above, they have been subjected to a deep analysis to decipher the metabolic mechanisms that would be behind a higher specific productivity (qP). These analyzes have used “Omics” technologies, highlighting proteomics, which facilitates the search for crucial protein markers that can increase RP production. The identification and subsequent incorporation of these protein targets through genetic engineering would help to generate more productive cells, impacting the price of many biopharmaceuticals.

The crucial metabolic routes to obtain more RP, would be those related to the generation of energy or adenosine triphosphate (ATP), because this process entails an energy expenditure in the cell, therefore, if the producing cells have an improved energy metabolism, they would produce a greater amount of product. In the literature, the identification of protein markers related to energy metabolism has been carried out using proteomic methodologies of cell homogenates and given its limitations to study organelles that are poorly represented in the cell such as mitochondria, a subcellular proteomic approach was applied in this thesis. With the aim of increasing the coverage and identification of markers related to mitochondrial energy metabolism, which could be main actors in promoting an increase in specific productivity (qP).

Organelle enrichment by differential and isopycnic centrifugation and its analysis by mass spectrometry was carried out by Pérez-Rodríguez et al., (2020b) obtaining a data matrix and its subsequent bioinformatic analysis. The data analyzed is from subcellular fractions of CHO cell lines with two levels of productivity, CRL-12444 and CRL-12445, producers of a human anti-interleukin 8 (IL-8) monoclonal antibody and cultured in shake flasks. The qP difference of the recombinant antibody was approximately 25-fold, with clone CRL-12445 being the one with the highest productivity. In the proteomic analysis, 150 proteins were identified with a differential accumulation between both cell lines in the mitochondrial fraction, of which 17 were related to Krebs cycle (KC) and electron transport chain (ETC). Although proteins related to these metabolic pathways were found to be down-expressed in CRL-12445 cells during the exponential phase, there was a greater antibody accumulation between exponential and stationary phases. Coupled with a reduction in redox state (NAD⁺/NADH) and a decrease in mitochondria number during stationary phase. This would indicate that KC and CTE could be activated during the stationary phase in order to produce more RP.

The proteome coverage was twice larger than the literature's whole-cell study with the highest coverage, so this subcellular proteomics approach can be applied for deeper analysis of underrepresented compartments in PR-producing cells. The identification of proteins involved in energy metabolism associated with an increase in qP and its subsequent overexpression in PR-producing cells would serve to corroborate its positive effect on qP.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Impacto e importancia de las células CHO en el ámbito biotecnológico y farmacéutico.

La producción de PR para uso terapéutico representa un gran impacto en la industria biotecnológica. El mercado de biofármacos basados en PR se ha mantenido en aumento en los últimos años hasta la actualidad debido al desarrollo continuo de nuevos fármacos bioterapéuticos. Para ilustrar este crecimiento, en 2010 las ventas totales biofármacos alcanzaron un valor de más de 138 mil millones de dólares (Altamirano et al., 2013; Walsh et al., 2014; Dhiman et al., 2020; Shang et al., 2021). En 2010, 2011 y 2012 el mercado de PR terapéuticas presentó valores acumulativos de venta que exponen una ganancia de \$107, \$114 y \$125 mil millones de dólares respectivamente. Por otra parte, de 2014 a 2017 el valor del mercado alcanzó un total de \$651 mil millones de dólares y, solo en 2017 fueron \$188 mil millones de dólares, lo que refleja un aumento de 34.3% comparado con 2013 (Walsh et al., 2018; Dhiman et al., 2020; Shang et al., 2021). Entre 2014 y 2018 el uso de células de mamífero aumentó en comparación con los sistemas no mamíferos para la producción de biofármacos aprobados, incluso se observó mayor aumento, en contraste con el cuatrienio evaluado de 2010 a 2014 ya que la proporción de 60 y 40% pasó a 79 y 21% para mamíferos y no mamíferos, respectivamente (Walsh, 2014; Pereira et al., 2018; Walsh, 2018;; Shang et al., 2021). Otro dato importante que muestra esta tendencia es que, durante el periodo de 2010 a 2014, de las 62 PR aprobadas y catalogadas como nuevos ingredientes activos biofarmacéuticos, 84% fueron generadas a partir de líneas celulares de mamífero mientras que el 8% y el 6.5% se produjeron en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente. (Walsh et al., 2014; Pereira et al., 2018).

Este incremento también se refleja debido a las modificaciones postraduccionales requeridas por estos productos biológicos para su funcionalidad, en particular, por su estado de glicosilación (Walsh et al., 2014; Lalonde y Durocher, 2017; Pereira et al., 2018; Walsh et al., 2018) y la vida media de las PR (Pereira et al., 2018; Lalonde y Durocher, 2018). Por lo anterior, las células de mamífero se definen como el sistema de expresión principal para la producción comercial de productos terapéuticos aplicados en humanos (Durocher y Butler, 2009; Altamirano et al., 2013; Walsh et al., 2014). Entre los sistemas de expresión basados en mamíferos, las células de ovario de hámster chino (CHO) son la línea celular más comúnmente utilizada. Debido a que su producción es de más del 70% de las PR, la mayoría de las cuales son anticuerpos (Ab) (Durocher y Butler, 2009; Altamirano et al., 2013; Walsh et al., 2014; Lalonde y Durocher, 2017).

1.2 Ventajas de las células CHO como sistema de expresión de PR.

El uso de la línea celular CHO para la producción de PR se incrementa por sus diversas ventajas comparada con los otros sistemas de expresión. Las células CHO al ser cultivadas en medios químicamente definidos y libres de suero reducen las posibilidades de variación de lote a lote en los componentes o PR producidos (Hata et al., 1992; Gorfien et al., 1998; Chu y Robinson, 2001; Pereira et al., 2018). Su formato de cultivo en suspensión favorece procesos de escalamiento industriales para producir a gran escala PR y satisfacer la demanda de los mercados objetivo (Kim et al., 2012; Lai et al., 2013; Lalonde y Durocher, 2017).

Las células CHO son huéspedes seguros (GRAS: “generally recognized as safe” por sus siglas en inglés), han demostrado no ser patógenos y dañinos para los usuarios, teniendo más probabilidades de obtener la aprobación de nuevas proteínas terapéuticas por parte de las agencias reguladoras en contraste con otros sistemas de expresión para la producción de PR’s (Durocher y Butler, 2009; Altamirano et al., 2013; Walsh et al., 2014, Lalonde y Durocher, 2017). Siendo refractarias a la infección por virus humanos minimizan los riesgos de bioseguridad con fines de producción comercial (Berting et al., 2010; Valdez-Cruz et al., 2021). Esta susceptibilidad disminuida podría atribuirse a que muchos genes de entrada viral no se expresan en células CHO (Pereira et al., 2018; Lalonde y Durocher, 2018). También son capaces producir PR con glicanos similares a los producidas por células humanas siendo los productos generados compatibles y bioactivos en los huéspedes humanos (Durocher y Butler, 2009; Kim et al., 2012; Lai et al., 2013).

La glicosilación correcta, es un atributo de calidad crítica porque promueve la estabilidad y la vida media además de contribuir a la disminución en la inmunogenicidad (Pereira et al., 2018; Lalonde y Durocher, 2018). Si la PR posee un patrón de glicosilación aberrante disminuirá la eficacia (Nikita et al., 2005), afectará la farmacocinética (Wurm et al., 2004) y alterará sus propiedades biológicas (Pereira et al., 2018; Lalonde y Durocher, 2018). Como las células CHO, las líneas celulares murinas tienen la capacidad de generar galactosa- α -1,3-galactosa (α -gal) y ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), carbohidratos que no son sintetizados en humanos. Sin embargo, las células murinas los producen en niveles considerablemente más altos que las células de hámster aumentando los riesgos de inmunogenicidad (Altamirano et al., 2013; Dumont et al., 2015; Lalonde y Durocher, 2017; Pereira et al., 2018).

En contraste con sistemas de expresión bacteriano que, aun haciendo procesos de glicosilación, están limitados solo a la expresión de proteínas sin modificaciones postraduccionales (MTP) complejas (Ghaderi et al., 2012; Dumont et al., 2015; Lalonde y Durocher, 2017; Pereira et al., 2018). Las glicoproteínas producidas en eucariontes sufren una remodelación compleja en el aparato de Golgi al importarse del RE generando mezclas de diversas glicofomas ricas en azúcares funcionalmente importantes como fucosa y ácido siálico. Los organismos procariontes carecen del aparato de Golgi para generar glicofomas complejas, por lo tanto, se usan en mayor medida las células CHO (Dell et al., 2010). Las levaduras a pesar de tener una rápida velocidad de división y mayores rendimientos de productividad, tienden a producir proteínas con manosa alta, que pueden ser inmunogénicas (Dumont et al., 2015). Las células de plantas e insectos producen PR con glicanos complejos que no se encuentran en humanos. Las plantas generan glicanos como la α -1,3-fructosa y la β -1,2-xilosa que podrían ser inmunogénicos (Dumont et al., 2015; Lalonde y Durocher, 2017). Las células de insecto producen precursores de N-glicanos que se recortan, creando estructuras con alto contenido de manosa o paucimansa que también pueden ser inmunogénicos (Dumont et al., 2015; Lalonde y Durocher, 2017). Las células de insecto también producen proteínas que carecen de residuos de ácido siálico en sus glicanos (Ghaderi et al., 2012; Dumont et al., 2015; Lalonde y Durocher, 2017) lo que provoca la eliminación de las PR por parte del hígado afectando sus propiedades terapéuticas.

1.3 Generalidades fisiológicas y metabólicas de las células CHO.

Las células CHO se denominan de tipo fibroblasto (Gamper et al., 2005). El doctor Theodore T. Puck y sus colegas en 1958 iniciaron la línea CHO a partir de una biopsia de tejido ovárico de un hámster chino adulto (Puck et al., 1958; Gamper et al., 2005; Wurm, 2013). El cultivo

celular resultante parecía ser predominantemente de tipo fibroblasto con un cariotipo casi diploide, el 1% de la población celular difería en el número de cromosomas en ± 1 del número de cromosomas esperado de 22 (11 pares) (Wurm, 2013; Puck et al., 1958). Las células animales presentan requerimientos nutricionales complejos, crecen lentamente en intervalos estrechos de potencial de hidrógeno (pH), temperatura y osmolaridad en contraste de eucariontes inferiores (hongos, levaduras) y bacterias. Estos factores generan menores concentraciones de células afectando la productividad volumétrica de los cultivos en contraste con las obtenidas en bacterias y levaduras (Palomares et al., 2007). Las células CHO poseen patrones metabólicos definidos, distinguiéndose por un alto consumo de glucosa (qGlc) y glutamina (qGln), resultando un rápido agotamiento en el medio y acumulación de amonio y lactato (Lao y Toth, 1997; Wagner, 1997; Altamirano et al., 2013; Altamirano et al., 2006). Ambos metabolitos de desecho contribuyen a la limitación del crecimiento celular, el desencadenamiento de procesos apoptóticos y la pérdida de calidad de la PR (Schneider, 1996; Wagner, 1997; Altamirano et al., 2013; Altamirano et al., 2006).

2 ANTECEDENTES

2.1 Particularidades metabólicas de las células CHO.

La glucólisis y la glutaminólisis exacerbadas son fenómenos metabólicos que también se presentan en las células cancerosas (Lao y Toth, 1997; Wagner, 1997; Altamirano et al., 2013; Altamirano et al., 2006). El alto flujo glucolítico de las células CHO se asocia al Efecto Warburg, donde el piruvato generado por la glucólisis se usa para la fermentación a lactato en lugar de proseguir por el ciclo de Krebs (CK) y la fosforilación oxidativa (FO). La alteración metabólica mantiene altos niveles de glucólisis incluso bajo condiciones de oxigenación suficiente, evitando el efecto Pasteur o también denominado como "fermentación aeróbica" (Kunji y Lytovchenko, 2017; Bender y Martinou, 2016; Locasale y Cantley, 2011). Este comportamiento metabólico celular representa un "hallmark" o sello característico en las células CHO y los cánceres (Wagner, 1997; Vander et al., 2009; Hanahan y Weinberg, 2011). En la Figura 1, se muestra la diferencia entre el efecto Warburg y la ruta normalmente usada para catabolizar la glucosa y otros azúcares.

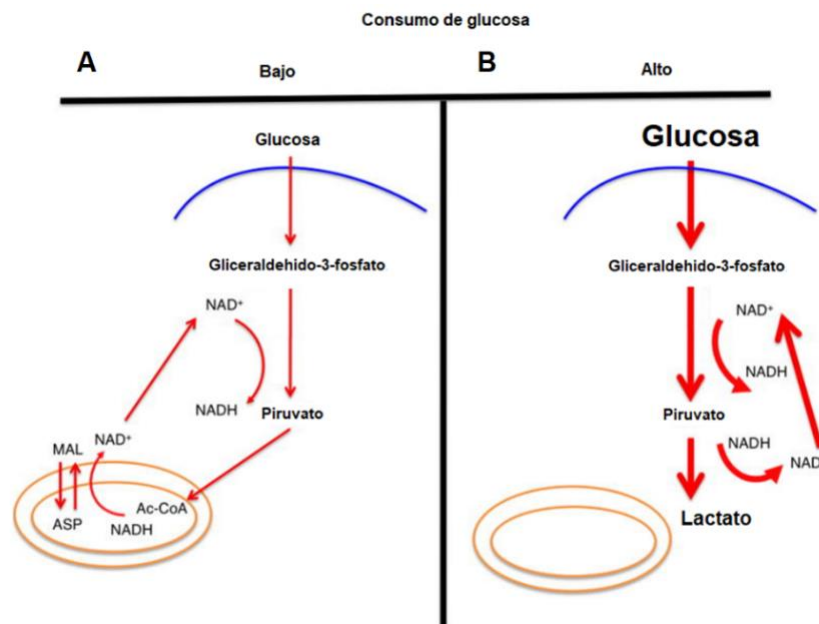


Fig. 1. Diferencias entre el efecto Warburg y la ruta convencional de glucólisis.

A) Ruta de glucólisis presentada en células normales donde la glucosa se convierte en piruvato y entra a la mitocondria para formar acetil coenzima A (Ac.CoA) sustrato del ciclo de Krebs cuya función principal es la generación de poder reductor. Dicho poder reductor se usa en la fosforilación oxidativa para producir el gradiente protón motriz responsable de la generación de ATP. Posteriormente, el NAD⁺ se recicla hacia el citosol mediante las lanzaderas de aspartato-malato. B) Muestra el efecto Warburg donde existe un flujo de glucosa incrementado en comparación de la glucólisis normal. El piruvato, en lugar de generar Ac.CoA, se reduce a lactato convirtiendo el NADH en NAD⁺. Dicho NAD⁺ se recicla para promover el flujo glucolítico exacerbado (Tomado de Locasale y Cantley, 2011). Mal: Malato; Asp: Aspartato; NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado; NADH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.

El efecto Warburg aumenta la síntesis de nucleótidos proveyendo sustratos necesarios para la vía de las pentosas y para la síntesis de algunos aminoácidos (Kunji y Lytovchenko, 2017; Bender y Martinou, 2016; Locasale y Cantley, 2011). Las células CHO y las cancerosas comparten el exceso de glutaminólisis considerada otro “hallmark” por la dependencia exacerbada a la glutamina, que repone el conjunto de metabolitos del ciclo de Krebs para usarse otros fines, como la biosíntesis de aminoácidos o lípidos (Wagner, 1997; Kunji y Lytovchenko, 2017; Bender y Martinou, 2016; Locasale y Cantley, 2011). En la Figura 2, se muestran los posibles destinos de la glutamina y como ayuda a reestablecer el ciclo de Krebs en células CHO y cancerosas.

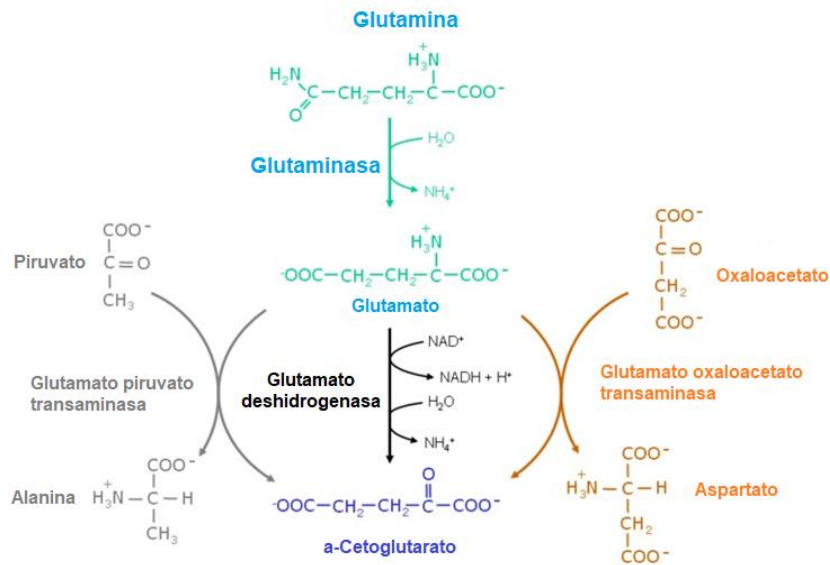


Fig. 2. Diferentes rutas de catabolismo de glutamina (Proceso de glutaminólisis) (Tomado de Metabolomic-database, 2011). La primera reacción es la desaminación de la glutamina por la glutaminasa. Donde se libera amonio y se convierte en glutamato que tiene tres posibles destinos: a) Puede usarse para realizar la reacción de transaminación de piruvato a alanina. b) Convertirse en α -cetoglutarato mediante desaminación oxidativa liberando otro ion amonio. c) Emplearse para llevar a cabo la reacción de transaminación de oxaloacetato a aspartato. En las tres reacciones expuestas, se forma α -cetoglutarato que es uno de los principales metabolitos del ciclo de Krebs y que ayuda a mantenerlo activo para sintetizar compuestos en lugar de generar energía (Metabolic-database, 2011; Goetzman y Prochownik, 2018).

La consecuencia de este metabolismo característico es la mayor generación de metabolitos indeseables (lactato y amonio) que producen efectos dañinos en el cultivo (Lao y Toth, 1997; Wagner, 1997; Altamirano et al., 2013; Altamirano et al., 2006; Pereira et al., 2018). Se ha documentado que los nutrientes y las fuentes de carbono no son usadas eficientemente para producir biomasa o PR ya que del 35% al 70% se desvía a la formación de estos productos (Altamirano et al., 2013; Altamirano et al., 2006). El lactato acidifica el pH del medio inhibiendo el crecimiento celular, induce la apoptosis y reduce los rendimientos de las PR producidas (Wagner, R. 1997; Altamirano et al., 2013; Altamirano et al., 2006). Valores inferiores a 20 mM de lactato no tienen un impacto significativo en el crecimiento celular ni la productividad. Mientras que en un intervalo de 20-40 mM se afecta

la productividad y a más de 40 mM se inhibe el crecimiento celular (Wagner, R. 1997; Altamirano et al., 2013; Altamirano et al., 2006). En el cultivo de células CHO, los aminoácidos se suministran en el medio y/o se producen a través de vías biosintéticas. El amonio producto de la glutaminólisis exacerbada, afecta los atributos de calidad del producto cuando se acumula incluyendo la productividad volumétrica y el crecimiento celular (Pereira et al., 2018; Ozturk et al., 1992; Schneider, 1996; Gawlitzek et al., 2000; Yang y Butler, 2002; Fan et al., 2014). El ion amonio es perjudicial en el cultivo celular pues entre 2 y 5 mM pueden inhibir el crecimiento y afectar la productividad (Schneider et al., 1996). Además, afecta adversamente la glicosilación causando una disminución del ácido siálico (NeuAc) y galactosa (Gawlitzek et al. 2000; Yang y Butler, 2002; Altamirano et al., 2013). Aunque el amonio y el lactato son los principales productos de desecho que afectan el cultivo de las células CHO, hay otros metabolitos que también tienen efectos negativos como el ADP (adenosina difosfato) y el AMP (adenosina monofosfato). Las concentraciones extracelulares de AMP alrededor de 2 mM se vuelven citotóxicas, mientras que tanto AMP como GMP (guanosina monofosfato) se han correlacionado con eventos apoptóticos tempranos en células CHO (Carvalho et al., 2003; Chong et al., 2011; Pereira et al., 2018). Los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA por sus siglas en inglés) (citrato, succinato, fumarato y malato) se acumulan durante las fases de cultivo relacionándose con la limitación del crecimiento. Algunos aminoácidos se catabolizan y conducen a la formación de intermediarios tóxicos. La serina y treonina se desaminan directamente (Pereira et al., 2018).

El consumo de asparagina (qAsp) afecta negativamente el crecimiento celular, la producción de alanina (qAla) inhibe el ciclo de TCA representando una fuente de amonio (Pereira et al., 2018; Sellick et al., 2011; Reinhart et al., 2015; Yang et al. 2014). El catabolismo de fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, serina, treonina y glicina forman nueve compuestos intermediarios que inhiben el crecimiento celular (Mulukulta et al., 2017; Pereira et al., 2018). El propósito es disminuir la producción de estos productos metabólicos indeseables con el fin de aumentar la productividad de las PR en células CHO.

2.2 Implicación del metabolismo energético mitocondrial en la productividad de PR en estudios “Ómicos” de células CHO.

Las células CHO son por excelencia las productoras de PR de alto valor agregado a pesar de sus desventajas metabólicas. Diversas técnicas se han empleado para mejorar su productividad: Implementación de sistemas de expresión y selección como la generación de clones deficientes en la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR^{-/-}) (Urlaub et al., 1980; Urlaub et al., 1983) y carentes de la enzima glutamina sintetasa (GS⁻) (Cockett et al., 1990). La sobreexpresión de los genes de la proteína de interés mediante promotores virales fuertes (Wurm et al., 2004). La inserción y expresión al alza de genes que codifican proteínas involucradas en diferentes rutas metabólicas celulares como la síntesis de proteínas (Hwang et al., 2003; Kwon et al., 2006; Pybus et al., 2013; Orellana et al., 2017), secreción de PR (Tigges y Fussenegger, 2006; Ku et al., 2007; Le Fourn et al., 2014; Peng et al., 2010), regulación del ciclo celular (Bi et al., 2004; Kuystermans et al., 2009; Dreesen y Fussenegger, 2011), regulación a la baja de marcadores relacionados a la promoción de la apoptosis (Cost et al., 2010; Sung et al., 2007), el incremento en la expresión de proteínas anti apoptóticas (Chiang et al., 2005; Wong et al., 2006; Majors et al., 2009; Lee et al., 2013) y regulación al alza y a la baja de enzimas involucradas en el metabolismo central de carbono (Fogolin et al., 2004; Zhou et al., 2011; Gupta et al., 2017; Bulté et al., 2020). También se ha encontrado que la modificación genética de algunos micro ácidos

ribonucleicos (miRNAs por sus siglas en inglés) puede contribuir al aumento de la productividad en las células CHO (Sánchez et al., 2013; Fischer et al., 2015; Loh et al., 2014; Loh et al., 2017; Jadhav et al., 2014; Kelly et al., 2015). Además de estas modificaciones intrínsecas existen mecanismos extrínsecos como suplementos y modificaciones de medio de cultivo y baja de la temperatura para ralentizar el crecimiento y aumentar la viabilidad celular (Baik et al., 2006; Baik et al., 2008; Kantardjieff et al., 2010; Kim et al., 2011; Bedoya et al., 2016; Xu et al., 2018). Actualmente, un compilado de herramientas denominadas “Ómicas” se está aplicando para descifrar el porqué de los fenotipos altamente productores en estas células, ya que se han llevado a cabo diversos estudios tanto genómicos, como transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos.

La identificación de marcadores o rutas metabólicas mediante estas técnicas y su posterior modificación por ingeniería genética generaría nuevas líneas celulares con mayores niveles de qP que las actuales (Nissom et al., 2006; Doolan 2008, Xu et al., 2011; Fomina-Yadlin et al., 2015; Jamnikar et al., 2015; Yusufi et al., 2017; Lakshmanan et al., 2019; Lee et al., 2021). En especial, los estudios proteómicos han permitido identificar proteínas claves para incrementar la productividad en diversas líneas celulares.

En estudios proteómicos de células CHO cultivadas a nivel industrial productoras de una misma PR y con diferentes qP se han identificado proteínas sobreexpresadas relacionadas con el metabolismo energético mitocondrial involucradas directamente con ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones (Van et al., 2003; Nissom et al., 2006; Pascoe et al., 2004; Ho, 2013; Sommereger et al., 2016; Liu et al., 2015; Xu et al., 2019). Estos hallazgos sugerirían que las células de mayor producción de PR poseen un metabolismo energético más eficiente ya que es un proceso altamente costoso para la célula. Por ejemplo, Dhami et al., (2018) expusieron que se requerirían aproximadamente 1.36×10^{12} moléculas de ATP o 2.3 pmol ATP/célula/día o 0.1 pmol ATP/célula/h para producir una inmunoglobulina G (IgG) hipotética compuesta de dos cadenas pesadas con 451 aminoácidos y dos cadenas ligeras de 213 aminoácidos en una línea celular industrial CHO con una productividad específica entre los 20-40 pg/célula/día (Seth et al., 2006; Li et al., 2010; Dhami et al., 2018). Dada la cantidad importante de ATP extra requerido para la producción de la proteína de interés se hipotetiza que las células CHO requieren de un funcionamiento eficiente del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa (Vander-Heiden et al., 2009; Young, 2013; Altamirano et al., 2013; Dhami et al., 2018). Con base en lo anterior, en el presente estudio se buscó identificar marcadores proteicos diferenciales relacionados al metabolismo energético entre dos clonas CHO, denominadas como CRL-12444 y CRL-12445, con diferentes niveles de productividad específica de un anticuerpo humanizado recombinante anti-interleucina-8 humana. Cabe destacar que los estudios proteómicos de células CHO comparando clonas de diferente qP utilizaron homogenados de células completas (Nissom et al., 2006; Meleady et al., 2008; Carlage et al., 2009; Ho, 2013; Kang et al., 2014; Orellana et al., 2015; Sommereger et al., 2016; Hausmann et al., 2018) generando que proteínas de organelos como el núcleo que posee alrededor del 50% de proteínas de la célula (Pérez-Rodríguez et al., 2020b) se detecten con mayor facilidad en contraste con las pertenecientes a mitocondrias u otros organelos como retículo endoplásmico, complejo de Golgi, entre otros. Debido a la poca cobertura que arrojan los estudios proteómicos de célula completa, Pérez-Rodríguez et al., (2020b) enriquecieron organelos específicos en ambas clonas, mediante centrifugación diferencial e isopícnicica por gradiente de sacarosa, con la finalidad de aumentar la resolución del estudio proteómico y estudiar las proteínas involucradas en la vía de secreción clásica.

Al encontrarse el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa en la matriz de las mitocondrias y que las proteínas de estos organelos representan alrededor del 5% del total (Pérez-Rodríguez et al., 2020b), se llevó a cabo el análisis bioinformático de los datos proteómicos de la denominada “fracción mitocondrial” obtenida por Pérez-Rodríguez et al., (2020b). En este estudio, se realizó un análisis bioinformático con algoritmos distintos a los usados por Pérez-Rodríguez et al., (2020b), pues se adaptan mejor a la matriz de datos obtenidos.

2.3 Caracterización cinética y metabólica de células CHO productoras de PR.

Las líneas celulares CHO DP-12 clone#1933 y CHO DP-12 clone#1934 denominadas CRL-12444 y CRL-12445, respectivamente, ambas derivadas de la línea celular CHO DP-12 (colección americana de cultivos tipo: ATCC, 2021) producen un anticuerpo humanizado anti-IL8. El anticuerpo generado por estas líneas celulares es capaz de interferir con la unión de la IL-8 a los neutrófilos humanos, impidiendo la quimiotaxis.

La productividad volumétrica de anticuerpo de la línea CRL-12444 es menor que la de las células CRL-12445 (150 mg/L y 250 mg/L, respectivamente), en cultivos adherentes, (ATCC, 2021).

Dado que los parámetros fisicoquímicos, el medio y el formato de cultivo afectan el crecimiento celular y la productividad, para realizar el estudio proteómico, se caracterizaron cinética y estequiométricamente ambas líneas celulares para poder hacer un estudio comparativo (Pérez-Rodríguez et al., 2020b).

Se ha reportado que los parámetros cinéticos de las células CRL-12445 como la velocidad específica de crecimiento (μ), varían en un intervalo de 0.015-0.044 h^{-1} mientras que la densidad celular máxima de 6 – 15.0 x 10⁶ células/mL (Beckmann et al., 2011; Klausning et al., 2011; Heinrich et al., 2011; Wipperman et al., 2014; Wipperman et al., 2015; Coleman et al., 2019; Capella et al., 2019; Strasser et al., 2021). El rango de productividad específica comprende de 3.6 – 7.5 pg/célula*día y sus títulos varían entre 1 – 325 mg/L (Beckmann et al., 2011; Klausning et al., 2011; Heinrich et al., 2011; Wipperman et al., 2014; Wipperman et al., 2015; Coleman et al., 2019; Capella et al., 2019; Strasser et al., 2021). Por otra parte, además del estudio realizado por Pérez-Rodríguez et al., (2020b), no se han caracterizado metabólicamente las células CRL-12445 ni las CRL-12444 (Wilkens y Gerdtzen, 2015).

En la tabla 1, se exponen estudios con caracterizaciones cinéticas y metabólicas en células CHO.

Tabla 1. Caracterizaciones cinéticas y metabólicas de células CHO en la literatura.

Tipo de Cultivo	Tipo celular	μ	t_d	\bar{X}_{max}	q_{Glc}	q_{Glu}	q_{NH4+}	Referencia
En lote (Matraces Erlenmeyer)	CHO K1	0.018 – 0.028	24.75 – 38.51	4.5 – 5.8	1.2 – 3.8	0.02 – 0.1	0.4 – 1.1	Burleigh et al., 2011
En lote (Matraces Erlenmeyer)	CHO AMW productora de un anticuerpo anti IgG	0.037 – 0.039	17.77 – 18.73	2.9 – 5.1	9.6	N/A	2.4	Mosser et al., 2013
Biorreactor	CHO AMW productora de un anticuerpo anti IgG	0.024 – 0.029	23.9 – 28.88	1.5 – 2.5	7.2	N/A	2.4	Mosser et al., 2013
En lote (Matraces Erlenmeyer)	CHO-DUBXB11 – DHFR (-) + PYC	0.033	21.01	9 – 10	1.0 – 1.65	N/A	0.57 – 1.31	Toussaint et al., 2016
	CHO-DUBXB11 – DHFR (-)	0.023	30.14	3 – 5				
Biorreactor	CHO-DUBXB11 – DHFR (-) + PYC	0.023	30.14	13	2.46 – 2.49	N/A	0.41 – 0.94	Toussaint et al., 2016
	CHO-DUBXB11 – DHFR (-)	0.024	28.88	4 – 5				

Parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos de las caracterizaciones, en este caso, μ : velocidad de crecimiento en h^{-1} , t_d : tiempo de duplicación en h, X_{Max} : Concentración celular máxima en 10⁶ células/mL, q_{Glc} : consumo de glucosa en (μ mol)/(10⁶ células*día), q_{Glu} : producción de glutamato en (μ mol)/(10⁶ células*día) y q_{NH4+} : producción de amonio en (μ mol)/(10⁶ células*día). N/A: no hay datos disponibles.

Las células caracterizadas son sublíneas CHO y, aunque se cultivaron en condiciones y formatos distintos (Tabla 1), sus parámetros cinéticos y metabólicos son parecidos.

2.4 Importancia y ventajas de los estudios proteómicos subcelulares.

La información proteómica obtenida a partir del análisis de células o tejidos completos puede limitarse a estudiar proteínas de mayor abundancia (Brunet, 2003; Jung et al., 2000; Huber, 2003; Plösch et al., 2009; Christopher et al., 2021). Dada la variación de varios órdenes de magnitud entre proteínas dentro de la célula, las de baja abundancia o provenientes de organelos poco representados pueden ser omitidas en su detección debido a que son enmascaradas por las de mayor expresión (Brunet, 2003; Patterson y Aebersold, 2003; Plösch et al., 2009; Christopher et al., 2021). Estas proteínas poco representadas pueden ser partícipes en diversos procesos biológicos como regulación de la expresión, metabolismo catalítico y, en algunos casos, transducción de señales (Liu et al., 2021).

Otro factor decisivo en el estudio de las células de mamífero es la compartimentalización ya que permite independencia y armonía en los procesos metabólicos (Alberts et al., 2013, Christopher et al., 2021). Debido a este seccionamiento intracelular, las proteínas también se encuentran divididas en grupos específicos que se conforman para hacer funcionar cada organelo (Hung y Link, 2011; Alberts et al., 2013). Sin embargo, poseen movimiento dinámico entre compartimentos (Hung y Link, 2011; Alberts et al., 2013; Christopher et al., 2021).

El estudio eficaz de proteínas poco abundantes o de un organelo específico requiere técnicas para enriquecerlas o concentrarlas. Para esto, existen metodologías basadas en centrifugación diferencial e isopícnica acoplada a gradientes de alguna matriz inerte (Plösch et al., 2009). El lisado celular se vierte en la parte superior del gradiente y, durante la centrifugación, los organelos migran a través de la matriz a una velocidad que depende de su coeficiente de sedimentación. Los componentes de la muestra forman bandas donde su densidad es igual a la de la solución del gradiente (Voet et al., 2008; Alberts et al., 2013; Wang et al., 2018). Posteriormente, las fracciones enriquecidas de organelos se analizan mediante espectrometría de masas obteniendo un proteoma subcelular (Voet et al., 2008; Alberts et al., 2013; Christopher et al., 2021). En algunos casos se emplea un paso previo de centrifugación diferencial además de matrices de separación diferentes como la sacarosa, Nycodenz, Iodixanol, Percoll, entre otros, para aumentar el grado de resolución. (Boucknak et al., 2019; Chapel et al., 2013; Dengiel et al., 2012; Pagliarini et al., 2008; Andersen et al., 2003; Wiese et al., 2007; Tang et al., 2020; Kraemer et al., 2013; Pérez-Rodríguez et al., 2020b). El análisis proteómico obtenido mediante fracciones enriquecidas de organelos logra una sensibilidad y cobertura superiores que las de célula completa. A pesar de esta ventaja, las fracciones enriquecidas poseerán de manera inevitable proteínas provenientes de otros compartimentos (Plösch et al., 2009; Christopher et al., 2021).

2.5 Fraccionamiento y obtención de los datos proteómicos analizados en este estudio.

Para las líneas CHO CRL-12445 y CRL-12444, productoras del anticuerpo monoclonal anti-IL8, Pérez-Rodríguez et al., (2020b) desarrollaron un protocolo de fraccionamiento previo a su análisis proteómico. Este consistió en una combinación de centrifugación diferencial y por gradiente de sacarosa. Se recolectaron células de ambas líneas durante la fase de crecimiento exponencial (72 h) de dos réplicas biológicas, provenientes cada una de un grupo de nueve matraces Erlenmeyer. Pérez-Rodríguez et al., (2020b) obtuvieron tres precipitados subcelulares y un sobrenadante a partir de la centrifugación diferencial. La Figura 3, muestra de manera gráfica el proceso de centrifugación y los precipitados resultantes.

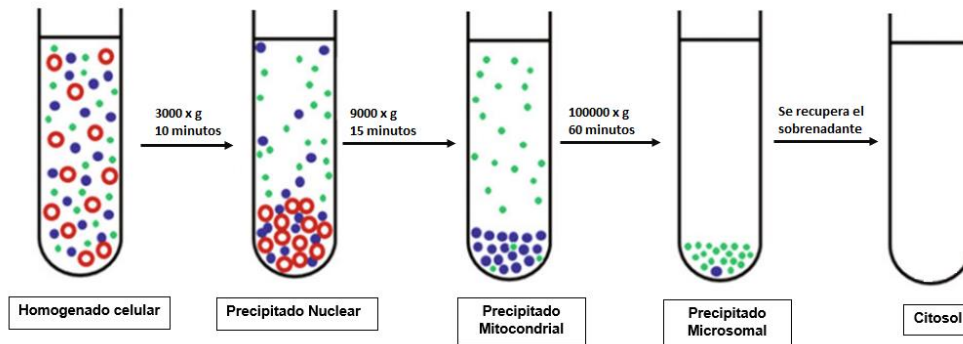


Fig. 3. Proceso de centrifugación diferencial para la obtención de los precipitados celulares por Pérez-Rodríguez et al., (2020b). Se realizaron tres procesos de centrifugación a 4°C. Se llevó a cabo un primer proceso de centrifugación a 3000 x g (fuerzas g o veces de la fuerza de gravedad) durante 10 minutos (min) y se rescató el sobrenadante, que se sometió a un segundo proceso de centrifugación a 9000 x g durante 15 min, por último, el sobrenadante se sometió a un tercer proceso de centrifugación a 100 000 x g durante 1 h. Los pellets de cada proceso se denominaron nuclear, mitocondrial y microsomal, respectivamente. El sobrenadante de la última centrifugación se denominó "citosol".

Pérez-Rodríguez et al., (2020b) corroboraron el enriquecimiento de organelos de cada precipitado subcelular mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) y Western blot (WB). Determinaron que el precipitado nuclear estaba enriquecido con núcleos (A y D), con mitocondrias en el caso del precipitado mitocondrial (B y E) y con probables vesículas correspondientes al aparato de Golgi y retículo endoplásmico (RE) en el precipitado microsomal (C y F). Las imágenes obtenidas mediante TEM se muestran en la Figura 4.

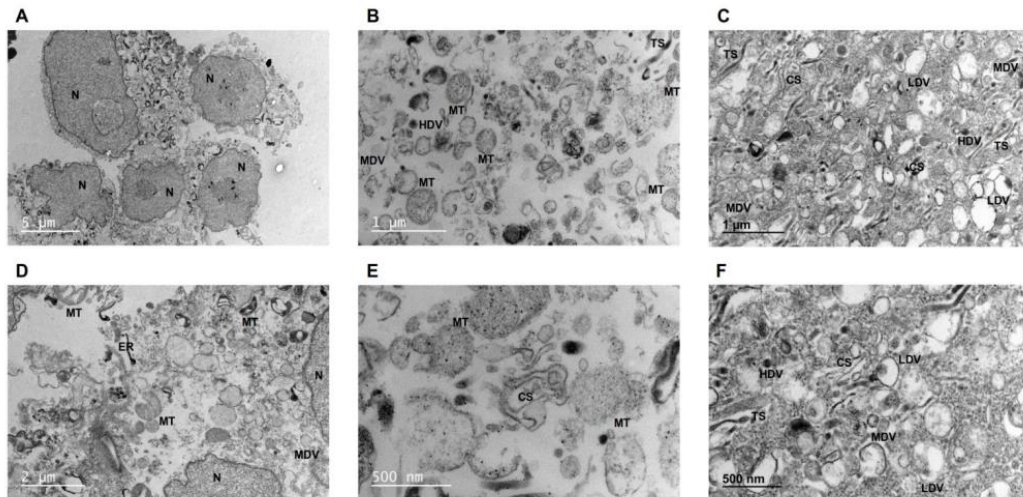


Fig. 4. Caracterización de compartimentos subcelulares mediante TEM. De acuerdo con su morfología, las estructuras observadas en los precipitados nuclear (A, D), mitocondrial (B, E) y microsomal (C, F) se clasificaron como núcleo (N), mitocondria (MT), estructura tubular (TS), cisterna (Cs), retículo endoplásmico (RE) y vesículas de baja (LDV), media (MDV) y alta densidad electrónica (HDV). (Tomado de Pérez-Rodríguez et al., 2020b).

Posteriormente, se llevó a cabo el segundo método de separación y enriquecimiento de organelos donde cada precipitado subcelular fue resuspendido y puesto en un gradiente isopícnico, de los cuales Pérez-Rodríguez et al., (2020b) obtuvieron tres bandas bien definidas como se muestra en la Figura 5.

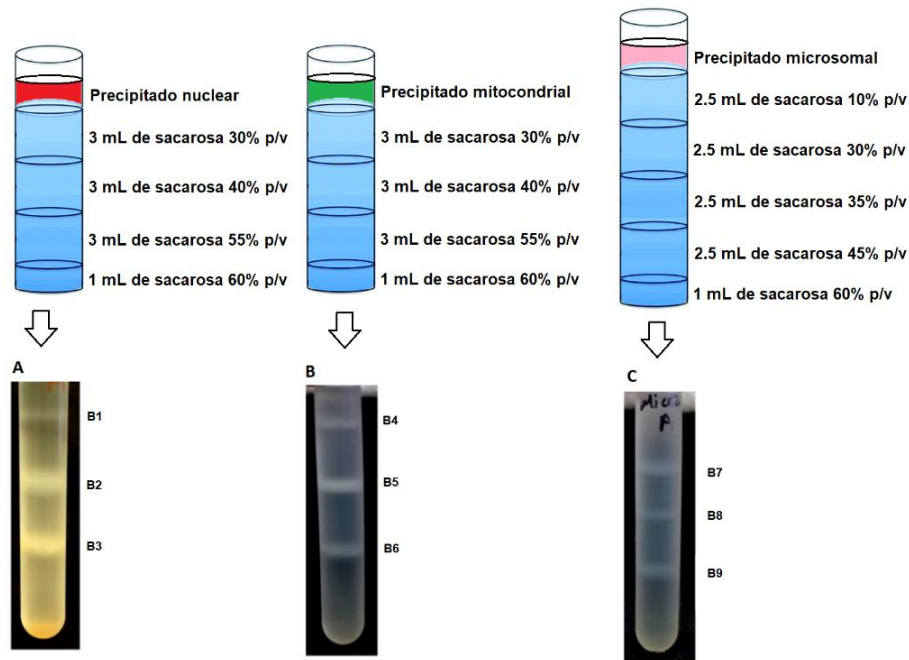


Fig. 5. Enriquecimiento de organelos: núcleos, mitocondrias y microsomas en gradientes de sacarosa. Fracciones obtenidas por Pérez-Rodríguez et al., (2020b) después de aplicar los precipitados subcelulares, a gradientes de sacarosa. Cada precipitado se coloca sobre el gradiente que se hace en tubos diferentes: Nuclear (A), Mitocondrial (B) y Microsomal (C). Los precipitados: nuclear, mitocondrial y microsomal fueron solubilizados en 0.25 M de sacarosa, se centrifugaron en los gradientes de sacarosa a 154693 x g durante 3 h a 4°C. Los gradientes para los precipitados nuclear y mitocondrial se adaptaron a 1 mL de 60% y 3 mL de 55, 40 y 30% (p/v) de sacarosa (Graham, 2004). El precipitado microsomal se separó en un nuevo gradiente de 1 mL de 60% y 2.5 mL de 45, 35, 30 y 10% (m/v) de sacarosa (Tomado de Pérez-Rodríguez et al., 2020b). Cada banda se nombró acorde el precipitado. B1 – B3 son las bandas o fracciones obtenidas en la centrifugación por gradiente de sacarosa para el precipitado nuclear, las bandas o fracciones B4 – B6 corresponden al precipitado mitocondrial y las bandas o fracciones B7 – B9 para el precipitado microsomal.

Pérez-Rodríguez et al., (2020b) definieron la posible composición y distribución de organelos de cada banda obtenida mediante el fraccionamiento por gradiente de sacarosa mediante TEM y WB, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 6.

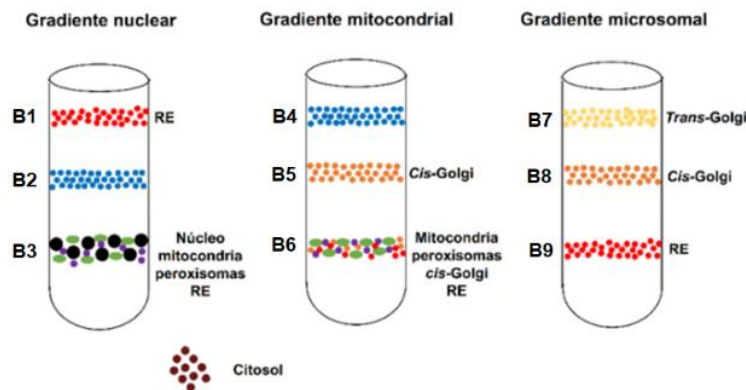


Fig. 6. Composición subcelular de las bandas o fracciones (B1-B9) obtenidas por centrifugación diferencial e isopícnica de homogenizados de células CHO (Tomado de Pérez-Rodríguez et al., 2020b). La composición subcelular de las bandas se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) y Western blot (WB). Nota: La composición se nombró determinando los orgánulos que se encontraron en mayor proporción en los resultados de la microscopía y el WB. RE: Reticulo endoplasmico; B: Banda.

Además del estudio de la composición de las fracciones, Pérez-Rodríguez et al., (2020c) realizaron la evaluación de tres diferentes métodos de precipitación de proteínas

denominados como “metanol-cloroformo”, “acetona” y “ácido tricloroacético-acetona” y seleccionaron el que generó la mayor eficiencia de recuperación de proteínas. Posteriormente, aplicaron el método de precipitación de acetona en las fracciones obtenidas para poder llevar a cabo el análisis proteómico, ya que fue el procedimiento que mostró mayores rendimientos de recuperación. Con la finalidad de normalizar las diferencias de representatividad entre organelos, se inyectaron 100 microgramos (μg) de proteína precipitada de cada una de las nueve bandas obtenidas y también del sobrenadante denominado como “citosol” a un sistema de nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masas para obtener los datos proteómicos crudos (Pérez-Rodríguez et al., 2020b; Pérez-Rodríguez et al., 2020c). La matriz de datos proteómicos crudos se obtuvo mediante el “software” MaxQuant, donde la lista de péptidos identificados se asignó a sus proteínas correspondientes mediante su búsqueda, a una tasa de descubrimiento falso (“FDR” por sus siglas en inglés) de 1%, en el proteoma de referencia de células CHO (UP000001075) y en una lista de contaminantes comunes conocidos. De estos datos proteómicos, Pérez-Rodríguez et al., (2020b) realizaron la identificación de las proteínas expresadas diferencialmente que se encuentran relacionadas con la vía de secreción clásica ya que esta ruta representa un cuello de botella para el incremento de la productividad (Peng et al., 2010; Hasegawa et al., 2011; Le Fourn et al., 2014; Pérez-Rodríguez et al., 2020b).

2.6 Proteómicas en células CHO recombinantes y el metabolismo energético.

En contraste con el estudio de Pérez-Rodríguez et al., (2020b), en la presente tesis se identificaron y analizaron las proteínas relacionadas con el metabolismo energético de ciclo de Krebs (CK) y la cadena de transporte de electrones (CTE) en las células CHO CRL-12445 y CRL-12444, pues se ha reportado que la producción de PR es un proceso energéticamente costoso para las células (Seth et al., 2006; Li et al., 2010; Dhami et al., 2018). En diferentes estudios proteómicos de células CHO donde se analizan clones con diferentes productividades, se han identificado algunas proteínas sobreexpresadas de las rutas metabólicas mencionadas (Van-Dyk et al., 2003; Nissom et al., 2006; Pascoe et al., 2004; Ho, 2013; Sommeregger et al., 2016; Liu et al., 2015; Gulde et al., 2017; Xu et al., 2019). En la Figura 7, se presentan estudios donde se encontraron marcadores mitocondriales expresados al alza y a la baja pertenecientes al metabolismo energético.

Los marcadores mitocondriales expresados al alza encontrados en la literatura corresponden principalmente a enzimas del ciclo de Krebs, en este caso, la Aconitasa (ACO2), Citrato sintasa (CS), Malato Deshidrogenasa (MDH) e Isocitrato Deshidrogenasa (IDH) y complejos de la cadena de transporte de electrones (Complejo I (NDUF), Complejo II* (Glicerol fosfato deshidrogenasa – GPD2) y Complejo IV (COX)). En el estudio de Van-Dyk et al., (2003), asociaron el aumento en la expresión de la PR de interés con una expresión elevada del polipéptido V-a de la citocromo C oxidasa (COXVa) y la enolasa (ENO). El polipéptido V-a es una de las cadenas polipeptídicas de la citocromo C oxidasa (Complejo IV), la oxidasa terminal en el transporte de electrones mitocondrial durante la producción de ATP, mientras que la enolasa es una enzima glucolítica involucrada en la conversión de 2-fosfoglicerato en fosfoenol piruvato. La sobreexpresión de ambas proteínas se relacionó con una mayor demanda de energía y de requisitos metabólicos para la producción de la PR y la división celular (Van-Dyk et al., 2003).

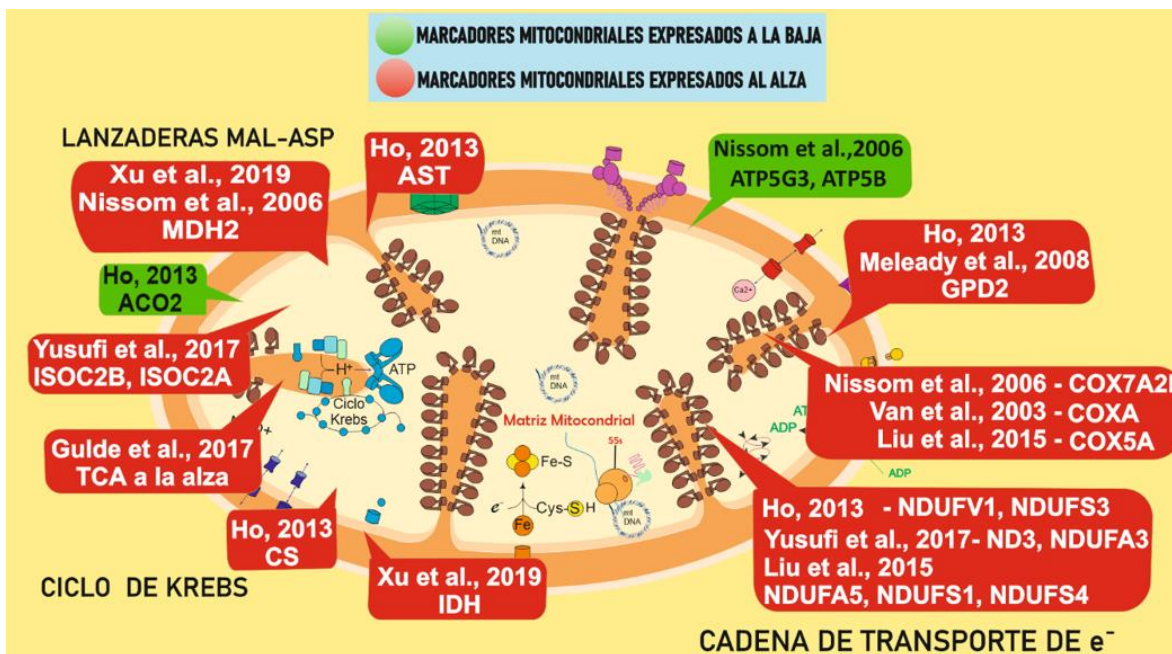


Fig. 7. Proteínas expresadas al alza y a la baja relacionadas con el metabolismo energético mitocondrial en diferentes estudios proteómicos de la literatura. Dichos marcadores se asocian a un aumento en la productividad en células CHO. En verde los marcadores expresados a la baja y en rojo los expresados al alza. AST: Aspartato aminotransferasa; MDH2: Malato deshidrogenasa 2 mitocondrial; ACO2: Aconitasa 2 mitocondrial; ISOC2 α : Isocitrato deshidrogenasa subunidad α ; ISOC2 β : Isocitrato deshidrogenasa subunidad β ; CS: Citrato sintasa, IDH: Isocitrato deshidrogenasa; GPD2: Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2 mitocondrial, ATP5G3: ATP sintasa complejo F(0) subunidad C3 mitocondrial; ATP5B: ATP sintasa F1 subunidad beta, mitocondrial; NDUFV1: NADH Deshidrogenasa (Ubiquinona) Flavoproteína 1 (51kD); NDUFS3: NADH Deshidrogenasa [Ubiquinona] Hierro-Azufre Proteína 3, Mitocondrial; ND3: NADH Deshidrogenasa Subunidad 3; NDUFA3: NADH Deshidrogenasa [Ubiquinona] 1 Subcomplejo Alfa Subunidad 3; NDUFA5: NADH Deshidrogenasa [Ubiquinona] 1 Subcomplejo Alfa Subunidad 5; NDUFS1: NADH Deshidrogenasa [Ubiquinona] Hierro-Azufre Proteína 1; NDUFS4: NADH Deshidrogenasa [Ubiquinona] Hierro-Azufre Proteína 4; COX7A2I: polipéptido 7A2 del complejo citocromo c oxidasa mitocondrial; COXA: Subunidad 1 de la citocromo c oxidasa; COX5A: Subunidad 5A del complejo citocromo c oxidasa mitocondrial.

En el estudio de Nissom et al., (2006) se identificaron sobreexpresadas en la línea de mayor producción de GFP proteínas relacionadas con ciclo de Krebs y la CTE, en este caso, la malato deshidrogenasa (MDH2) y el polipéptido 7A2 del complejo citocromo c oxidasa mitocondrial (COX7A2), respectivamente. Además, se encontraron sobreexpresadas enzimas involucradas directamente en la glucólisis como la piruvato kinasa (PKM2) y la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Por lo tanto, es posible que la línea celular de mayor productividad posea una capacidad más alta en la generación de energía (Nissom et al., 2006). Por su parte, Ho, (2013) encontró varias enzimas diferencialmente expresadas al alza como: La citrato sintasa (CS) enzima clave en ciclo de Krebs que cataliza la reacción para formar citrato a partir de oxalacetato y acetil coenzima A (Devlin et al., 2004; Nelson y Cox, 2014), la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD2) que tiene un papel crucial en las lanzaderas de glicerol fosfato que proveen de electrones a la cadena de transporte de electrones (Devlin et al., 2004; McKee et al., 2013; Nelson y Cox, 2014), la subunidad dihidrolipil deshidrogenasa (DLD) que forma parte de varias enzimas multiméricas importantes en la generación de energía como el complejo piruvato deshidrogenasa (PDC), el complejo enzimático α -cetoglutarato deshidrogenasa y el complejo α -ceto ácido de cadena ramificada deshidrogenasa (Devlin et al., 2004; McKee et al., 2013; Nelson y Cox, 2014; Ho, 2013). En el ámbito de metabolismo de aminoácidos acoplado a ciclo de Krebs encontró regulada al alza la aspartato aminotransferasa (AST) que es capaz de provisionar al ciclo de Krebs con oxalacetato (Safer, 1975; Wang et al.,

2016). Además, identificaron expresadas al alza dos subunidades del complejo I de la cadena de transporte de electrones (NDUFS3 y NDUFV1). La única enzima relacionada a metabolismo energético mitocondrial que se encontró regulada a la baja fue la aconitasa (ACO2), sin embargo, se discute que las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas a partir de la actividad de la cadena de transporte de electrones regulan a la baja esta enzima. Todo esto sugiere que el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) en conjunto con la cadena de transporte de electrones (CTE) pueden aportar la energía requerida para que la línea de mayor productividad pueda producir en mayor medida la PR (Ho, 2013). Otro trabajo indicó la sobreexpresión de las subunidades de la NADH deshidrogenasa (NDUFA5, NDUFS1 y NDUFS4) y una subunidad de la citocromo C oxidasa (COX5A), lo que implicaría que las mitocondrias y sus vías energéticas pueden jugar un papel importante en la productividad y mantenimiento de la célula (Liu et al., 2015). Gulde et al., (2017) evaluaron dos medios distintos en dos líneas celulares CHO productoras de IgG y encontraron que en uno de los dos medios, ambas líneas tuvieron una productividad específica mayor ya que CK estaba regulado al alza. En otro estudio se determinó que regulación positiva de los marcadores Isoc2b y Isoc2a, subunidades de la isocitrato sintasa y de ND3 y NDUFA, subunidades del complejo I de la cadena de transporte de electrones podían indicar que estas vías tienen un papel clave para satisfacer las mayores demandas de energía para la síntesis de PR (Yusufi et al., 2017). Xu et al., (2019) encontraron expresadas al alza la fosfoglicerato kinasa (PGK), la malato deshidrogenasa (MDH2) y la subunidad alfa de la isocitrato deshidrogenasa (IDH2 α) implicadas en la glucólisis y CK, sugiriendo que la eficiencia energética apoya el crecimiento de las células CHO y el aumento de la producción de Ab. Las proteínas diferenciales encontradas en los estudios mostrados de la Figura 7, se detectaron analizando la célula completa, por lo que las proteínas de organelos menos representados pudieron ser despreciadas. Dada la importancia de las vías energéticas en la producción de PR y las limitaciones de los estudios proteómicos empleando homogenados celulares, nuestro grupo llevó a cabo la identificación de proteínas diferenciales involucradas en metabolismo energético entre dos clonas CHO productoras del anticuerpo monoclonal anti-IL8 con una diferencia de aproximadamente 26 veces en su qP mediante proteómica subcelular (Pérez-Rodríguez et al., 2020b). Las proteínas diferenciales asociadas a las diferencias de productividad pueden ayudar en la obtención de líneas celulares que tengan un metabolismo energético más eficiente y mayor productividad.

2.7 Papel del estado redox (NAD⁺/NADH) en la producción de PR.

La molécula de NAD⁺ es un cofactor dinucleotídico con el potencial de aceptar electrones en reacciones de reducción-oxidación (redox) celulares y es esencial para la viabilidad y función de la célula (Stein y Imai, 2012; Grant et al., 2019). En su forma reducida, NADH es un donante de electrones celular ubicuo (Anderson et al., 2017). Las concentraciones intracelulares de NAD⁺, NADH en conjunto con la relación dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado/ dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NAD⁺/NADH) son determinantes en la función de varios tipos de enzimas, principalmente, las oxidorreductasas (McDonald, 2019; Habte y Beyene, 2020).

Otras familias de enzimas son capaces de utilizar NAD⁺ como cofactor, por ejemplo, las sirtuinas, que pertenecen a las desacetilasas dependientes de NAD⁺ y regulan vías de señalización relacionadas con la longevidad, la proliferación, la diferenciación celular, el metabolismo o la respuesta al estrés (Anderson et al., 2017). Tanto NAD⁺ como su forma reducida el NADH son responsables de que el transporte de electrones y la fosforilación

oxidativa sean procesos centrales para la producción de energía (ATP) en las mitocondrias (Grant et al., 2019).

La fosforilación del NAD⁺ y NADH generan NADP⁺ y NADPH, respectivamente. Los metabolitos fosforilados impulsan principalmente reacciones anabólicas, entre las que se incluyen la síntesis de colesterol y ácidos nucleicos, elongación de ácidos grasos y la regeneración de glutatión (GSH), uno de los principales antioxidantes del cuerpo (Stein y Imai, 2012; Grant et al., 2019). Dentro de las reacciones que consumen NAD⁺ se encuentran las impulsadas por la familia de enzimas poliadenosina fosforibosa ribosa (ADPR) (PARP1–17) que controlan la reparación del ADN y la estabilidad nuclear y enzimas de control epigenético (Sirt1–7), entre otras funciones (Grant et al., 2019; Essuman et al., 2017). El par de dinucleótidos NAD⁺/NADH es crucial para impulsar reacciones de reducción-oxidación (redox) en la bioenergética celular (Ponizovskiy, 2016; Habte y Beyene, 2020)

Las concentraciones totales de dinucleótidos intracelulares (libres y unidos a proteínas) oscilan de 1–3 mM (Nikita et al., 2005), con una relación NAD⁺/NADH de (2–10) mM NAD⁺/1 mM NADH (dependiendo de la especie, tipo de célula y estado metabólico) (Lin y Guarente, 2003; Lin et al., 2004; Easlson et al., 2007; Wilhelm y Hirrlinger, 2011; Anderson et al., 2017). En la década de los 60's Krebs y sus colaboradores realizaron las primeras determinaciones de manera indirecta de la relación de NAD⁺/NADH midiendo las concentraciones de los sustratos oxidados y reducidos de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y de la glutamato deshidrogenasa (GDH) (Williamson y Krebs, 1967). La relación NAD⁺/NADH en el citoplasma y las mitocondrias hepáticas de ratas alimentadas fue de 725 mM NAD⁺/mM NADH y 8 mM NAD⁺/mM NADH, respectivamente (Williamson y Krebs, 1967; Anderson et al., 2017). Por otra parte, observaron que las proporciones cambiaron a 208 mM NAD⁺/mM NADH y 10 mM NAD⁺/mM NADH en citoplasma hepático y mitocondrias, respectivamente, en ratas diabéticas. Otros métodos indirectos que fueron utilizados para medir el estado redox y se determinó que las relaciones citosólicas de NAD⁺ libre/NADH libre oscilaban de (700-2500) fmol NAD⁺/1 fmol NADH en células cancerosas humanas (Christensen et al., 2014; Anderson et al., 2017).

Mediante el uso de biosensores fluorescentes codificados genéticamente se revelaron concentraciones de NAD⁺ libre en compartimientos citosólicos, nucleares y mitocondriales de 106 micromolar (μM), 109 μM y 230 μM, respectivamente (Cambronne et al., 2016; Anderson et al., 2017). Estos hallazgos sugieren que las agrupaciones subcelulares de NAD⁺ y NADH se mantienen en equilibrios distintos y que en desordenes metabólicos existen alteraciones en las proporciones NAD⁺/NADH (Williamson y Krebs, 1967; Anderson et al., 2017).

El NAD⁺ y NADH pasan mediante un transporte pasivo a través de los poros nucleares, por lo tanto, la relación NAD⁺/NADH será similar tanto en citosol como en núcleo. Sin embargo, el “pool” mitocondrial varía, ya que el transporte de sustratos a través de la membrana interna de las mitocondrias está mediado por el sistema de acarreadores mitocondrial (MCS por sus siglas en inglés) y aunque aún no se encuentra un transportador mitocondrial específico para NAD⁺ o NADH, estos atraviesan la membrana interna (Williamson y Krebs, 1967; Anderson et al., 2017). Las relaciones citoplasmáticas de NAD⁺/NADH oscilan entre 60 y 700 mM NAD⁺/mM NADH, mientras las relaciones mitocondriales de NAD⁺/NADH se mantienen entre 7 y 8 mM NAD⁺/NADH en una célula eucariota (Williamson y Krebs, 1967; Veech et al., 1972; Stein y Imai, 2012). Los niveles mitocondriales de NAD⁺ también pueden ser más altos que los niveles citoplasmáticos, pero la diferencia relativa es específica del tipo celular. Por ejemplo, el grupo de dinucleótidos NAD⁺ y NADH es 70% mitocondrial en miocitos cardíacos (10.0 ± 1.8 nanomol (nmol)/mg de proteína), 50% mitocondrial en

neuronas (4.7 ± 0.4 nmol / mg de proteína), y 30-40 % mitocondrial en hepatocitos y astrocitos (3.2 ± 1.0 nmol /mg de proteína) (Alano et al., 2007; Stein y Imai, 2012). Estas diferencias se deben presumiblemente a requisitos diferenciales para la función de la fosforilación oxidativa ya que dependiendo el tipo de célula se requieren cantidades de NAD^+ y NADH diferentes (Alano et al., 2007; Stein y Imai, 2012).

En lo que respecta al estudio de la relación NAD^+/NADH en células de mamífero al estudiar células sanguíneas humanas se determinaron valores de $0.44 - 1.2$ pmol $\text{NAD}^+/\text{pmol NADH}$ (Wakade et al., 2014). En células T intratumorales humanas los valores oscilaron de $0.9 - 3.2$ pmol $\text{NAD}^+/\text{pmol NADH}$ (Wang et al., 2020), en el caso de células HEK-293 el rango fue de $0.4 - 1.0$ pmol $\text{NAD}^+/\text{pmol NADH}$ (Noh et al., 2019), en células madre hematopoyéticas de ratón la relación tuvo valores de $0.5 - 2.6$ pmol $\text{NAD}^+/\text{pmol NADH}$ (Gu et al., 2020). En las líneas celulares de cáncer humano MIA PaCa-2 y HT29 los valores se encontraron en el intervalo de $0.8 - 2.6$ pmol $\text{NAD}^+/\text{pmol NADH}$ y de $5 - 12$ pmol $\text{NAD}^+/\text{pmol NADH}$, respectivamente (Oshima et al., 2020). Debido a que las células cancerígenas y las células CHO comparten características metabólicas similares (glutaminólisis y el efecto Warburg), se espera que los valores obtenidos de la proporción NAD^+/NADH sean similares a los valores de las células cancerosas.

En células CHO, el impacto de la relación NAD^+/NADH en la producción de PR se ve reflejada en líneas celulares transfectadas con la piruvato carboxilasa citosólica (PYC2) de levadura, encargada de carboxilación irreversible del piruvato a oxaloacetato con la finalidad de aumentar el flujo de piruvato hacia el ciclo de Krebs (Gupta et al., 2017). Este efecto generó una mejora en la expresión de anticuerpos aproximadamente de un 70% comparado con la línea celular parental. La modificación con la piruvato carboxilasa citosólica modificó la relación NAD^+/NADH ya que la clona que sobreexpresó la PYC2 obtuvo una proporción NAD^+/NADH de 0.17 pmol $\text{NAD}^+/\text{pmol NADH}$ mientras que la célula parental mostró una relación de 5.05 pmol $\text{NAD}^+/\text{pmol NADH}$. Lo que demostraría que la sobreexpresión de PYC2 en las células tendría un mayor aporte de poder reductor del citosol a las mitocondrias debido al mayor flujo a través de la lanzadera de malato-aspartato, lo que aumentaría el metabolismo energético de la célula. Estos resultados podrían asociar un estatus reductor (relación $\text{NAD}^+/\text{NADH} < 1$) con mayor productividad (Gupta et al., 2017). En otro estudio realizado con cinco líneas celulares productoras de un anticuerpo IgG, tres líneas sobreexpresaban la piruvato carboxilasa (CHO PYC), la malato deshidrogenasa (CHO MDH) y el transportador de fructosa GLUT5 (CHO FrcT). Las células CHO PYC y CHO MDH se cultivaron con glucosa y se compararon con las células parentales. En el caso de las células CHO FrcTr se cultivaron en medios con fructosa como fuente de carbono y se compararon con ambas líneas parentales crecidas en glucosa y en fructosa (Wilkens y Gerdtzen, 2015). Entre las cinco líneas celulares no hubo diferencia significativa de qP de PR durante la fase exponencial ni en la estacionaria. Al realizar la comparación de productividades se encontró que todas las líneas celulares tenían un estatus NAD^+/NADH oxidante (relación $\text{NAD}^+/\text{NADH} > 1$) 17.12 ± 2.04 , 4.19 ± 1.05 , 3.66 ± 0.95 , 3.64 ± 0.71 y 8.57 ± 1.84 para las células parentales crecidas en medio con glucosa como fuente de carbono. Se observó que las células que poseen una mayor productividad específica son las células control crecidas en fructosa con un estado redox oxidante de 4.19 ± 1.05 , el cual no es significativamente diferente de las células con PYC y FrcTr (Wilkens y Gerdtzen, 2015). Existe la posibilidad de que la obtención de estos resultados en las células mutantes se deba a que en el estudio destacan que las células parentales son bajas productoras de IgG y, por ende, las modificaciones en dichas células no mostraron un aumento significativo en la qP. En otro estudio, Juárez et al., (2020) transfectaron la hemoglobina de Vitreoscilla (VHb) a células CHO-K1 que expresaban de manera estable la proteína verde fluorescente

(GFP por sus siglas en inglés) y encontraron que hubo un ligero aumento de PR asociado a una disminución de la relación NAD^+/NADH (24.2 ± 1.2) en contraste de las células parentales que no expresan VHb (26.3 ± 2.0). Esta disminución en la relación NAD^+/NADH indicaría que habría una mayor concentración de NADH, por lo tanto, sería más reductor. Por otra parte, no hubo impacto en los parámetros cinéticos y metabólicos como la viabilidad celular y el potencial de membrana mitocondrial, respectivamente (Juárez et al., 2015). A pesar de que los estudios no muestren un consenso se revela que el estado redox (NAD^+/NADH) puede tener un papel clave en los cambios de la productividad. Comparando los resultados entre los estudios se observa que las líneas celulares de Wilkens y Gerdtzen, (2015) no presentaron mejoría significativa en la productividad además de que su estatus reductor es oxidante (relación $\text{NAD}^+/\text{NADH} > 1$). Por otra parte, Gupta et al., (2017) y Juárez et al., (2021) encontraron mejora en la expresión de anticuerpos comparado con la línea celular parental y un estatus redox más reductor asociado con una mayor productividad, por lo tanto, se hipotetiza que un estatus más reductor puede ser clave para aumentar de manera significativa la PR.

2.8 Biogénesis mitocondrial asociada a una mayor productividad de PR.

Las mitocondrias (del griego: mitos, filamento + chondros, granulo) son el lugar donde se realiza la respiración celular o también denominado como metabolismo aerobio u oxidativo en casi todas las eucariotas (Voet et al., 2016). Estos orgánulos citoplasmáticos tienen un diámetro entre 0.5-1 μm y hasta 7 μm de longitud (Devlin, 2004). Las mitocondrias no tienen un tamaño fijo ya que son organelos dinámicos que se dividen (fisión), ramifican y fusionan (fusión) de manera continua (McKee y McKee, 2014). En promedio hay unas 2000 mitocondrias por célula (Nelson y Cox, 2014). Sin embargo, el número de estos organelos puede variar dependiendo la actividad metabólica en la célula (Sánchez y Arboleda, 2008; Nelson y Cox, 2014). Incluso, algunos tipos de células carecen de mitocondrias como los eritrocitos (Sánchez y Arboleda, 2008; Nelson y Cox, 2014). En células cancerosas el número de mitocondrias disminuye en comparación de las células normales (Rastogi, 2010). La relación del número de mitocondrias con el posible aumento de la productividad de PR se ha propuesto debido a la sobreexpresión de genes y proteínas mitocondriales podría en las células de mayor productividad en comparación con las células de baja productividad (Nissom et al., 2006). En otro estudio se reportó que el aumento de la productividad va acompañado de aumentos en la masa mitocondrial y la actividad mitocondrial (Bi et al., 2004). Por su parte, Yusufi et al., (2017) encontraron un incremento en el número de copias de genes mitocondriales en células CHO productoras de PR (Yusufi et al., 2017). Martínez-López et al., (2021) transfectaron la línea CHO-DP12 clone#1934 (CRL-12445) para que expresara en mayor medida un micro-RNA denominado como miR-31*. La transfección mejoró la productividad de las células y se determinó mediante el tinte Mitotracker un mayor contenido mitocondrial respecto a la línea parental (Martínez-López et al., 2021). Por ende, se especula que un aumento en la cantidad de mitocondrias podría ser crucial para que las células de alta productividad puedan generar la energía suficiente para satisfacer las demandas requeridas para la mayor productividad. Por último, en diversos estudios proteómicos en células CHO donde se analizaron clonas con diferentes productividades, se identificaron algunas proteínas sobreexpresadas relacionadas a la biogénesis mitocondrial (Nissom et al., 2006; Baik et al., 2006; Pascoe et al., 2007; Meleady et al., 2008; Meleady et al 2011; Ho, 2013; Sommeregger et al., 2016; Hausmann et al., 2018). En la Figura 8, se exponen diferentes estudios donde se encontraron marcadores proteicos relacionados a la biogénesis mitocondrial. Las proteínas sobreexpresadas involucradas en la biogénesis mitocondrial corresponden principalmente a HSP60 y HSP70. La familia de chaperonas de choque térmico (HSP por sus siglas en inglés) son

indispensables para la biogénesis de las mitocondrias. Además, este sistema de chaperonas resuelve problemas de plegado y ensamblaje que presentan las proteínas (Voos y Röttgers, 2002; Böttinger et al., 2015).

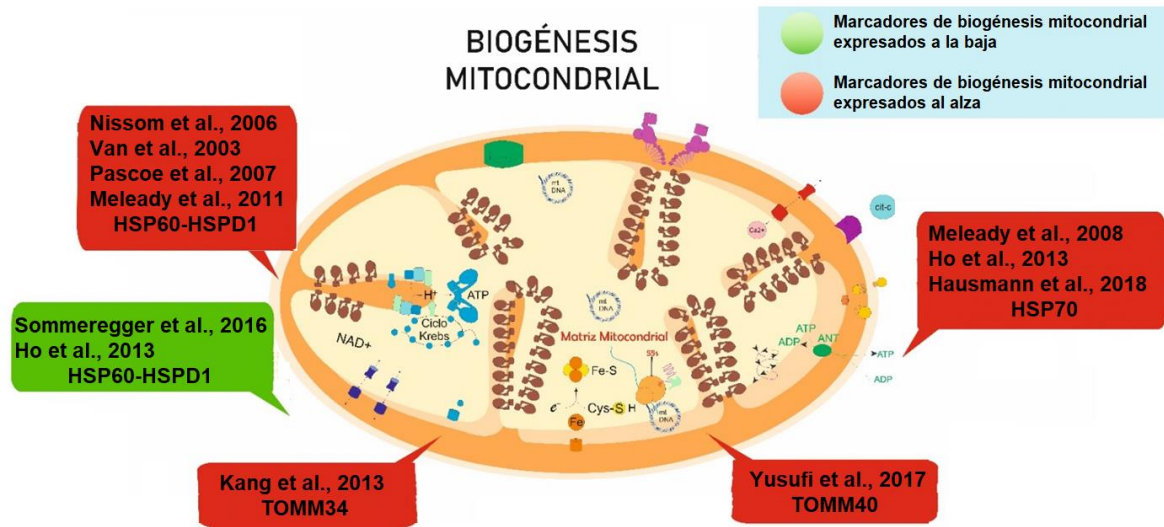


Fig. 8. Proteínas expresadas al alza y a la baja relacionadas con la biogénesis mitocondrial en diferentes estudios proteómicos de la literatura. Dichos marcadores se asocian a un aumento en la productividad en células CHO. En verde los marcadores expresados a la baja y en rojo los expresados al alza. HSP60: Proteína de choque térmico de 60 kDa mitocondrial; HSP70: Proteína de choque térmico de 70 kDa mitocondrial. TOMM34: Translocasa de la membrana mitocondrial externa 34; TOMM40: Translocasa de la membrana mitocondrial externa 40.

Habiendo expuesto los antecedentes, se realizó un proceso de expansión celular y un inóculo que daría lugar a la obtención de otro banco con 8 generaciones de diferencia a partir del banco de trabajo de Pérez-Rodríguez et al., (2020b) con el cual se llevó a cabo el estudio proteómico. Se realizó la caracterización tanto cinética como estequiométrica de este nuevo banco celular bajo las mismas condiciones de cultivo empleadas en el trabajo anterior. Debido a la importancia de las vías energéticas en la producción de PR, se llevó a cabo la identificación de proteínas diferenciales involucradas en metabolismo energético mitocondrial entre las dos clonas CHO productoras del anticuerpo monoclonal anti-IL8 a partir de los datos proteómicos subcelulares (Pérez-Rodríguez et al., 2020b). Aunado a esto, se procedió a determinar la relación $NAD^+/NADH$ de las líneas CRL-12444 y CRL-12445 con la finalidad de ver si hay una diferencia significativa y determinar si este fragmento del estado redox es oxidante o reductor. Por último, se comparó el número de mitocondrias de las líneas CRL-12444 y CRL-12445 con la finalidad de ver si la cantidad de mitocondrias puede ser un factor clave en las diferencias de productividad entre ambas líneas celulares.

3 HIPÓTESIS

La línea celular CRL-12445 de mayor productividad específica de anti-IL8 acumula más proteínas mitocondriales involucradas en el metabolismo energético comparada con la línea CRL-12444, las cuales se relacionan con el aumento de la productividad.

4 OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Comparar los perfiles proteómicos mitocondriales y el estatus redox (NAD^+/NADH) de la línea celular CHO: CRL-12445 que produce casi 25 veces más anticuerpo monoclonal recombinante anti-IL8 que la línea CRL-12444.

4.2 ESPECÍFICOS

1.- Caracterizar cinética y estequiométricamente las líneas celulares de baja (CRL-12444) y de mayor productividad (CRL-12445) productoras de anticuerpo monoclonal anti-IL8.

2.- Identificar las proteínas diferenciales asociadas al metabolismo energético (Ciclo de Krebs y Cadena de transporte de electrones) entre las líneas CRL-12444 y CRL-12445 productoras del anticuerpo monoclonal recombinante anti-IL8.

3.- Validar los resultados de la proteómica diferencial mediante la acumulación diferencial de proteínas y ensayos de actividad enzimática a partir de células en cultivo.

4.- Determinar la relación NAD^+/NADH celular, comparar el número de mitocondrias entre las líneas CRL-12444 y CRL-12445 y asociarlos con la diferencia de productividad.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Caracterización cinética y estequiométrica de las células CRL-12444 y CRL-12445.

5.1.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo.

Se realizó el cultivo de dos líneas CHO productoras de anticuerpos monoclonales anti-IL-8: CRL-12444 y la CRL-12445 (ATCC, 2021). Las líneas celulares fueron previamente adaptadas para su cultivo en suspensión.

El medio utilizado para crecer las células fue CDM4CHO (Hyclone, Logan, UT, EUA) suplementado con insulina a una concentración final de 2 µg/mL (Eli Lilly, Indianapolis, IN, EUA), Glutamina estable (Dipéptido alanil-glutamina, Biowest LLC, Kansas City, MO, EUA) a una concentración final de 6 mM y Metotrexato (Mtx) (Pfizer, Nueva York, NY, EUA) a una concentración final de 200 nM. Se realizó la cinética de crecimiento de ambos tipos celulares en matraces de 250 mL (Corning, Nueva York, NY, EUA), con un volumen de trabajo del 20% y se inocularon a una concentración celular inicial de 500000 células/mL. Las condiciones de cultivo fueron 37°C en una incubadora humidificada (Nuair, Plymouth, MN, EUA) a 5% dióxido de carbono (CO₂) y con una agitación de 60 r.p.m. El método para el conteo de células viables consistió en el uso de cámara de Neubauer en conjunción de azul de tripano (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), mediante microscopía. Se hicieron triplicados biológicos para la caracterización cinética y metabólica de los cultivos. La viabilidad de las células se determinó cuantificando las células viables y las células muertas o no viables (teñidas de azul) de los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer y sacando el porcentaje mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{N^{\circ} \text{ de células viables}}{N^{\circ} \text{ total de células}} * 100$$

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{N^{\circ} \text{ de células viables}}{N^{\circ} \text{ de células viables} + N^{\circ} \text{ de células no viables}} * 100$$

Donde:

N° de células viables: Es la suma de las células viables que se encontraron en los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer.

N° de células no viables: Es la suma de las células no viables o teñidas en azul que se encontraron en los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer.

N° total de células: Es la suma de las células viables que se encontraron en los cuatro cuadrantes más la suma de las células no viables que se encontraron en los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer.

5.1.2 Medición de metabolito.

Se determinó el consumo de nutrientes y la producción de metabolitos de desecho, en este caso, glucosa y glutamato, amonio y lactato, respectivamente, empleando el analizador bioquímico automatizado A15 de Biosystems (Biosystems, Barcelona, ESP). Las velocidades de consumo o producción (q) se calcularon durante la fase exponencial de crecimiento mediante la diferencia de concentraciones de cada metabolito del tiempo inicial y final de dicha fase dividido entre la integral de células viables (IVCD por sus siglas

en inglés) estimada como el área bajo la curva empleando el software GraphPad Prism en su versión 9.0.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Se utilizaron triplicados biológicos para la caracterización cinética y metabólica de los cultivos.

5.1.3 Determinación de la productividad específica (q_p).

La concentración de anticuerpo anti IL8 se determinó mediante el kit Human IgG ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories, Inc., 807 TX, EUA) según el fabricante. El sustrato empleado para llevar a cabo la reacción colorimétrica fue TMB (Sigma-Aldrich, Missouri, MO, EUA) el cual se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). La reacción enzimática se detuvo empleando una solución de concentración final 0.18 M de H_2SO_4 (J.T. Baker, Pensilvania, PA, EUA) y se realizó la lectura de absorbancia en un equipo Stat Fax(R) 4200 Microplate Reader (Awareness Technologies, Westport, NY, EUA) a 450 nm. El cálculo de la productividad específica se realizó durante la fase exponencial de crecimiento mediante la diferencia del título de anticuerpo del tiempo inicial y final de dicha fase dividido entre la integral de células viables (IVCD) estimada.

5.1.4 Análisis estadístico.

Los parámetros metabólicos y de crecimiento se compararon entre ambas líneas celulares mediante el uso de la prueba t de Student en Microsoft Excel 2021 (Microsoft, Albuquerque, NM, EE. UU.).

5.2 Identificación de las proteínas diferenciales asociadas al metabolismo energético entre las líneas CRL-12444 y CRL-12445.

5.2.1 Fraccionamiento subcelular y precipitación de proteínas.

Se cosecharon de 300 a 500 millones de células CHO a las 72 h de cultivo durante la fase exponencial con una viabilidad superior al 95%, después se centrifugaron a 185 x g durante 5 minutos a 4°C y se lavaron dos veces en PBS frío (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM, KH_2PO_4 1.8 mM). El pellet celular se resuspendió en 8 mL de buffer HEPES (HEPES 10 mM, EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) 1 mM, pH 7.4), se incubó durante 20 minutos en hielo invirtiendo cada 10 minutos los tubos. Antes de la homogeneización, se agregó a la suspensión celular, PMSF (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) a una concentración final de 1 mM además del cóctel inhibidor de proteasas SigmaFast al 10% (v/v) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) que contiene AEBSF 2 mM, Aprotinina 0.3 μ M, Bestatina 130 μ M, Leupeptina 1 μ M, E-64 14 μ M y EDTA 1 mM y que fue preparado según las recomendaciones del fabricante. Las células se transfirieron a un homogeneizador Dounce y se rompieron mediante 30 golpes en hielo. Inmediatamente, se añadieron 2 mL de sacarosa fría a partir de una solución stock de 1.31 M para restaurar la osmolaridad a una concentración final de 0.25 M y se homogenizó mediante inversión (Pérez-Rodríguez et al., 2020b). Se realizó centrifugación diferencial para separar los componentes subcelulares (Ultracentrífuga Optima XE, Beckman Coulter, Indianápolis, EE. UU.) Se llevó a cabo un primer proceso de centrifugación a 3000 x g durante 10 min, el sobrenadante obtenido se sometió a 9000 x g durante 15 min, por último, al sobrenadante de la segunda centrifugación se le hizo un tercer proceso de centrifugado a 100 000 x g durante una hora. Los pellets de cada proceso se denominaron nuclear, mitocondrial y microsomal, respectivamente. El sobrenadante de la última etapa de centrifugación se denominó "citósol". Los pellets nucleares, mitocondriales y microsomales

se diluyeron en 1 mL de sacarosa 0.25 M en buffer HEPES y se depositaron sobre gradientes de sacarosa. Las soluciones de sacarosa se prepararon en HEPES y se mantuvieron frías. Todos los gradientes se centrifugaron a un promedio de $154693 \times g$ durante 3 h a 4°C (Ultracentrífuga Optima XE, SW 40 Ti Swinging-Bucket Rotor, Beckman Coulter, Indianápolis, EE. UU.) (Pérez-Rodríguez et al., 2020b). Se elaboró un gradiente para las suspensiones nucleares y mitocondriales compuesto por 1 mL de 60% (p/v) y 3 ml de cada solución de sacarosa al 55, 40 y 30% (p/v). Las preparaciones microsomales se separaron en dos gradientes diferentes. Uno compuesto por 1 ml de sacarosa al 60, 45, 40, 35, 30, 25, 20 y 15% (p/v). El otro formado por 1 ml al 60% (w/v) y 2.5 ml de cada solución de sacarosa al 45, 35, 30 y 10% (p/v). Los gradientes se cargaron con 500 μ L de muestra. Al finalizar la centrifugación se recogieron las bandas visibles y el gradiente completo en fracciones de 500 μ l de arriba hacia abajo para su posterior caracterización. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford en el formato de microplacas de 96 pocillos usando Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) y albúmina de suero bovino (GE Healthcare Bio-Sciences, EE. UU.) como estándar. La concentración de sacarosa se midió usando un refractómetro. Las proteínas de todas las fracciones subcelulares aisladas se precipitaron con acetona y se usaron para el análisis de espectrometría de masas-masas (MS/MS) (Pérez-Rodríguez et al., 2020b; Pérez-Rodríguez et al., 2020c)

5.2.2 Análisis MS/MS.

Aproximadamente 200 μ g de proteína se solubilizaron en 50 μ l de buffer de guanidinio (clorhidrato de guanidinio 6 M, Tris (2-carboxietil) fosfina 5 mM, cloracetamida 10 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8.5) y se incubaron a 99 °C durante 10 min. Se midió la concentración de proteína y se digirieron 100 μ g durante la noche (12 h) usando tripsina como enzima. Se añadió TFA al 0.5% para detener la reacción y 20 μ g de péptidos digeridos se inyectaron por etapas según Rappsilber et al., (2007).

La separación de péptidos se realizó mediante nano cromatografía líquida de alta resolución (nanoHPLC por sus siglas en inglés) en un sistema UltiMate 3000 RSLCnano de flujo capilar (capLC Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) acoplado a una columna C18 de 15 cm (50 μ m x 150 mm, 2 μ m Acclaim PepMap C18 column) a un flujo de 1.2 μ L/min, en un gradiente escalonado de 3-45% de acetonitrilo durante 120 min. Los péptidos separados se inyectaron en un espectrómetro de masas-masas (MS por sus siglas en inglés) Q-Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), operado en modo de adquisición dependiente de datos Top 12. El espectro MS1 se colectó a una resolución de 60,000, blanco AGC 3.0×10^6 , con un tiempo máximo de inyección de 30 ms. A partir de este se colectaron 12 espectros MS2 a una resolución de 15,000, en un tiempo máximo de inyección de 30 ms, energía de colisión HCD 28% y exclusión dinámica 25 seg. Los datos fueron analizados usando MaxQuant (Rappsilber et al., 2007; Cox y Mann, 2008; MaxQuant, 2018; Pérez-Rodríguez et al., 2020b). Durante el análisis MaxQuant, el carbamidometilo (C) y la oxidación de los residuos de metionina se establecieron como modificaciones fijas y variables, respectivamente. El FDR se estableció en 1%. Se buscaron datos contra el proteoma CHO de Uniprot (UP000001075) con una lista de contaminantes conocidos. La tolerancia se estableció a 20 ppm (Rappsilber et al., 2007; Cox y Mann, 2008; MaxQuant, 2018; Pérez-Rodríguez et al., 2020b). Después del procesamiento de los espectros por MaxQuant, se generan datos crudos de intensidad que necesitan un procesamiento y análisis adicional para determinar las proteínas expresadas diferencialmente (Rappsilber et al., 2007; Cox y Mann, 2008; MaxQuant, 2018; Pérez-Rodríguez et al., 2020b).

5.2.3 Procesamiento, comparación y clasificación de datos proteómicos.

Los datos crudos inicialmente, poseían los valores de intensidad pertenecientes a la fracción nuclear, mitocondrial, microsomal y de citosol los cuales se separaron por fracción, mientras que Pérez-Rodríguez et al., (2020b) los analizaron todos en conjunto. En ambos casos se llevó a cabo un filtrado de datos para eliminar componentes clasificados como contaminantes y otros grupos sin interés. El filtrado de contaminantes y los subsecuentes pasos se llevaron a cabo usando el lenguaje de programación R (R Core Team, 2020). Pérez-Rodríguez et al., (2020b) normalizó los datos con el paquete Normalyzer v1.1.1 (Chawade et al., 2014), y seleccionó los dos mejores métodos entre los 11 evaluados. En este estudio, se llevó a cabo un proceso de normalización en dos softwares distintos con la finalidad de evaluar posibles sesgos sistemáticos no deseados (Graw et al., 2020). La normalización tiene como objetivo hacer que las muestras de los datos sean comparables y que el análisis posterior sea confiable (Välikangas et al., 2016). Se llevó a cabo el proceso de normalización con el software NormalyzerDE en su versión 1.12.0 (Chawade et al., 2018) mientras que la segunda forma consistió en la aplicación del software DEP (Differential Enrichment analysis of Proteomics data) utilizado principalmente para el análisis proteómico de datos de salida previamente procesados en Maxquant (Smits, 2020). Cabe destacar que en ambos casos se aplicó el mejor método de normalización entre los 11 evaluados en NormalyzerDE. Pérez-Rodríguez et al., (2020b) usaron diferentes softwares por cada paso de análisis bioinformático, mientras que DEP posee integradas las herramientas de normalización, imputación y de análisis de expresión diferencial (Smits, A. 2020). El filtrado de valores ausentes se realizó con NormalyzerDE previo a normalizar los datos. Mientras con DEP se hizo primero el proceso de normalización y después el filtrado de valores ausentes. Los datos ausentes que quedaron después del proceso de filtrado se imputaron con el método QRILC, en el caso de Pérez-Rodríguez et al., (2020b) y, en este estudio, se utilizó un método de imputación mixto (QRILC + KNN) en ambas metodologías de análisis (Smits, 2020). En ambos procedimientos fueron imputados los valores censurados a la izquierda ya que estos predominaron. En su estudio, Pérez-Rodríguez et al., (2020b) realizaron la comparación de la abundancia de proteínas entre ambas líneas celulares, por cada compartimento con los softwares SAM (Roxas y Li, 2008) y ROTS (Suomi et al., 2017). El punto de corte para la detección de proteínas expresadas diferencialmente en el análisis fue de un cambio en su concentración de al menos dos veces y un $FDR \leq 0.05$. En este estudio, tanto los datos normalizados provenientes de NormalyzerDE como los de DEP fueron sometidos al análisis de enriquecimiento usando el algoritmo de análisis integrado en DEP (Smits, A. 2020). Las condiciones del análisis fueron un punto de corte de acumulación de al menos dos veces y un $FDR \leq 0.05$.

Los valores de intensidad obtenidos de los péptidos provenientes de las bandas del fraccionamiento subcelular (Figura 6) se compararon dejando los valores de intensidad de la línea CRL-12444 como control. Es importante añadir que, a la metodología donde se hizo la normalización mediante NormalyzerDE y el análisis de expresión diferencial mediante DEP, se denominó "Normalyzer+DEP", mientras que la metodología donde se llevó a cabo todo el procesamiento de los datos, incluida la normalización, se nombró "Solo DEP". Posteriormente, se realizó un análisis de convergencia mediante diagramas de Venn usando el lenguaje de programación R (R Core Team, 2020) entre ambos procesos para determinar los niveles de convergencia entre marcadores proteicos diferenciales provenientes de los péptidos obtenidos de las bandas del fraccionamiento subcelular. Las proteínas expresadas diferencialmente que convergieron entre las dos metodologías se utilizaron para realizar los correspondientes análisis de ontología utilizando los softwares de ShinyGO (Ge et al., 2019) y DAVID (Dennis, G. et al., 2003). Debido a la escasa

información de las funciones de las proteínas de células de hámster chino, Pérez-Rodríguez et al., (2020b) llevaron a cabo la alineación de las proteínas diferenciales que identificaron con el proteoma de referencia de *Mus musculus* (UP000000589), usando el software BLAST+ v2.2.24, para asignarles su homólogo murino más cercano. Las proteínas expresadas diferencialmente se mapearon y clasificaron por BlastKOALA de KEGG (Kanehisa et al., 2016), PANTHER v14.0 (Mi et al., 2019) y DAVID v6.8 (Huang et al., 2009). En este estudio se llevó a cabo un análisis de ortólogos en el software online BioMart del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) donde se tradujeron los ProteinID's de las proteínas diferenciales de *Cricetulus griseus* a NCBI ID's y Ensembl ID's pertenecientes al genoma de *Mus musculus* (Kinsella et al., 2011). Los códigos de las proteínas diferenciales se tradujeron a genes ya que ShinyGO y DAVID usan códigos de genes. Para poder realizar el análisis de ontología, las proteínas diferenciales a la baja y al alza de las tres bandas de la fracción mitocondrial se pusieron en una sola lista diferente. En ambos estudios las proteínas expresadas diferencialmente se clasificaron de acuerdo con la ontología de genes, se compararon con estudios previos de proteómica y se agruparon en los respectivos procesos celulares de interés. El flujo del procesamiento de datos y de la identificación y clasificación de proteínas diferenciales se muestra en la Figura 9.

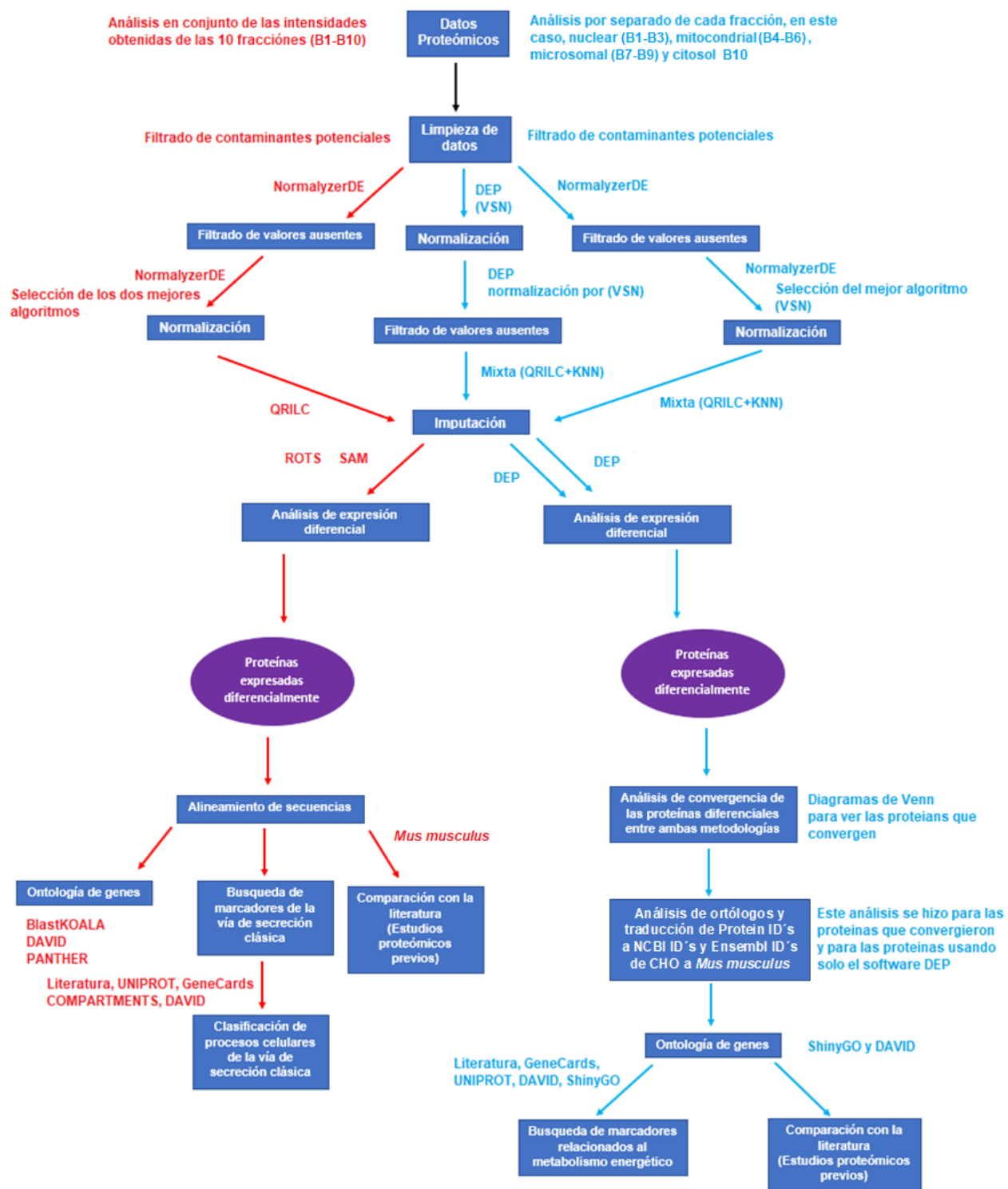


Fig. 9. Diagrama de flujo comparando el procesamiento de datos proteómicos realizado por Pérez-Rodríguez et al., (2020b) (rojo) y el aplicado en esta tesis (azul cielo). Este procesamiento comprendió la limpieza, normalización e imputación de datos previo a la identificación de proteínas y grupos de genes con acumulación diferencial entre las líneas celulares CRL-12444 y CRL-12445. Las proteínas expresadas diferencialmente pertenecientes al metabolismo energético mitocondrial se clasificaron de acuerdo con la ontología de genes y se compararon con la literatura.

5.3 Validación de los resultados de la proteómica diferencial.

5.3.1 Validación de los datos proteómicos por WB.

Las proteínas diferenciales que convergieron bajo una acumulación de al menos dos veces ($FC \geq 2$) y un $FDR \leq 0.05$ usando la metodología de DEP en tres metodologías de imputación distintas de la fracción mitocondrial, se usaron como candidatas para la validación de la proteómica. Se llevaron a cabo diagramas de Venn (mostrados en el Anexo 3, Figura 1) para plasmar de manera visual las proteínas diferenciales que convergieron entre estos tres métodos. Para reducir la lista de candidatos, se propusieron los siguientes criterios de selección para validar la proteómica mediante Western Blot: Al menos el 90% de identidad entre las secuencias de *Mus musculus* y *Cricetulus griceus*. El análisis correspondiente de alineamiento se hizo en BLAST (Madden, 2002) y SWISSPROT (Bairoch y Apweiler, 2000); Disponibilidad del anticuerpo; se seleccionaron los que tuvieran un precio accesible; que cumplieran con las condiciones anteriores y tuvieran el valor de expresión diferencial mayor.

Entonces se verificaron Grp78, histona H3, Hsp60, HIBADH y ACO2. Se tomó volumen de la cinética de matraces en la fase exponencial (día 3) equivalente a 10^7 células. Para el lisado de células se suspendió el pellet en buffer HEPES (HEPES 10 mM, EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) 1 mM, pH 7.4) más PMSF (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) (1mM) frío y se llevó a cabo un proceso de ruptura mecánico utilizando una jeringa donde se tomó y expulsó la suspensión celular durante 3 min usando una aguja de 21 G x 32 mm. Terminado el proceso de ruptura mecánica se hicieron 3 procesos de congelamiento-descongelamiento.

La concentración de proteína del lisado se determinó mediante el método de Bradford en el formato de microplacas de 96 pocillos usando Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) y albúmina de suero bovino (GE Healthcare Bio-Sciences, EE. UU.) como estándar. El protocolo se siguió acorde las instrucciones del manual del fabricante. El proceso de electroforesis SDS-PAGE al 12% se realizó añadiendo buffer Laemmli (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) a las muestras en una composición final de Tris-HCl 60 mM pH 6.6, complementado con glicerol al 10% (v/v), dodecilsulfato de sodio (SDS) 70 mM, azul de bromofenol 0.2 mM y 2,5% (v/v) de 2-mercaptoetanol. Posteriormente, las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 min. El marcador de peso molecular utilizado fue el Page Ruler Prestained Protein Ladder 26616 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Las muestras se resolvieron en un sistema de electroforesis de proteínas vertical SE260 Mighty Small II Deluxe Mini (Hoefer, Holliston, EE. UU.) a 90 V, utilizando el tampón Tris-glicina pH 8.3 [Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0.1% (p/v)] como tampón de corrida. La transferencia de proteínas se hizo en una membrana de PVDF Immobilon-P Transfer Membranes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) y se llevó a cabo en un sistema de transferencia semi húmedo Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) durante 45 minutos a 0.35 amperes en buffer de transferencia (Tris 20 milimolar (mM), glicina 154 milimolar (mM), SDS al 0.08% [p/v], metanol al 20% [v/v]). Los geles sobrantes del proceso de transferencia se teñieron con Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se destañaron en metanol al 5% (v/v) y ácido acético al 7.5% (v/v). Este proceso de teñido-destañado se realizó ya que los geles se usaron como controles de carga.

Para la identificación de Grp78 e histona H3, las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo 5% (p/v) de leche descremada, 0.05% (v/v) Tween-20 en PBS durante 1 h.

Después del bloqueo, se realizaron 3 lavados en la membrana usando tampón Tween-20 al 0.05% (v/v) en PBS, donde cada lavado duró 10 minutos. Posteriormente, se incubó la membrana con el coctel de anticuerpos Endoplasmic Reticulum Fraction Western Blot Cocktail (Abcam, Cambridge, MA, EUA) diluido 1:2000 veces en BSA al 0.5% (p/v), Tween-20 al 0.05% (v/v) en PBS durante 1 h a temperatura ambiente (TA) con agitación constante. Ya culminado el proceso de incubación con los anticuerpos primarios, se hicieron de nuevo 3 lavados como se describió y, después, se incubó el anticuerpo secundario HRP-conjugated Secondary Antibody Cocktail (Abcam, Cambridge, MA, EUA) diluido 2500 veces en BSA al 0.5% (p/v), Tween-20 al 0.05% (v/v) en PBS, por 1 h a TA, con agitación constante. Ya finalizada la incubación del anticuerpo secundario, se llevaron a cabo nuevamente 3 lavados y, por último, se guardó la membrana en PBS 1X para hacer el proceso de revelación. Para la aconitasa (ACO2), las membranas se bloquearon en tampón de bloqueo 3% BSA (p/v), 0.1% (v/v) Tween-20 en tampón TBS (137 mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.6). Después del bloqueo se lavó la membrana 3 veces usando Tween-20 al 0.1% (v/v) en TBS durante 10 minutos cada lavado. El anticuerpo anti-ACO2 (sc-517651 – Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) se diluyó 1:500 en tampón de bloqueo y se incubó durante toda la noche (12 h) a 4°C con agitación constante. Culminado el periodo de incubación del anticuerpo primario, se llevó a cabo un segundo procedimiento de 3 lavados previo a la incubación del anticuerpo secundario de ratón conjugado a la enzima peroxidasa (Abcam, Cambridge, MA, EUA) diluido 1:10000 en tampón de bloqueo. Se incubó durante 1 h a TA y agitación constante. Posteriormente, se hizo la ronda correspondiente de 3 lavados para guardar la membrana en PBS 1X.

Para HIBADH, las membranas se bloquearon en 5% BSA (p/v), 0.1% (v/v) Tween-20 en tampón TBS. Después del bloqueo se lavó la membrana 3 veces usando Tween-20 al 0.1% (v/v) en TBS durante 10 minutos cada lavado. Posteriormente, se incubó el anticuerpo anti-HIBADH (sc-398288 – Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) diluido 1:800 en BSA al 3% (p/v), Tween-20 al 0.1% (v/v) en TBS, 12 h a 4°C con agitación constante. Nuevamente se lavó la membrana 3 veces y se realizó la incubación del anticuerpo secundario de ratón conjugado a la enzima peroxidasa (Abcam, Cambridge, MA, EUA) que se diluyó 1:10000 en 3% BSA (p/v), 0.1% (v/v) Tween-20 en tampón TBS durante 1 h a TA con agitación constante. Al igual que las proteínas anteriores se hicieron los lavados como se explicó. En el caso de HSP60, las membranas se bloquearon en tampón de bloqueo con 3% leche descremada (p/v), 0.1% (v/v) Tween-20 en tampón TBS. Después del bloqueo se lavó la membrana 3 veces usando Tween-20 al 0.1% (v/v) en TBS durante 10 minutos cada lavado. El anticuerpo anti-HSP60 (GTX110089, GeneTex, CA, EUA) se diluyó 1:10000 en tampón de bloqueo y se incubó 12 h a 4°C con agitación constante. Posteriormente, se lavó la membrana 3 veces se hizo la incubación del anticuerpo secundario de conejo conjugado a la enzima peroxidasa (GeneTex, CA, EUA) que se diluyó 1:2000 en tampón de bloqueo durante 1 h a TA con agitación constante. Previo a guardar la membrana en PBS 1X, se realizó de nuevo una ronda de 3 lavados. Las membranas se revelaron con SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), y las imágenes se adquirieron en un equipo LI-COR C-DiGit Chemiluminescence Western Blot Scanner con el software Image Studio (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA) (Bouzid et al., 2013). Las imágenes de los geles de SDS-PAGE se adquirieron en un equipo Gel Doc EZ imager con el software Image Lab v6.0.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). El software ImageJ v1.52a (National Institutes of Health, EUA) se empleó para el proceso de cuantificación relativa de las imágenes de WB. El enriquecimiento de cada proteína analizada se calculó mediante normalización por proteína total (TPN por sus siglas en inglés) donde primero se calculó el área bajo la curva del pico de intensidad de las bandas en cada WB y, posteriormente, se midió la intensidad acumulada de cada carril de los geles

teñidos en Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) que fueron usados para hacer la transferencia a las membranas de PVDF. Los factores de normalización se calcularon dividiendo el valor de intensidad por carril entre el valor de intensidad del carril de mayor valor o carril de referencia. Por ende, el carril de referencia siempre tiene un factor de normalización de 1.0, y todos los factores de normalización de los demás carriles son relativos al carril de referencia (Aldridge et al., 2008; Thermofisher Scientific, 2020).

$$\text{Factor de normalización por carril} = \frac{\text{Señal o intensidad observada por carril}}{\text{Señal del carril con mayor valor de intensidad}}$$

Posteriormente, se dividió el área bajo la curva del pico de intensidad de cada banda obtenida en los Western blots entre el factor de normalización para corregir los valores de área bajo la curva previamente obtenidos (Aldridge et al., 2008; Thermofisher Scientific, 2020).

$$\text{Señal experimental normalizada} = \frac{\text{Señal o área experimental}}{\text{Factor de normalización}}$$

5.3.2 Validación indirecta de los datos proteómicos por actividad enzimática de la citrato sintasa.

Se tomaron 3.2×10^6 células en días de la fase exponencial (día 3) y en la fase estacionaria (día 4 para la CRL-12445 y día 5 para la CRL-12444). Para su posterior lisado se suspendió el pellet en buffer HEPES (HEPES 10 mM, EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) 1 mM, pH 7.4) más PMSF (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) (1mM) frío y se llevó a cabo un proceso de ruptura mecánico utilizando una jeringa con una aguja de 21 G x 32 mm donde se tomó y expulsó la suspensión celular durante 3 min seguido de tres procesos de congelamiento-descongelamiento. La concentración de proteína de lisado se determinó mediante el método de Bradford. Se prepararon las soluciones stock correspondientes a DTNB (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) (1 mM), Oxaloacetato (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) (10 mM), Acetil Coenzima A (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) (10 mM) y el buffer de reacción Tris (200 mM, pH 8.0) con Triton X-100 (0.2% (v/v)). La composición de la reacción se hizo siguiendo la Tabla 2.

Tabla 2. Componentes con su concentración en la solución madre, volumen y concentraciones finales requeridos para llevar a cabo la medición de actividad de la enzima citrato sintasa.

Componente (concentración)	Volumen (µL)	Concentración final (en la reacción)
Buffer de reacción: Tris (200 mM, pH 8.0) con Tritón X-100 (0.2% (vol/vol)).	500 µL	Tris (100 mM, pH 8.0) con Tritón X-100 (0.1% (vol/vol)).
DTNB (1 mM)	100 µL	0.1 mM
Acetil CoA (10 mM)	30 µL	0.3 mM
Volumen de muestra	X (volumen para una cantidad de proteína específica)	N/A

H2O	320 μ L – Volumen de muestra (X)	N/A
Oxalacetato*	50 μ L	0.5 mM

*El oxalacetato es el último componente al añadirse para iniciar la reacción.

Se usaron 10 μ g de proteína del extracto celular por celda, antes de la adición del OAA se deben medir los cambios de la absorbancia por 5 min y 10 seg por medición a una $\lambda = 412$ nm con la finalidad de medir la actividad endógena de la enzima ya que las células de manera intrínseca poseen OAA. Ya culminada la medición se añade el oxalacetato para iniciar la reacción y se mide su absorbancia durante 10 minutos con cada 10 segundos por medición a una $\lambda = 412$ nm. Las lecturas de absorbancia se hicieron en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 730 Life science UV/Vis (Beckman Coulter, Indianápolis, EUA) (Spinazzi et al., 2012; Eigentler et al., 2020). Las mediciones se por cada matraz (triplicado biológico) y por duplicado técnico.

5.3.3 Análisis estadístico.

La intensidad del análisis de densitometría de los Western Blot y la actividad de la enzima citrato sintasa se compararon entre ambas líneas celulares mediante el uso de la prueba t de Student en Microsoft Excel 2021 (Microsoft, Albuquerque, NM, EE. UU.).

5.4 Relación NAD⁺/NADH y número de mitocondrias de las líneas CRL-12444 y CRL-12445.

5.4.1 Determinación de la relación NAD⁺/NADH.

Se tomaron 5×10^5 células de la cinética de matraces en los días de la fase exponencial (día 3) y en la fase estacionaria (día 4 para la CRL-12445 y día 5 para la CRL-12444). La relación NAD⁺/NADH se determinó mediante el kit NAD/NADH Quantification Kit (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en microplacas de 96 pocillos utilizando espectrofotometría en un equipo Stat Fax(R) 4200 Microplate Reader (Awareness Technologies, Westport, NY, EUA). Las células fueron lavadas con PBS 1X frío previo a la extracción del NAD⁺ y del NADH mediante tampón de extracción NADH/NAD⁺ por un proceso de 2 ciclos de congelación/descongelación de 20 minutos en hielo seco seguido de 10 minutos a TA. Después se centrifugaron las muestras a 14000 x g durante 10 minutos en un tubo de corte de peso molecular (MWCO por sus siglas en inglés) de 3000 Daltons (3 KDa) (Merckmillipore, Darmstadt, Alemania). Para la detección de NADH y NAD⁺ totales o “NADtotal” se transfirieron 50 μ L de muestras extraídas provenientes del sobrenadante y se pusieron por duplicado en una placa de 96 pocillos. Para detectar solo el NADH en la muestra, el NAD⁺ debe descomponerse antes de la reacción. Con este fin se pusieron 200 μ L de las muestras extraídas en tubos de microcentrífuga y se calentaron a 60 °C durante 30 minutos en un “termoblock”. Una vez culminado el tiempo de descomposición de NAD⁺ se enfriaron las muestras en hielo. Se pusieron 50 μ L de muestras descompuestas que solo contienen NADH por duplicado en una placa de 96 pocillos. Para determinar la concentración de NADH y de NAD_{total} de las muestras, se realizó una curva de calibración para la detección colorimétrica usando un estándar de NADH (1 mM) incluido en el kit. Se añadieron los componentes requeridos para realizar la reacción a cada pocillo de las muestras acorde las instrucciones del fabricante y se incubó la placa a temperatura

ambiente durante 2.5 h. Posteriormente se midió la absorbancia a 450 nm. Una vez calculadas las concentraciones de NAD_{total} y de NADH usando la curva estándar, la proporción de $NAD^+/NADH$ en una muestra se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$relación \frac{NAD^+}{NADH} = \frac{NAD_{total} - NADH}{NADH} = \frac{pmol NAD^+}{pmol NADH}$$

NAD_{total} = Concentración de NAD total ($NAD^+ + NADH$) en una muestra desconocida (pmol) determinada por la curva estándar.

NADH = Concentración de NADH en una muestra desconocida (pmol) determinada por la curva estándar.

5.4.2 Extracción y cuantificación de ADN.

Se tomaron 2×10^6 células de la cinética de matraces en los días de la fase exponencial (día 3) y en la fase estacionaria (día 4 para la CRL-12445 y día 5 para la CRL-12444). Posteriormente la suspensión celular se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 5 minutos para sedimentar las células y se guardaron a -20°C hasta su uso posterior. La extracción de ADN se realizó a el kit comercial de Qiagen QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se tomaron 3 muestras en la fase proteómica de crecimiento y 3 muestras en la fase estacionaria para cada línea celular. La cuantificación del ADN extraído se hizo mediante ensayo espectrofotométrico en un equipo NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Las muestras de ADN obtuvieron concentraciones desde 44.9 ng/ μL hasta mayores a 200 ng/ μL . La pureza de las muestras fue mayor a 1.79, de acuerdo a la relación de absorbancia 260/280 (ADN/proteína), lo que indicó que el ADN extraído tiene una pureza óptima para su uso posterior. Para evaluar la integridad del ADN extraído, se corrieron alrededor de 100 ng de cada una de las muestras en un gel de agarosa al 1 %, por 30 min a 80 volts.

5.4.3 Diseño de oligonucleótidos para la qPCR.

Las secuencias de oligonucleótidos diseñados se muestran en la Tabla 3 (MIQE) (Bustin et al. 2009). Se examinaron *in silico* en “Primer Blast Tool” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y en Oligocalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

Los oligonucleótidos diseñados se utilizaron para la cuantificación relativa de ADN mitocondrial (Venegas et al., 2011). Se escogieron los genes de la β -2-microglobulina ($\beta 2m$) y los genes mitocondriales del ARN de transferencia mitocondrial tRNA-Leu(UUR) (denominado como “*mit*”) y el ARN ribosomal 16S mitocondrial (*16smt*) debido a que son regiones donde rara vez se encuentran polimorfismos en el ADN nuclear y en el ADNmt, respectivamente (Venegas et al., 2011). Es importante mencionar que se propuso analizar dos genes mitocondriales con la finalidad de comparar los resultados en lo que concierne a contenido mitocondrial ya que se identificaron un total de 197 variantes que incluyen SNP’s, INDELS y heteroplásmicas en 130 posiciones de nucleótidos individuales en un panel de 22 líneas celulares CHO (Kelly et al., 2017). Por lo tanto, estas variantes podrían generar impacto en la amplificación o en el conteo de mtADN.

La cuantificación del mtDNA es complicada debido a que diferentes tejidos dentro un mismo individuo y el mismo tejido en diferentes individuos pueden contener diferentes cantidades de mtDNA (Bai y Wong, 2005; Dimmock et al., 2010; Venegas et al., 2011). Incluso la edad

del individuo puede ser factor para que aumente o decremente la cantidad de mtDNA en sus mismas células (Bai y Wong, 2005; Dimmock et al., 2010). Por lo tanto, para determinar el contenido de mtDNA en un individuo, se normalizó respecto un gen nuclear de una sola copia, $\beta 2m$ -microglobulina ($\beta 2m$) (Bai y Wong, 2004).

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos para la cuantificación relativa de ADNmt (mitocondrial) utilizadas en este proyecto.

Gen	Secuencia
ARN ribosomal 16S mitocondrial (<i>16smt</i>) de <i>Cricetulus griseus</i>	16smtF 5'- CGA CCT CGA TGT TGG ATC - 3' (18 nt) 16smtR 5'- GGA TTA CTC CGG TCT GAA C - 3' (19 nt)
$\beta 2m$ de <i>Cricetulus griseus</i> (control - gen nuclear)	$\beta 2mF$ 5'- GCG TGT GTA GAC TTG CAC - 3' (18 nt) $\beta 2mR$ 5'- GCA TGG TGT AGA CTG AGA T - 3' (19 nt)
ARN de transferencia mitocondrial tRNA-Leu(UUR) (<i>mit</i>) de <i>Cricetulus griseus</i>	mitF 5'- CGG AGT AAT CCA GGT CGG - 3' (18 nt) mitR 5'- GAA GCG CTT GTG TAA AGG A - 3' (19 nt)

5.4.4 PCR cuantitativa (qPCR).

De cada muestra de ADN se llevó a cabo una dilución de 30 μL a una concentración final de 50 ng/ μL y de este volumen se tomaron 2 μL para una reacción de qPCR, colocando 100 ng de DNA por reacción de 10 μL . Se analizaron los genes *mit*, *16smt* y $\beta 2m$ del triplicado biológico de muestras tomadas durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento de ambas líneas celulares. De cada muestra se llevó a cabo un duplicado técnico y se usó el gen nuclear $\beta 2m$ como gen de referencia o normalizador con la finalidad de determinar el contenido de mtADN usando los genes *mit* y *16smt* de la línea celular CRL-12445 en contraste con la línea celular CRL-12444.

La eficiencia de reacción se analizó para los tres genes, y una vez que se verificó que las eficiencias eran comparables se procedió al análisis de las muestras de ADN previamente extraídas, a partir de las dos líneas celulares. Las muestras extraídas de las dos líneas celulares fueron analizadas por el técnico laboratorista Victoria Medina y la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz mediante qPCR, bajo las condiciones de amplificación que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de amplificación por qPCR para el análisis de los genes *16smt*, *mit* y $\beta 2m$.

Temperatura (° C)	Tiempo	Ciclos
50	10 minutos	---
95	5 minutos	40
95	5 segundos	

58	15 segundos	
<i>Data acquisition</i>		---
60	30 segundos	---
<i>Melt curve 40-95</i>		---
<i>Data acquisition</i>		---
20	10 segundos	---

° C: grados centígrados.

Una vez obtenido el valor de Ct (Cycle Threshold) para cada muestra del gen nuclear de referencia ($\beta 2m$) y los genes de mitocondriales de interés (*mit* y *16smt*), se procedió a determinar la variación de Ct de los genes *mit* y *16smt* respecto al gen nuclear $\beta 2m$ utilizando el método ΔCt , descrito por Venegas et al., (2011).

Donde ΔCt es el diferencia de los valores promedio de Ct provenientes de las tres replicas biológicas del gen $\beta 2m$ (control) y los genes mitocondriales de interés tRNA^{Leu}(UUR) o *mit* y *16smt* ribosomal mitocondrial.

Se calculó el ΔCt para cada línea celular y para cada gen de la siguiente manera:

ΔCt para la línea CRL-12444 del gen *mit* respecto a $\beta 2m$ (variación de *mit* respecto a $\beta 2m$).

$$\Delta Ct_{CRL-12444 (mit)} = Ct_{\beta 2m (CRL-12444)} - Ct_{mit (CRL-12444)}$$

ΔCt para la línea CRL-12444 del gen *16smt* respecto a $\beta 2m$ (variación de *16smt* respecto a $\beta 2m$).

$$\Delta Ct_{CRL-12444 (16smt)} = Ct_{\beta 2m (CRL-12444)} - Ct_{16smt (CRL-12444)}$$

ΔCt para la línea CRL-12445 del gen *mit* respecto a $\beta 2m$ (variación de *mit* respecto a $\beta 2m$).

$$\Delta Ct_{CRL-12445 (mit)} = Ct_{\beta 2m (CRL-12445)} - Ct_{mit (CRL-12445)}$$

ΔCt para la línea CRL-12445 respecto el gen *16smt* respecto a $\beta 2m$ (variación de *16smt* respecto a $\beta 2m$).

$$\Delta Ct_{CRL-12445 (16smt)} = Ct_{\beta 2m (CRL-12445)} - Ct_{16smt (CRL-12445)}$$

Posteriormente, se determinó la relación de mtADN/nADN (ADN nuclear) o también denominado como el número de copias de mtADN en ambas fases de crecimiento (exponencial y estacionaria) para las dos líneas celulares usando ambos genes mitocondriales aplicando la fórmula (Venegas et al., 2011):

$$N^{\circ} \text{ copias de mtADN} = \frac{mtADN}{nADN} = 2 \times 2^{\Delta Ct}$$

Finalmente, se calculó el contenido de mtADN relativo dividiendo el contenido de mtADN de la línea CRL-12445 entre el contenido de mtADN del control, en este caso, la línea CRL-12444 para cada gen de interés (*mit* y *16smt*), mediante la fórmula:

$$\frac{mtADN_{CRL-12445}}{mtADN_{CRL-12444}} = \frac{2 \times 2^{\Delta Ct} (CRL - 12445)}{2 \times 2^{\Delta Ct} (CRL - 12444)}$$

5.4.5 Análisis estadístico.

Los parámetros de número de copias de mtADN se compararon entre ambas líneas celulares mediante el uso de la prueba t de Student en Microsoft Excel 2021 (Microsoft, Albuquerque, NM, EE. UU.).

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización cinética y estequiométrica de las líneas celulares CRL-12444 y CRL-12445.

Los cultivos de ambas líneas celulares se evaluaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de trabajo del 20%, y se inocularon a una concentración inicial de 0.3×10^6 células/mL. La línea CRL-12444, alcanzó una concentración máxima de células a las 120 h de cultivo de $5.041 \pm 0.102 \times 10^6$ células/mL (Figura 10a – curva naranja, Tabla 5). Mientras que la línea CRL-12445 alcanzó una concentración celular máxima de $4.51 \pm 0.132 \times 10^6$ células/mL a las 96 h de cultivo (Figura 10a – curva azul, Tabla 5). Las concentraciones celulares máximas de ambas líneas celulares fueron diferentes significativamente ($P \leq 0.05$). La viabilidad de la línea CRL-12444 se mantuvo alrededor del 98% durante los primeros 4 días de cultivo y, en el quinto día, disminuyó un 10% (Figura 10b – curva naranja). En los cultivos de células CRL-12445 la viabilidad se mantuvo arriba de 97% hasta el cuarto día del cultivo y comenzó su disminución entre las 96 a las 120 h de 98.29% a 80.95% (Figura 10b – curva azul). El cultivo celular de ambas clonas finalizó cuando la viabilidad celular fue menor que 50%.

La línea CRL-12444 presentó una velocidad de crecimiento (μ) de $0.0237 \pm 0.0014 \text{ h}^{-1}$, mientras que la clona CRL-12445 presentó una μ de $0.0183 \pm 0.0005 \text{ h}^{-1}$. Siendo la línea CRL-12444 1.3 veces más rápida en crecer comparada con la línea CRL-12445 (Tabla 5). Las μ de ambas clonas, fueron significativamente diferentes ($P \leq 0.05$). El tiempo de duplicación de las células CRL-12444 fue de $29.31 \pm 1.73 \text{ h}$ y el de las CRL-12445 de $37.83 \pm 1.16 \text{ h}$ (Tabla 5). En este parámetro cinético también existió diferencia significativa entre ambas líneas celulares ($P \leq 0.05$) (Tabla 5).

Los parámetros cinéticos y estequiométricos se muestran en la Tabla 5. Las características metabólicas de ambas líneas se exponen en la Figura 10 (c – f). Las células CRL-12444 mostraron una velocidad específica de consumo de glucosa (qGlc) 1.59 veces mayor y significativamente distinta ($P \leq 0.05$) a la qGlc de CRL-12445. En ambas clonas la fuente de carbono se consumió casi por completo después del octavo día de cultivo (Figura 10c, Tabla 5). En consecuencia, al mayor consumo de glucosa por parte de las células CRL-12444, la velocidad específica de producción de lactato (qLac) fue 1.65 veces ($P \leq 0.05$) mayor que CRL-12445. La producción de lactato se mantuvo estable a partir del día 4 y no existió re-consumo de este metabolito en los días subsecuentes. Además, la línea CRL-12444 mostró un incremento significativo ($P \leq 0.05$) en la velocidad específica de producción de glutamato (qGlu) y de amonio (qNH_4^+) de 2.56 y 2.01 veces, respectivamente, en comparación con la clona CRL-12445 (Figura 10d – e, Tabla 5). La velocidad específica de producción de glutamato (qGlu) y de amonio (qNH_4^+) disminuyó en ambas líneas celulares en los días 4 y 5, respectivamente (Figura 10d – e, Tabla 5), indicando que en la fase estacionaria el consumo de glutamina fue menor que en la fase exponencial. Debido a que la glutamina utilizada está en forma de dipéptido alanil-glutamina el consumo de glutamina no se pudo calcular en el analizador bioquímico ya que solo permite cuantificar la glutamina como aminoácido libre.

La qP del anticuerpo monoclonal anti IL-8 humano fue significativamente distinta ($P \leq 0.05$), siendo aproximadamente 25 veces mayor en las células CRL-12445 comparado con las células CRL-12444 (Tabla 5). El título de anticuerpo en la línea CRL-12445 pasó de 23.05 ± 3.41 a $124.5 \pm 46.41 \text{ ng/mL}$ entre la fase exponencial y la estacionaria, lo que implicaría un aumento de aproximadamente 5.4 ($P \leq 0.05$) veces (Figura 11). Mientras en la línea

CRL-12444 incrementó de 7.59 ± 2.5 a 11.19 ± 2.0 ng/mL el cual no fue estadísticamente significativo ($P > 0.05$) (Figura 11).

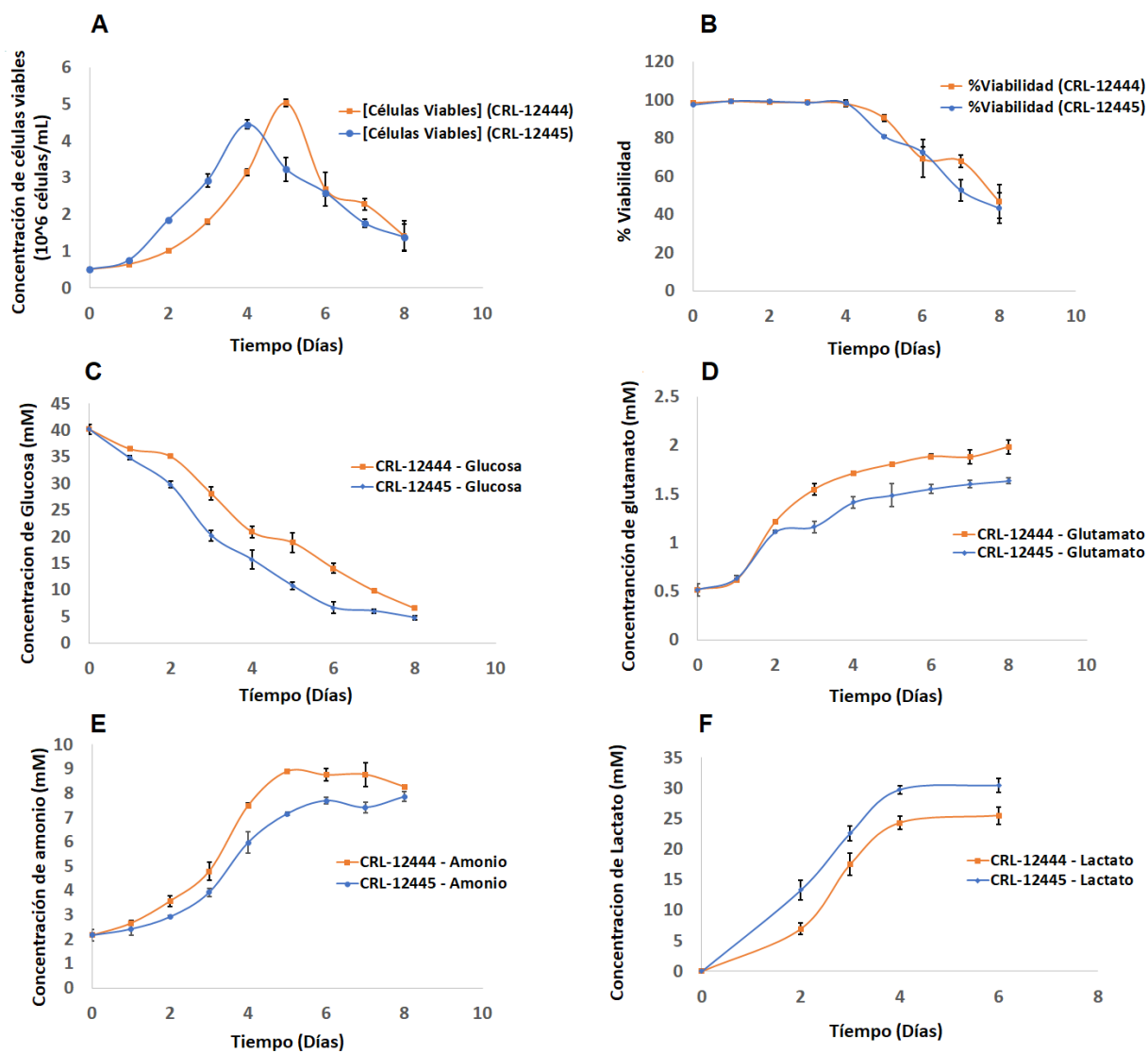


Fig. 10. Cinéticas de crecimiento, conteo de viabilidad y medición de metabolitos. Se determinó la concentración de las células [Células viables] CRL-12444 (curva naranja) y CRL-12445 (curva azul) por el método de exclusión por Azul de tripano en cámara de Neubauer (A). Se calculó el porcentaje de viabilidad de las células CRL-12444 (Curva naranja) y CRL-12445 (Curva azul) por el método de exclusión por Azul de tripano en cámara de Neubauer (B). Se midió la concentración de glucosa (C), glutamato (D) y amonio (E) en el medio de cultivo de células CRL-12444 (curvas naranjas) y CRL-12445 (curvas azules). La desviación estándar se determinó a partir de tres réplicas biológicas.

Tabla 5. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cinética de crecimiento de células CRL-12444 y CRL-12445.

Parámetro	CRL-12444	CRL-12445	Diferencia
μ (h^{-1})*	0.024 ± 0.002	0.018 ± 0.001	1.33 veces
t_d (h)*	29.31 ± 1.73	37.83 ± 1.16	1.3 veces
\bar{X}_{max} (1×10^6 células/mL)*	5.041 ± 0.1	4.45 ± 0.13	1.13 veces
$q_{Glucosa}$ ($\frac{\mu\text{mol}}{10^6 \text{ células} * \text{ día}}$)*	-3.66 ± 0.33	-2.31 ± 0.36	1.59 veces
$q_{Lactato}$ ($\frac{\mu\text{mol}}{10^6 \text{ células} * \text{ día}}$)*	4.46 ± 0.26	2.71 ± 0.28	1.65 veces
$q_{Glutamato}$ ($\frac{\mu\text{mol}}{10^6 \text{ células} * \text{ día}}$)*	0.128 ± 0.01	0.05 ± 0.01	2.56 veces
q_{Amonio} ($\frac{\mu\text{mol}}{10^6 \text{ células} * \text{ día}}$)*	1.01 ± 0.07	0.50 ± 0.05	2.01 veces
q_p ($\frac{10^{-3} \text{ pg}}{\text{ célula} * \text{ día}}$)*	0.55 ± 0.25	13.5 ± 5.7	24.78 ± 2.92 veces

La concentración de células viables y metabolitos en el sobrenadante se determinó por método de exclusión de Azul de Tripano en cámara de Neubauer y el analizador bioquímico Biosystems A15, respectivamente. La concentración del anticuerpo anti-IL8 se determinó por ELISA. La desviación estándar se obtuvo a partir de tres réplicas biológicas y dos duplicados técnicos. Los recuadros en amarillo y los parámetros con asteriscos indican que fueron significativamente diferentes (*: $p < 0.05$, prueba t). μ : Velocidad específica de crecimiento, t_d : Tiempo de duplicación, q : Velocidad específica de consumo (-) o producción (+), q_P : Productividad específica.

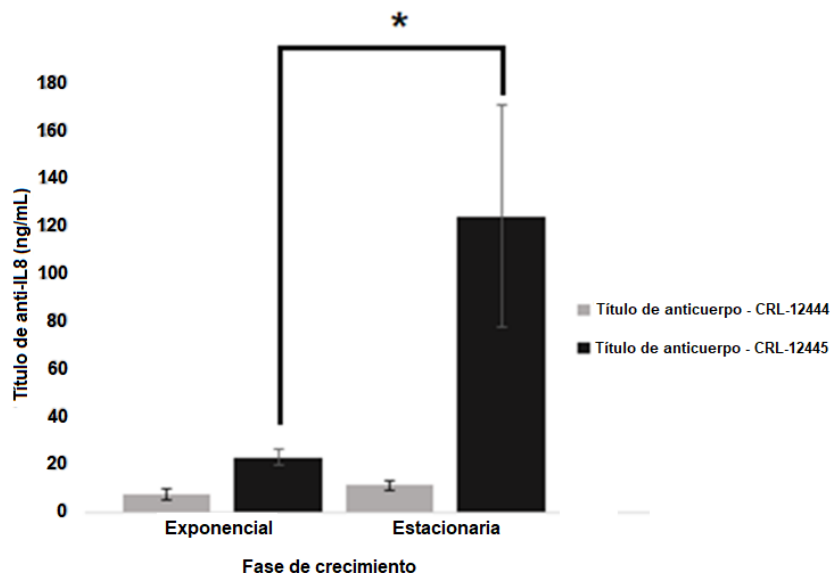


Fig. 11. Título de anticuerpo monoclonal anti IL-8. Se determinó la concentración (ng/mL) de anticuerpo anti-IL8 de las células CRL-12444 (gris) y CRL-12445 (negro) por el método de ELISA. En la línea CRL-12444 no hubo un aumento significativo ($P > 0.05$) de la fase exponencial a la estacionaria mientras que en la línea CRL-12445 hubo una diferencia significativa ($P \leq 0.05$), de 5.4 veces. La desviación estándar se obtuvo a partir de 3 réplicas biológicas y 2 duplicados técnicos. En gris los resultados de la línea CRL-12444 y en negro la clona CRL-12445. Los asteriscos indican las diferencias significativas (*: $p < 0.05$, prueba t).

Al comparar la μ y el tiempo de duplicación (t_d) con los datos obtenidos por Pérez-Rodríguez et al., (2020b) existió una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en ambos parámetros de 1.3 y

1.31 veces para la línea CRL-12444 y de 1.3 y 1.33 veces para la línea CRL-12445, respectivamente, bajo condiciones similares de cultivo (Pérez-Rodríguez et al., 2020b). La concentración celular máxima fue similar ($P > 0.05$) ya que hubo una diferencia no significativa de 1.14 y 1.05 veces en las células CRL-12444 y CRL-12445, respectivamente, comparado con los parámetros obtenidos por Pérez-Rodríguez et al., (2020b) (Tabla 6). En las velocidades de consumo y producción de metabolitos hubo 1.16 y 1.18 veces de diferencia en qGlc, 1.075 y 1.11 veces en qLac, 1.56 y 1.20 veces en qGlu y 1.098 y 1.004 veces en la qNH₄⁺ para las líneas CRL-12444 y CRL-12445, respectivamente, comparando los resultados obtenidos en el presente trabajo y Pérez-Rodríguez et al., (2020b). De estas comparaciones, solo la producción de glutamato entre los resultados de las células CRL-12444 de ambos estudios fueron diferentes estadísticamente ($P \leq 0.05$) (Tabla 6). Aunque la qP presentó una diferencia de 1.34 y 1.26 veces para las células CRL-12444 y CRL-12445, no fue diferente ($P > 0.05$) a los valores obtenidos por Pérez-Rodríguez et al., (2020b) (Tabla 6). De la misma forma, la cantidad de veces de PR que produce la línea CRL-12445 en contraste con la CRL-12444 fue similar ($P > 0.05$) entre los cultivos aquí realizados (24.78 ± 2.92) y los hechos por el grupo previamente (25.6 ± 1.5) (Tabla 7).

Tabla 6. Comparación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las células CRL-12444 y CRL-12445 obtenidos en este proyecto con los medidos por Pérez-Rodríguez et al., (2020b).

Parámetro	CRL-12444	CRL-12445	CRL-12444 (Pérez-Rodríguez et al., 2021)	CRL-12445 (Pérez-Rodríguez et al., 2021)	Diferencia entre valores promedio CRL-12444	Diferencia entre valores promedio CRL-12445
μ (h^{-1})	0.024 ± 0.002	0.018 ± 0.001	0.031 ± 0.002	0.024 ± 0.001	1.31 veces*	1.31 veces*
t_d (h)	29.31 ± 1.73	37.83 ± 1.16	22.6 ± 1.1	28.5 ± 0.7	1.3 veces*	1.33 veces*
\bar{X}_{max} (1×10^6 células/mL)	5.041 ± 0.1	4.45 ± 0.13	5.73 ± 0.57	4.65 ± 0.10	1.14 veces	1.05 veces
$q_{Glucosa}$ ($\frac{\mu\text{mol}}{10^6 \text{células} \cdot \text{día}}$)	-3.66 ± 0.33	-2.31 ± 0.36	-3.17 ± 0.26	-2.72 ± 0.05	1.16 veces	1.18 veces
$q_{Lactato}$ ($\frac{\mu\text{mol}}{10^6 \text{células} \cdot \text{día}}$)	4.46 ± 0.26	2.71 ± 0.28	4.15 ± 0.32	3.00 ± 0.15	1.075 veces	1.11 veces
$q_{Glutamato}$ ($\frac{\mu\text{mol}}{10^6 \text{células} \cdot \text{día}}$)	0.128 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.06 ± 0.01	1.56 veces*	1.2 veces
q_{Amonio} ($\frac{\mu\text{mol}}{10^6 \text{células} \cdot \text{día}}$)	1.01 ± 0.07	0.50 ± 0.05	0.92 ± 0.06	0.50 ± 0.03	1.098 veces	1.004 veces
q_p ($\frac{10^{-3} \text{ pg}}{\text{célula} \cdot \text{día}}$)	0.55 ± 0.25	13.5 ± 5.7	0.41 ± 0.05	10.68 ± 0.65	1.34 veces	1.26 veces

La concentración de células viables y metabolitos en el sobrenadante se determinó por método de exclusión de Azul de Tripano en cámara de Neubauer. La concentración del anticuerpo anti-IL8 se determinó por ELISA. La desviación estándar se obtuvo a partir de 3 réplicas biológicas en el caso de Pérez-Rodríguez et al., (2020b) y a partir de 3 réplicas biológicas y por duplicado técnico en esta tesis. μ : Velocidad específica de crecimiento, t_d : Tiempo de duplicación, q : Velocidad específica de consumo (-) o producción (+), qP : Productividad específica. Los recuadros en amarillo y con asteriscos indican parámetros que fueron significativamente diferentes (*: $p < 0.05$, prueba t).

Tabla 7. Comparación de las relaciones de qP de la línea CRL-12445 en contraste con la CRL-12444 determinadas en este proyecto y por Pérez-Rodríguez et al., (2020b).

Parámetro	Este estudio	(Pérez-Rodríguez et al. 2021)	Diferencia entre valores promedio
$\frac{q_{p45} \left(\frac{pg}{\text{célula} \cdot \text{día}} \right)}{q_{p44} \left(\frac{pg}{\text{célula} \cdot \text{día}} \right)}$	24.78 ± 2.92	25.6 ± 1.5	3.3%

La concentración del anticuerpo anti-IL8 se determinó por ELISA. La desviación estándar se obtuvo a partir de tres réplicas biológicas en el caso de Pérez-Rodríguez et al., (2020b) y a partir de tres réplicas biológicas y dos duplicados técnicos en esta tesis. qP : Productividad específica. No hubo diferencia significativa entre ambas relaciones (*: $p < 0.05$, prueba t).

6.2 Discusión sobre caracterización cinética y estequiométrica de ambas líneas celulares.

En este estudio se determinó que la μ de la línea CRL-12444 fue mayor que la de la línea CRL-12445 ($P \leq 0.05$). También que la línea de menor productividad alcanzó una mayor concentración máxima de células ($P \leq 0.05$) que la de mayor productividad. Estos resultados pueden indicar que la línea de menor productividad utiliza sus recursos para promover su crecimiento en lugar de redirigirlos para producir PR. En contraste, la línea CRL-12445 genera mayor PR ($P \leq 0.05$) a costo de su crecimiento. Este comportamiento de la línea de mayor productividad se ha observado en otros estudios donde evalúan clones con productividad diferencial (Nissom et al., 2006; Meleady et al., 2011; Orellana et al., 2015; Vergara et al., 2018) o comparan clones parentales con las transfectadas para producir alguna PR (Yusufi et al., 2017).

En diversos estudios se ha evaluado el crecimiento de la línea CRL-12445. Sin embargo, los parámetros determinados en esta tesis difieren de los encontrados en la literatura (Beckmann et al., 2011; Klausning et al., 2011; Heinrich et al., 2011; Wipperman et al., 2014; Wipperman et al., 2015; Coleman et al., 2019; Capella et al., 2019; Strasser et al., 2021). Es posible que la variación en los parámetros cinéticos y en la productividad específica se deba a que se usaron diferentes medios de cultivo y formas de cultivo, incluyendo cultivos en suspensión o cambios en la temperatura, agitación, pH y osmolaridad del medio, %CO₂, y humedad (Beckmann et al., 2011; Klausning et al., 2011; Heinrich et al., 2011; Wipperman et al., 2014; Wipperman et al., 2015; Coleman et al., 2019; Capella et al., 2019; Strasser et al., 2021).

En lo que respecta al consumo de glucosa, se determinó que la línea CRL-12444 posee una mayor q_{Glc} que la línea CRL-12445 ($P \leq 0.05$). Adicionalmente, las células CRL-12444 tuvieron mayor velocidad de producción de lactato (q_{Lac}), lo que sugeriría que la fuente de carbono se canaliza hacia una mayor generación de este metabolito de desecho en lugar de generar energía para producción de PR. Dicho comportamiento indicaría un mayor efecto Warburg en las líneas de menor productividad (Locasale y Cantley, 2011; Bender y Martinou, 2016; Kunji y Lytovchenko, 2017). La energía de la glucólisis exacerbada favorece un aumento de la biomasa (Le et al., 2012; Toussaint et al., 2016) o viabilidad (Buchsteiner et al., 2018) como se mostró en los resultados de la línea CRL-12444. En algunos estudios se ha demostrado que un flujo glucolítico moderado es capaz de promover un metabolismo orientado al ciclo de Krebs y a un mayor funcionamiento de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa en células de alta productividad de PR (Kim y Lee, 2006; Le et al., 2012; Young, 2013; Konakovsky et al., 2016; Toussaint et al., 2016; Buchsteiner et al., 2018).

Aunque no pudo medirse la glutamina debido a su característica de dipéptido, la línea CRL-12445 mostró q_{Glu} y $q_{NH_4^+}$ menores que los registrados para la línea CRL-12444, lo que podría indicar que la línea CRL-12445 consume menor cantidad de glutamina durante la fase de crecimiento exponencial que la línea CRL-12444. Por lo tanto, es posible que el abastecimiento de metabolitos promovida por la glutaminólisis para la función de ciclo de Krebs esté contribuyendo a la formación de citrato y, en consecuencia, de lípidos para promover mayor generación de biomasa en la fase del crecimiento en la línea CRL-12445 en lugar de utilizar la energía para producir PR. Por otra parte, es posible que la línea CRL-12444 use la glutaminólisis solo para promover su crecimiento, ya que no hubo cambios en sus niveles de productividad entre las fases exponencial y estacionaria (Pereira et al., 2018; Ozturk et al., 1992; Schneider, 1996; Gawlitzek et al., 2000; Yang y Butler, 2002; Fan et al., 2014). Dado que el alto consumo de glutamina genera amonio que disminuye el crecimiento

celular, la productividad volumétrica, la calidad (glicosilación) de la PR de interés y desencadena procesos apoptóticos (Wagner, 1997; Altamirano et al., 2006; Altamirano et al., 2013), si esta vía se regula a la baja se evitan estos efectos adversos y que podrían afectar la productividad y la calidad de la PR producida por la línea CRL-12445.

La comparación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de este estudio con los de Pérez-Rodríguez et al., (2020b) mostró que la mayoría fueron similares ($P > 0.05$). El hecho que la μ y el tiempo de duplicación fueran diferentes entre ambos estudios ($P \leq 0.05$) puede ser un escenario probable ya que se ha reportado que en bancos de células CHO con diferentes generaciones provenientes de 22 clonas derivadas de un parental, la μ tiende aumentar linealmente entre las generaciones 50 y 200, mientras que durante las primeras 40 generaciones la μ puede mostrar heterogeneidad (Fernández-Martell et al., 2017). Esto puede concordar con lo obtenido en este proyecto y el trabajo de Pérez-Rodríguez et al., (2020b) cuya diferencia fue de 8 generaciones. Un estudio determinó que no hubo heterogeneidad significativa en el consumo de glucosa y glutamina y la producción de lactato durante la fase exponencial entre subclonas con diferentes generaciones (Fernández-Martell et al., 2017). Estos resultados de caracterización metabólica son congruentes con los obtenidos ya que no existió diferencia en los parámetros estequiométricos a pesar de las diferencias de generaciones entre bancos. Es importante destacar que el comportamiento de las curvas de consumo y producción de metabolitos fue casi idéntico entre esta tesis y el estudio de Pérez-Rodríguez et al., (2020b). Ambos estudios concuerdan con los datos de Fernández-Martell et al., (2017) ya que los subclonas mostraron en la fase estacionaria un consumo de glutamina nulo y no existió re-consumo de lactato. En el caso de la qP no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre ambos estudios y esto podría deberse a que los patrones de consumo y producción de los metabolitos fueron similares. Acorde a los resultados, se reportó que no existió diferencia significativa en la productividad de subclonas con μ diferentes en células CHO que secretan un anticuerpo monoclonal durante 40 pases (Doolan et al., 2013). En otro estudio de células CHO productoras de anticuerpos se determinó que la qP no mostró un cambio significativo después de 45 generaciones, en células estables mientras que se redujo 79% después de 52 generaciones en células no estables (Kim et al., 2011). Debido que no hubo diferencias en las cinéticas de crecimiento y las características metabólicas y de productividad en entre las líneas celulares de ambos estudios, se usaron estos bancos para los análisis posteriores.

6.3 Toma de muestras.

Durante la cinética de crecimiento se tomaron las muestras para llevar a cabo los experimentos posteriores. En el día 3 de la fase exponencial, Pérez-Rodríguez et al., (2020b) llevaron a cabo la toma de muestras para la proteómica subcelular, por ende, en este trabajo, durante el mismo día se realizó la recolección de muestras para evaluar la actividad enzimática de la citrato sintasa, determinar el estado redox $NAD^+/NADH$, cuantificar ADN mitocondrial mediante qPCR y para la validación del análisis proteómico mediante Western Blot. A excepción del experimento de la validación mediante Western Blot, se llevaron a cabo las mismas evaluaciones durante la fase estacionaria con la finalidad de contrastar los estados metabólicos de las células entre ambas fases. De cada triplicado de matraces, se tomó una muestra para cada experimento. También se tomaron muestras de medio para determinar el título de anticuerpo anti-IL8 de ambas líneas celulares (Figura 11). En la Figura 12, se muestra un diagrama que indica la toma de muestras durante ambas fases de crecimiento. En flechas negras las

correspondientes a la fase exponencial y en flechas verdes las concernientes a la fase estacionaria o el punto de concentración celular máxima.

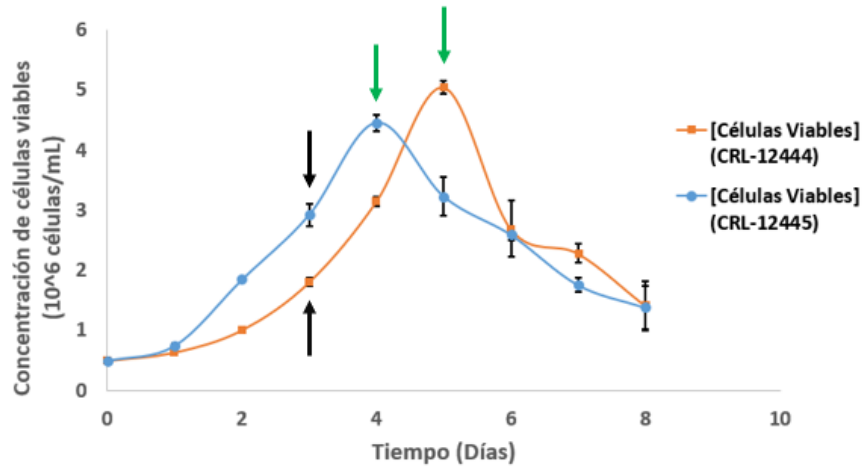


Fig. 12. Toma de muestras para experimentos posteriores durante la cinética de crecimiento de las líneas CRL-12444 y CRL-12445. Las flechas negras y verdes indican la toma de muestras durante la fase exponencial y estacionaria, respectivamente. En ambas fases de crecimiento se hizo análisis de actividad enzimática de la citrato sintasa, medición del estado redox $NAD^+/NADH$, cuantificación del título de anticuerpo anti-IL8 y cuantificación de ADN mitocondrial. La única diferencia fue que en la fase exponencial (día 3) se hizo la toma de muestras para la validación del análisis proteómico mediante Western Blot. En el día 3, Pérez-Rodríguez et al., (2020b) llevaron a cabo la toma de muestra para realizar el fraccionamiento subcelular y la proteómica subcelular. CRL-12444 (Curva naranja) y CRL-12445 (Curva azul). La toma de muestras se llevó a cabo en los 3 matraces de la cinética de cada línea celular (tres réplicas biológicas).

6.4 Identificación de las proteínas diferenciales asociadas al metabolismo energético mitocondrial entre las líneas CRL-12444 y CRL-12445.

6.4.1 Las proteínas relacionadas en el metabolismo energético mitocondrial se encontraron reguladas a la baja en las células de mayor productividad.

Después del proceso de filtrado de contaminantes y de revisar los datos crudos de intensidad de todas las fracciones (B1 – B9) y el citosol (Figura 6), se identificaron 5009 proteínas que fueron alineadas al proteoma de CHO (UP000001075). Ya culminado el análisis de expresión diferencial con un cambio en la expresión de al menos 2 veces ($FC \geq 2$) y un $FDR \leq 0.05$ se obtuvieron dos listas de proteínas diferenciales. Usando DEP se detectaron, para la fracción mitocondrial (bandas o fracciones B4 – B6), 34 proteínas expresadas a la baja y 48 sobreexpresadas en la banda #4, 137 a la baja y 27 al alza en la banda #5 y 88 expresadas a la baja y 40 sobreexpresadas para la banda #6. Usando Normalyzer + DEP se detectaron, para la fracción mitocondrial, 32 proteínas expresadas a la baja y 51 al alza en la banda #4, 135 a la baja y 27 sobreexpresadas en la banda #5 y 99 expresadas a la baja y 34 al alza en la banda #6. Para ilustrar las bandas o fracciones correspondientes a la fracción mitocondrial con su respectiva composición se muestra la Figura 13.

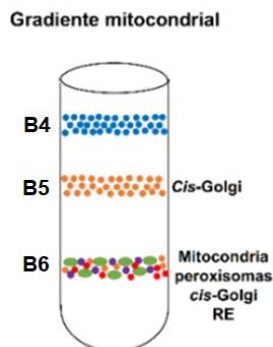


Fig. 13. Bandas o fracciones (B4 – B6) correspondientes al gradiente mitocondrial obtenidas por centrifugación diferencial e isopícnica de homogenizados de células CHO (Tomado de Pérez-Rodríguez et al., 2020b). La composición subcelular de las bandas se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) y Western blot (WB). Nota: La composición se nombró determinando los orgánulos que se encontraron en mayor proporción en los resultados de la microscopía y el WB. RE: Retículo endoplásmico; B: Banda.

Se hizo un análisis de convergencia entre las listas de proteínas diferenciales ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) obtenidas por los dos métodos y se determinó, para la fracción mitocondrial, que en el caso de la banda #4 coincidieron 13 proteínas a la baja y 22 al alza. Para la banda #5 convergieron 72 y 17 a la baja y al alza, respectivamente. En la banda #6 coincidieron 21 proteínas expresadas a la baja entre las dos metodologías empleadas y 5 sobreexpresadas. Los datos finales de convergencia se representan en la Figura 14.

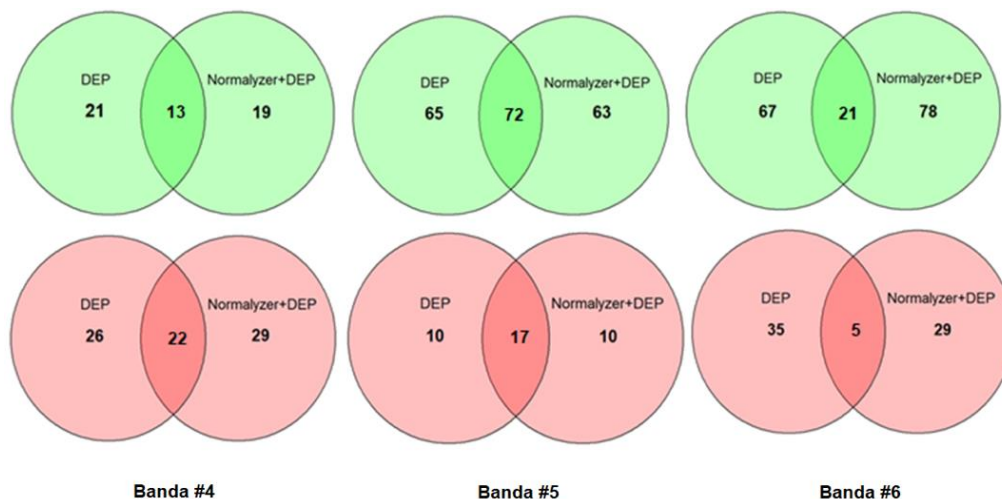


Fig. 14. Diagramas de Venn (R Core Team, 2020) de la cantidad de proteínas diferenciales ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) que convergieron entre DEP y Normalyzer + DEP en la fracción mitocondrial (Bandas B4 – B6). Los diagramas en rojo y verde representan el número de marcadores expresados diferencialmente al alza y a la baja, respectivamente, en la línea CRL-12445 respecto a los de la línea CRL-12444. La composición de las bandas se explica en las Figuras 6 y 12.

Los diagramas de Venn de los análisis de convergencia para las fracciones microsomal, nuclear y el citosol se muestran en el Anexo 1 (Figuras 1, 2 y 3) ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$). En el Anexo 2 (Figuras 1, 2 y 3) se exponen mapas de calor para cada una de las bandas de la fracción mitocondrial con las proteínas que convergieron entre ambas metodologías con sus respectivas veces de cambio ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$). Se optó por usar DEP para el análisis de expresión diferencial ya que el software está diseñado para el procesamiento y análisis de datos de MaxQuant, en contraste con ROTS y SAM. Al ser un programa informático con estas características y con sus propios algoritmos de imputación, normalización y enriquecimiento diferencial sin la necesidad de una previa manipulación de

la estructura de datos, se consideró como la mejor opción para el análisis (Smits, A. 2020). Las proteínas expresadas diferencialmente ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) que convergieron entre las metodologías se utilizaron para los análisis de ontología mediante ShinyGo y DAVID.

6.4.2 Los términos GO muestran un enriquecimiento de proteínas diferenciales mitocondriales y del metabolismo energético.

Después del análisis de convergencia, se realizó la ontología empleando los paquetes ShinyGO y DAVID. Esto porque se ha documentado que algunas bases de datos de anotaciones no actualizan su información de manera regular, por ende, una cantidad importante de estudios han subestimado la importancia funcional de sus listas de genes o proteínas diferenciales (Wadi et al., 2016; Wu et al., 2021). Un estudio indicó que el 42 % de las herramientas estaban desactualizadas por más de 5 años y que la importancia funcional se subestimó severamente (Wadi et al 2016; Wu et al., 2021). Por lo anterior, se propuso utilizar dos algoritmos con la finalidad de ver el consenso de sus respectivos análisis de ontología y clasificación GO, ya que ShinyGO es un programa de anotación más reciente que DAVID. Cada grupo de proteínas diferenciales ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) a la baja y al alza de las bandas (B6 – B9) provenientes de la fracción mitocondrial, se analizaron por ontología. Se determinó la localización subcelular de las proteínas diferenciales con el objetivo de obtener datos del enriquecimiento de proteínas mitocondriales. También se llevó a cabo el análisis ontológico de proceso biológico con la finalidad de ver qué rutas o procesos relacionados al metabolismo energético mitocondrial están enriquecidos en los marcadores expresados de manera diferencial. Los resultados de ontología de cada algoritmo se exponen en las Figuras 15 y 16.

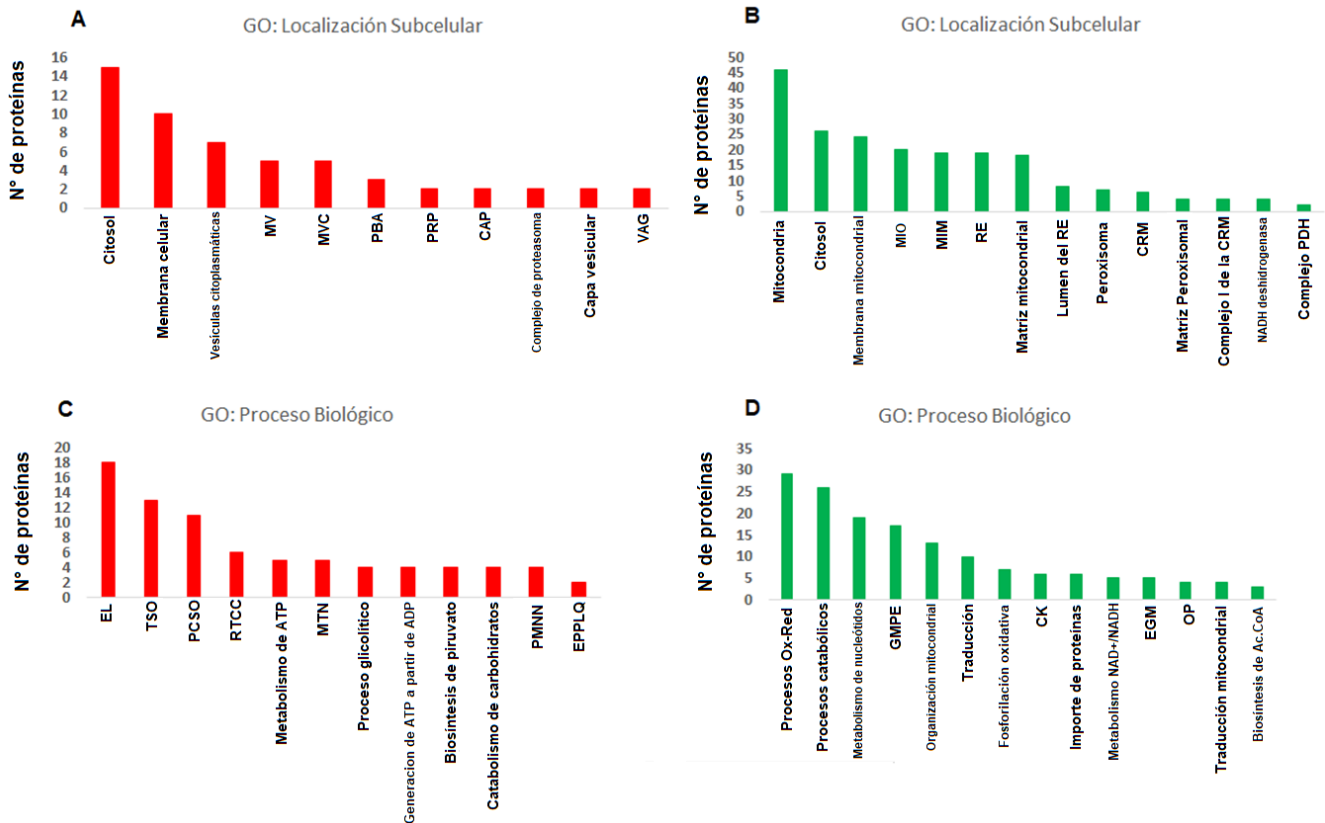


Fig. 15. Análisis de ontología de las proteínas diferenciales ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) de la línea CRL-12445 respecto a la CRL-12444 mediante ShinyGO (Ge et al., 2019). Las proteínas que convergieron entre ambas metodologías de análisis empleadas en este estudio expresadas al alza (A y C – en rojo) y disminuidas (B y D – en verde) se clasificaron con base en Localización subcelular (A y B) y por Proceso biológico (C y D). El eje Y consiste en el número de proteínas asociadas al proceso biológico o a la localización subcelular (eje X). MV: Membrana vesicular; MVC: Membrana vesicular citoplasmática; PBA: Proyección celular basada en actina; PRP: Partícula reguladora del proteasoma; CAP: Complejo accesorio de proteasoma; VAG: Vesículas asociadas a Golgi; MIO: Membrana interna de organelos; MIM: Membrana interna mitocondrial; RE: Retículo endoplásmico; CRM: Cadena respiratoria mitocondrial; PDH: Piruvato deshidrogenasa; EL: Establecimiento de localización; TSO: Transporte de sustancias orgánicas; PCSO: Proceso catabólico de sustancias orgánicas; RTCC: Regulación del tamaño del componente celular; MTN: Metabolismo del trifosfato de nucleósido; PMNN: Proceso metabólico del nucleótido de nicotinamida; EPPLQ: Regulación positiva de la producción del ligando 2 de quimiocinas (motivo C-X-C). Ox – Red: Proceso de oxidación-reducción GMPE: Generación de metabolitos precursores y energía. CK: Ciclo del ácido tricarbóxico o ciclo de Krebs; EGM: Expresión de genes mitocondriales; OP: Organización de peroxisomas; Ac.CoA: Acetil coenzima A.

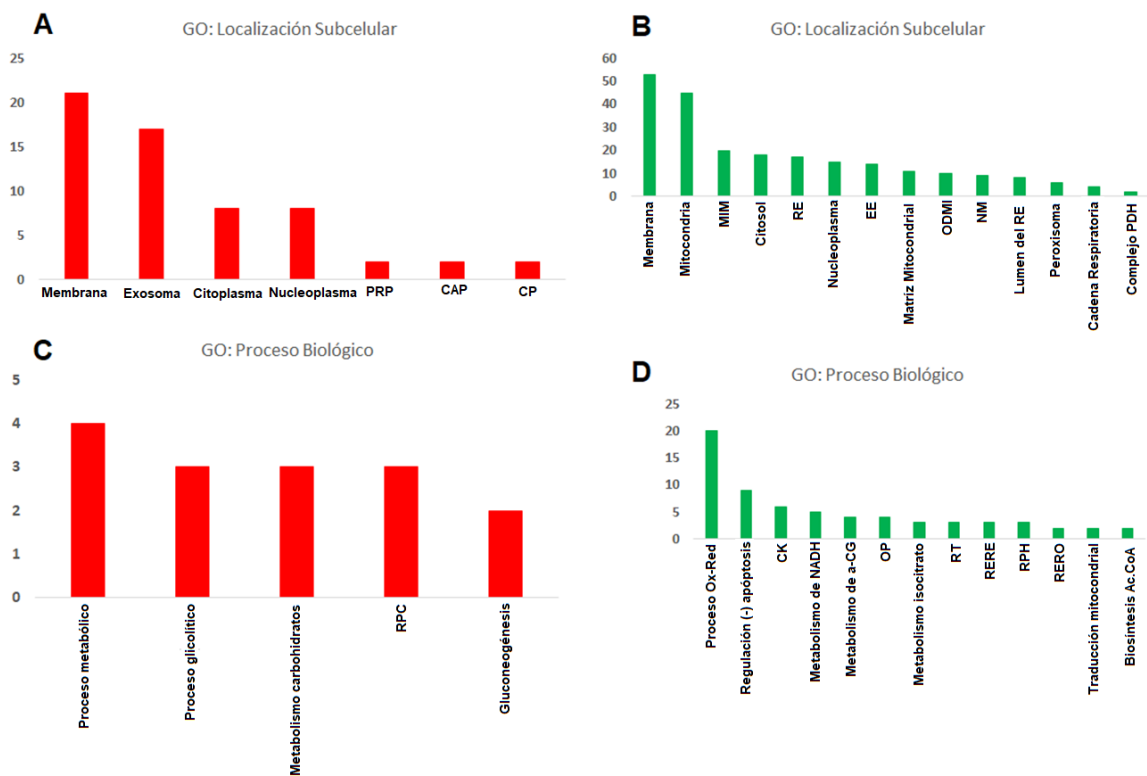


Fig. 16. Análisis de ontología de las proteínas diferenciales ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) de la línea CRL-12445 respecto a la CRL-12444 mediante DAVID (Dennis, G. et al., 2003). Las proteínas que convergieron entre ambas metodologías de análisis empleadas en este estudio expresadas al alza (A y C – en rojo) y disminuidas (B y D – en verde) se clasificaron con base en la Localización subcelular (A y B) y por Proceso biológico (C y D). El eje Y consiste en el número de proteínas asociadas al proceso biológico o a la localización subcelular (eje X). PRP: Partícula reguladora del proteasoma; CAP: Complejo accesorio de proteasoma; CP: Complejo de proteasoma; MIM: Membrana interna mitocondrial; RE: Retículo endoplásmico; EE: Espacio extracelular; ODMI: Organelos delimitados por membrana intracelular; NM: Nucleoide mitocondrial; PDH: Complejo piruvato deshidrogenasa; RPC: Regulación de la proliferación celular; Ox – Red: Proceso de oxidación-reducción; Regulación (-) apoptosis: Regulación negativa de la apoptosis; CK: Ciclo del ácido tricarbóxico o ciclo de Krebs; α -CG: proceso metabólico de α -cetoglutarato; OP: Organización de peroxisomas; RT: Regulación de la traducción; RERE: Respuesta al estrés del retículo endoplásmico; RPH: Respuesta al peróxido de hidrógeno; RERO: Respuesta a especies reactivas de oxígeno. Ac.CoA: Acetil coenzima A.

Los grupos diferenciales expresados a la baja ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) asociados como “Proceso biológico” y relacionados con la producción de energía celular fueron: procesos de oxido-reducción, procesos catabólicos, generación de metabolitos precursores y energía, fosforilación oxidativa, ciclo de los ácidos tricarbóxicos, procesos metabólicos

relacionados con NAD⁺/NADH y procesos de biosíntesis de Acetil CoA en el caso de Shiny GO.

Con DAVID se obtuvieron: procesos de oxido-reducción, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, procesos metabólicos relacionados con NADH, metabolismo del 2-oxoglutarato, metabolismo de isocitrato y procesos de biosíntesis de Acetil CoA. El análisis de ontología de ambos softwares mostró que el metabolismo energético en las células CRL-12445 podría estar reprimido durante la fase exponencial de crecimiento en contraste con la línea CRL-12444. En el caso de los marcadores sobreexpresados, algunos de los términos ontológicos están relacionados a glucólisis y metabolismo de carbohidratos. En el análisis de ontología de las proteínas diferenciales por “Componente celular”, en las proteínas expresadas a la baja, las mitocondrias y algunos de sus subcomponentes como la matriz mitocondrial y la cadena de transporte de electrones se encontraron enriquecidos en ambos programas informáticos. Este resultado indica que el fraccionamiento subcelular aumentó la resolución del estudio ya que la fracción analizada fue la mitocondrial. En las proteínas expresadas al alza (FC ≥ 2, FDR ≤ 0.05) se encontraron pertenecientes al citosol y otros organelos relacionados a vesículas. Los resultados de “Componente celular” contrastan con los obtenidos en “Proceso biológico” ya que varios marcadores de glucólisis se encontraron en los términos ontológicos y dicho proceso catabólico se lleva a cabo en citosol, compartimento que también destacó en el análisis de ontología.

6.4.3 La cobertura del estudio proteómico subcelular es mayor que los enfocados en célula completa de células CHO.

Para analizar la cobertura de proteínas mitocondriales que se detectaron del número total del proteoma, se hizo la búsqueda de la localización subcelular de las proteínas detectadas en los datos crudos de Maxquant mediante MetazSecKB (Meinken et al., 2015). A partir de la lista obtenida, se identificaron los marcadores proteicos que pertenecían a la mitocondria (Tabla 8). Los porcentajes de cobertura se enlistan a continuación:

- Proteínas totales del proteoma de CHO (UP000001075) → 24442
- Proteínas totales mitocondriales del proteoma de CHO (UP000001075) → 1266
- Proteínas totales detectadas del fraccionamiento mediante espectrometría de masas (incluyendo todas las fracciones) → 5009
- Proteínas mitocondriales detectadas del fraccionamiento mediante espectrometría de masas (incluyendo todas las fracciones) → 410
- Proteínas mitocondriales detectadas solo en la fracción mitocondrial → 236

Tabla 8. Porcentajes de cobertura en el análisis proteómico de la fracción mitocondrial.

Descripción	Cálculo	Porcentaje de cobertura
Porcentaje de representación de las proteínas mitocondriales totales en el proteoma CHO (UP000001075).	1266/24442	5.18%
Porcentaje de cobertura del análisis proteómico total.	5009/24442	20.5%
Porcentaje de proteínas mitocondriales detectadas en el análisis proteómico total.	410/5009	8.19%
Porcentaje de cobertura de las proteínas mitocondriales detectadas en el análisis proteómico total respecto a las proteínas identificadas como mitocondriales en el proteoma CHO (UP000001075).	410/1266	32.38%
Porcentaje de cobertura de las proteínas mitocondriales detectadas en la fracción mitocondrial respecto a las identificadas en el proteoma CHO (UP000001075).	236/1266	18.64%

Nota: Los valores obtenidos se estimaron usando MetazSecKB como predictor de localización subcelular de las proteínas.

Con los datos de MetazSecKB se determinó la cobertura de las proteínas mitocondriales totales respecto al proteoma CHO (UP000001075), obteniendo alrededor de un 5.2% y demostrando la baja representación de las proteínas mitocondriales. Posteriormente, se calculó el porcentaje de cobertura general, incluyendo los datos de intensidad de las fracciones nuclear, mitocondrial y microsomal además de citosol y se revisó la proporción de las proteínas detectadas entre las proteínas totales pertenecientes al proteoma CHO (UP000001075), obteniendo un porcentaje de cobertura del 20.5%. Después se calculó el porcentaje de cobertura de las proteínas mitocondriales detectadas en el análisis proteómico total y de la fracción mitocondrial respecto a las proteínas mitocondriales del proteoma CHO (UP000001075) obteniendo una cobertura de 32.38 y 18.64%, respectivamente. La cobertura general de los estudios de célula completa oscila de 0.163 a 11.45% (Tabla 9) (Van-Dyk et al., 2003; Nissom et al., 2006; Baik et al., 2006; Pascoe et al., 2007; Meleady et al., 2008; Carlage et al., 2009; Meleady et al., 2011; Ho, 2013; Kang et al., 2014; Orellana et al., 2015; Liu et al., 2015; Sommeregger et al., 2016; Hausmann et al., 2018; Xu et al., 2019), mientras que el análisis proteómico subcelular empleado en este proyecto fue de 20.5% alcanzando alrededor del doble de la cobertura que los estudios de célula completa.

Tabla 9. Comparación de porcentajes de cobertura de estudios proteómicos de célula completa comparados con los obtenidos en este estudio y por Pérez-Rodríguez et al., (2020b).

Referencia	Línea celular CHO	N° proteínas detectadas	% Cobertura total basado en el proteoma de UNIPROT
Nissom et al., 2006	CHO/ <i>dhfr</i> -	392 proteínas	392/24442 = 1.6%
Meleady et al., 2008	CHO DUKX	1589 spots de proteína convergieron entre los geles	1589/24442 = 6.5%
Carlage et al., 2009	CHO DG44/ <i>dhfr</i> -	392 proteínas	392/24442 = 1.6%
Ho et al., 2013	CHO-BRI - subtipo de DXB11-CHO/ <i>dhfr</i> -	Se seleccionaron 86 spots de proteína y un total de 52 se identificaron.	52/24442 = 0.212%
Kang et al., 2013	17 diferentes líneas celulares CHO	939 proteínas se identificaron con dos péptidos o más.	939/24442 = 3.84%
Orellana et al., 2016	(CHOZN GS-/-)	IDA = 714 iTRAQ = 1906 638 convergieron entre ambas metodologías	714/24442 = 2.92% 1906/24442 = 7.8% 638/24442 = 2.61%
Pascoe et al., 2007	DUKX B11 (DHFR -)	216 proteínas	216/24442 = 0.8837%
Van et al., 2003	CHO-K1	27 proteínas	27/24442 = 0.11%
Baik et al., 2006	DUKX-B11 <i>dhfr</i> -	De 60 spots de proteína, 40 se identificaron.	40/24442 = 0.163%
Meleady et al., 2011	CHO K1	824 proteínas para el par A de líneas celulares. 1028 para el par B de líneas celulares. (En los 36 geles)	824/24442 → Par de líneas A = 3.37% 1028/24442 → Par de líneas B = 4.21%
Liu et al., 2015	CHO-DG44	2800 proteínas se identificaron con al menos dos péptidos.	2800/24442 = 11.45%
Xu et al., 2019	CHO DG44	646 proteínas	646/24442 = 2.64%
Pérez-Rodríguez et al., 2020b	CRL-12444 y CRL-12445.	4952	4952/24442 = 20.26%
Este estudio	CRL-12444 y CRL-12445.	5009	5009/24442 = 20.49%

El cálculo de cada porcentaje se llevó a cabo usando como referencia la cantidad de proteínas identificadas del proteoma CHO (UP000001075) y el software MetazsecKB.

Solo en dos estudios se expusieron la cantidad de proteínas pertenecientes a diferentes organelos (Carlage et al., 2009; Xu et al., 2019). El grupo de Carlage et al., (2009) detectaron 352 proteínas en el control y 34 pertenecieron a mitocondria, mientras que de las 339 proteínas detectadas en la clona de alta producción 31 fueron mitocondriales, lo que representa un 9.66 y 9.14% del total de proteínas detectadas, respectivamente. Otro trabajo reportó 646 proteínas, de las cuales 39 pertenecieron a mitocondria y que representaría un 6% del total de proteínas detectadas (Xu et al., 2019). En el presente trabajo detectamos 5009 proteínas y 410 pertenecieron a la mitocondria, mientras que solo en la fracción mitocondrial se detectaron 236 proteínas mitocondriales, lo que correspondería a un 8.19 y un 4.71%, respectivamente. El análisis mostró de 6.1 a 7.5 veces más proteínas mitocondriales solo en la fracción mitocondrial del estudio proteómico subcelular que en los dos estudios proteómicos de célula completa de la literatura. En la

Figura 17, se muestra la comparación de la composición proteica subcelular de los estudios de Carlage et al., (2009), Xu et al., (2019) con los resultados de esta tesis.

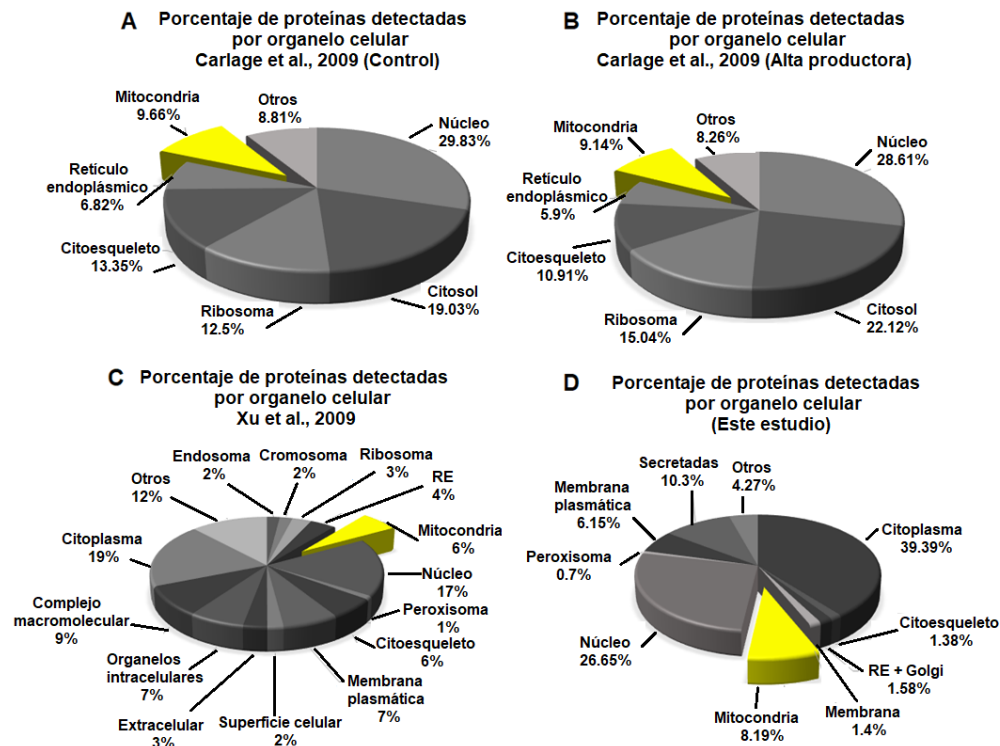


Fig. 17. Localización subcelular de las proteínas identificadas en los estudios proteómicos de células CHO de Carlage et al., (2009) (A y B), Xu et al., (2019) (C) y el presente estudio (D). En escala de grises se encuentran los porcentajes pertenecientes a proteínas de organelos diferentes a las mitocondrias, en contraste, en amarillo se remarcan los porcentajes pertenecientes a las proteínas mitocondriales.

La comparación entre procedimientos (Figura 17) mostró que la estrategia de fraccionamiento subcelular previa a la proteómica, incrementó el número de blancos diferenciales. Por ello, la proteómica subcelular puede constituir una alternativa eficiente a la proteómica clásica para el estudio de procesos celulares asociados a cambios en la productividad de PR en células CHO. Nuestros resultados coinciden con el estudio de proteómica subcelular en células pancreáticas que permitió el aumento del 30% de cobertura del proteoma comparado con un estudio de células completas (Paulo et al., 2013).

6.4.4 El ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones se encontraron expresadas a la baja en las células con mayor productividad durante la fase exponencial.

Se realizó la identificación de las proteínas expresadas diferencialmente ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) relacionadas al metabolismo energético mitocondrial mediante las bases de datos de GeneCards, UNIPROT, DAVID y ShinyGO. De las 150 proteínas expresadas diferencialmente que convergieron entre ambas metodologías (Anexo 2, Figuras 1, 2 y 3), 106 proteínas se encontraron expresadas a la baja y 44 sobreexpresadas en la línea CRL-12445 en comparación con la línea CRL-12444, analizando solo la fracción mitocondrial. De las 150 proteínas, 17 correspondieron al metabolismo energético mitocondrial.

En la Figura 18, se muestran en rojo las proteínas aumentadas en la línea CRL-12445 con respecto a la línea CRL-12444, y en verde las disminuidas. También se muestran las proteínas de la glucólisis.

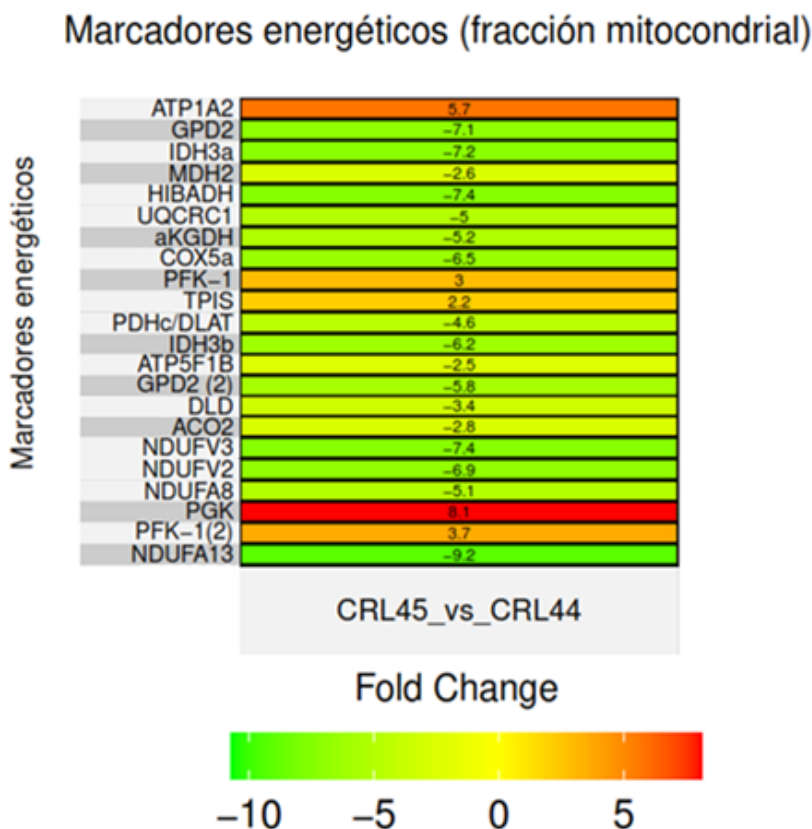


Fig. 18. Mapa de calor de las proteínas expresadas diferencialmente ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) relacionadas con el metabolismo energético mitocondrial identificadas en la fracción mitocondrial. Además de estos marcadores de interés, se muestran los identificados para la ruta de glucólisis debido a su relación directa con la producción de energía. Se muestran en rojo las proteínas aumentadas en la línea CRL-12445 con respecto a la línea CRL-12444, y en verde las disminuidas. Los valores mostrados en el centro de cada fila corresponden al valor de veces de cambio en la acumulación del marcador en cuestión en la proteómica diferencial. ATP1A2: Subunidad alfa-2 de la ATPasa de transporte de potasio y sodio; GPD2: Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2 mitocondrial; IDH3 α : Subunidad alfa de la isocitrato deshidrogenasa; MDH2: Malato deshidrogenasa 2 mitocondrial; HIBADH: 3-Hidroxiisobutirato deshidrogenasa; UQCRC1: Subunidad 1 del complejo citocromo b-c1 mitocondrial, α KGDH: α -Cetoglutarato deshidrogenasa; COX5a: Subunidad 5A del complejo citocromo c oxidasa mitocondrial; PFK-1: Fosfofructoquinasa-1; TPIS: Triosa fosfato isomerasa; DLAT: Dihidrolipoamida acetiltransferasa; IDH3 β : Subunidad beta de la isocitrato deshidrogenasa; ATP5F1B: Subunidad beta de la sección F1 de la ATP sintasa, DLD: Dihidrolipoil deshidrogenasa; ACO2: Aconitasa 2 mitocondrial; NDUFV3: NADH Deshidrogenasa (Ubiquinona) Flavoproteína 3; NDUFV2: NADH Deshidrogenasa (Ubiquinona) Flavoproteína 2; NDUFA8: NADH Deshidrogenasa [Ubiquinona] 1 Subcomplejo Alfa Subunidad 8; PGK: Fosfoglicerato quinasa; NDUFA13: NADH Deshidrogenasa [Ubiquinona] 1 Subcomplejo Alfa Subunidad 13.

Como se mencionó, en el Anexo 2 (Figuras 1, 2 y 3), se muestran mapas de calor para cada una de las bandas (B4 – B6) de la fracción mitocondrial con las proteínas totales que convergieron entre ambas metodologías con sus respectivas veces de cambio e incluyen los marcadores proteicos relacionados con el metabolismo energético mitocondrial y la glucólisis ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$). De acuerdo con los resultados (Figura 18) las vías energéticas mitocondriales estarían reprimidas en la línea CRL-12445 durante la fase exponencial. En el caso del ciclo de Krebs, se encontraron a la baja las subunidades de enzimas importantes para su funcionamiento, como es el caso de la aconitasa, isocitrato deshidrogenasa, el complejo alfa-cetoglutarato deshidrogenasa y la malato

deshidrogenasa. También se identificaron reprimidas otras subunidades de proteínas accesorias encargadas de alimentar al ciclo de Krebs, como es el caso de subunidades pertenecientes a la enzima piruvato deshidrogenasa denominadas como DLD y DLAT y subunidades de enzimas que ayudan a metabolizar aminoácidos para convertirlos en metabolitos del ciclo de Krebs como DLD y HIBADH. Para profundizar en la búsqueda de marcadores relacionados a metabolismo mitocondrial energético, se analizaron las fracciones microsomal, nuclear y citosol, encontrando que la citrato sintasa (CS) estaba regulada al alza mientras que la subunidad SUCLG2 del complejo succinil-CoA ligasa se encontró regulada a la baja en los resultados de la fracción nuclear. Respecto a las enzimas que ayudan a metabolizar aminoácidos, se encontró la enzima fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH) sobreexpresada en la fracción nuclear, además se encontró regulado al alza un transportador de pirofosfato (PiC) que ayuda en la acumulación de fosforo para la producción de ATP. En la fracción del citosol se encontró sobreexpresada la enzima GPD1 mientras que en la fracción mitocondrial regulada a la baja la enzima GPD2 que es la isoforma mitocondrial de GPD1 y que forman parte de las lanzaderas glicerol-3-fosfato que ayudan al transporte de equivalentes NADH producidos en citosol (Ansell et al., 1997; Shi et al., 2018). Esto sugeriría que existe un mayor transporte de poder reductor (NADH) del citosol a la matriz mitocondrial con un recambio menor de dicha molécula de la mitocondria al citoplasma. Las enzimas que se encontraron expresadas diferenciales entre ambas líneas celulares con relación directa al ciclo de Krebs encontradas en las fracciones “Nuclear”, “Mitocondrial”, “Microsomal” y el citosol, se muestran en la Figura 19.

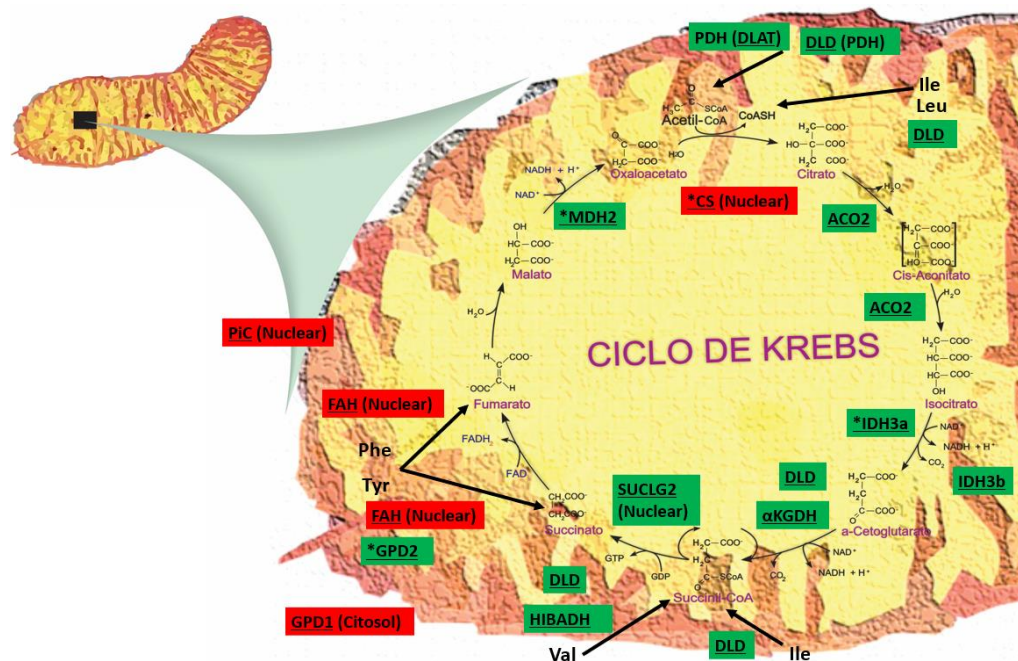


Fig. 19. Proteínas diferenciales ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) involucradas con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Se muestran en recuadros rojos las proteínas aumentadas en la línea CRL-12445 con respecto a la línea CRL-12444, y en recuadros verdes las disminuidas. A las proteínas que se encontraron en otras fracciones se le añadió a su nombre la fracción obtenida por el proceso de fraccionamiento subcelular de donde se encontraron. Las proteínas con un (*) en su nombre se encontraron en otros estudios proteómicos en células CHO productoras de diferentes tipos de proteínas recombinantes expresadas de manera diferencial. GPD1: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 1 citosólica; GPD2: Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2 mitocondrial; FAH: Fumarilacetoacetato hidrolasa; PiC: Mitochondrial phosphate Carrier; IDH3 α : Subunidad alfa de la isocitrato deshidrogenasa; MDH1: Malato deshidrogenasa 2 citosol; MDH2: Malato deshidrogenasa 2 mitocondrial; HIBADH: 3-Hidroxiisobutirato deshidrogenasa; α KGDH: α -Cetoglutarato deshidrogenasa; DLAT: Dihidrolipoamida acetiltransferasa; IDH3 β : Subunidad beta de la isocitrato deshidrogenasa; DLD: Dihidrolipoil deshidrogenasa; ACO2: Aconitasa 2 mitocondrial; CS: Citrato sintasa; SUCLG2: Subunidad alfa de la succinil-CoA ligasa mitocondrial.

En la línea CRL-12445, la cadena de transporte de electrones presentó expresadas a la baja subunidades de enzimas importantes para su funcionamiento como las del complejo I: NDUFV3, NDUFV2, NDUFA8, NDUFA13 y NDUFA6 que se encontró también a la baja en la fracción nuclear. Para el complejo III se encontraron las subunidades UQCRC1 y UQCRH en las fracciones mitocondrial y nuclear, respectivamente. Por último, en los complejos IV y V se identificó una subunidad de cada uno en la fracción mitocondrial (COX5A y ATP5F1B, respectivamente). Las subunidades del complejo de transporte de electrones que se encontraron expresadas diferenciales entre ambas líneas celulares e identificadas en las tres fracciones y el citosol se muestran en la Figura 20.

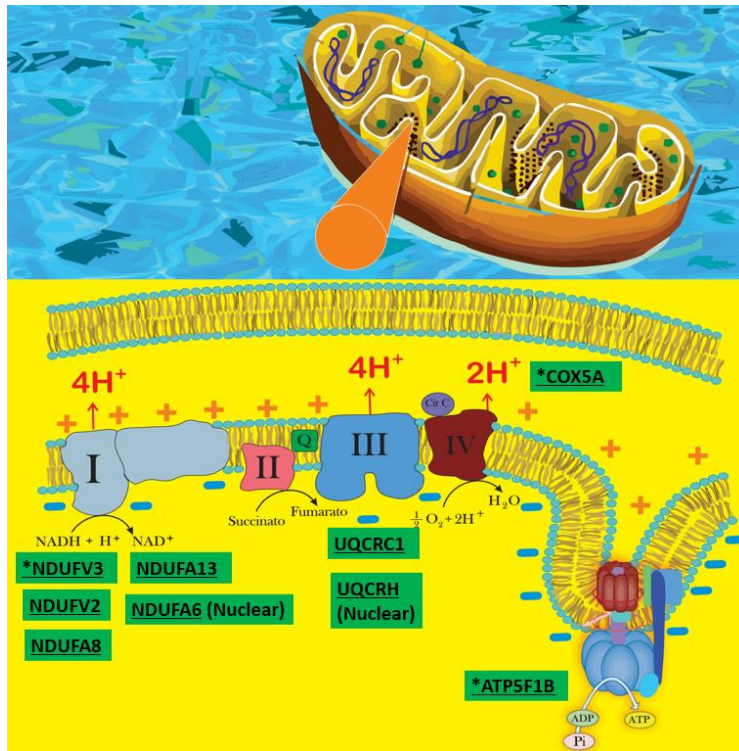


Fig. 20. Subunidades proteicas expresadas diferencialmente ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) pertenecientes a los complejos de la cadena de transporte de electrones. Se muestran en recuadros verdes las proteínas disminuidas en la línea CRL-12445 con respecto a la línea CRL-12444. A las proteínas que se encontraron en otras fracciones se le añadió a su nombre la fracción donde se encontraron. Las proteínas con un (*) en su nombre se encontraron en otros estudios proteómicos en células CHO productoras de diferentes tipos de proteínas recombinantes expresadas de manera diferencial. NDUFV2: NADH Deshidrogenasa (Ubiquinona) Flavoproteína 2; NDUFV3: NADH Deshidrogenasa (Ubiquinona) Flavoproteína 3; NDUFA8: NADH Deshidrogenasa [Ubiquinona] 1 Subcomplejo Alfa Subunidad 8; NDUFA13: NADH Deshidrogenasa [Ubiquinona] 1 Subcomplejo Alfa Subunidad 13; NDUFA6: NADH Deshidrogenasa [Ubiquinona] 1 Subcomplejo Alfa Subunidad 6; UQCRC1: Subunidad 1 del complejo citocromo b-c1 mitocondrial; UQCRH: Subunidad 6 del complejo citocromo b-c1 mitocondrial; COX5a: Subunidad 5A del complejo citocromo c oxidasa mitocondrial; ATP5F1B: Subunidad beta de la sección F1 de la ATP sintasa.

Además, se encontraron proteínas relacionadas a la glucólisis expresadas de manera diferencial. Es importante mencionar, que la glucólisis genera ATP y poder reductor (NADH) pero en menor medida que el ciclo de Krebs (Devlin et al., 2004; Nelson y Cox 2014). Sin embargo, un funcionamiento óptimo de esta vía puede contribuir a un metabolismo energético eficiente. Se encontraron 3 enzimas expresadas al alza en la fracción mitocondrial, las cuales fueron la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1), triosa fosfato isomerasa (TPIS), fosfoglicerato quinasa (PGK) y a la baja la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). En las demás fracciones se encontró sobreexpresada la enzima fosfoglicerato mutasa (PGAM) en la fracción microsomal.

Los resultados obtenidos en DAVID y ShinyGo indican que el proceso de glucólisis se encuentra más activo durante la fase exponencial tardía en la línea CRL-12445 que en la CRL-12444. En la Figura 21 se muestran las proteínas involucradas en la glucólisis expresadas diferencialmente de las fracciones “Nuclear”, “Mitocondrial”, “Microsomal” y el citosol.

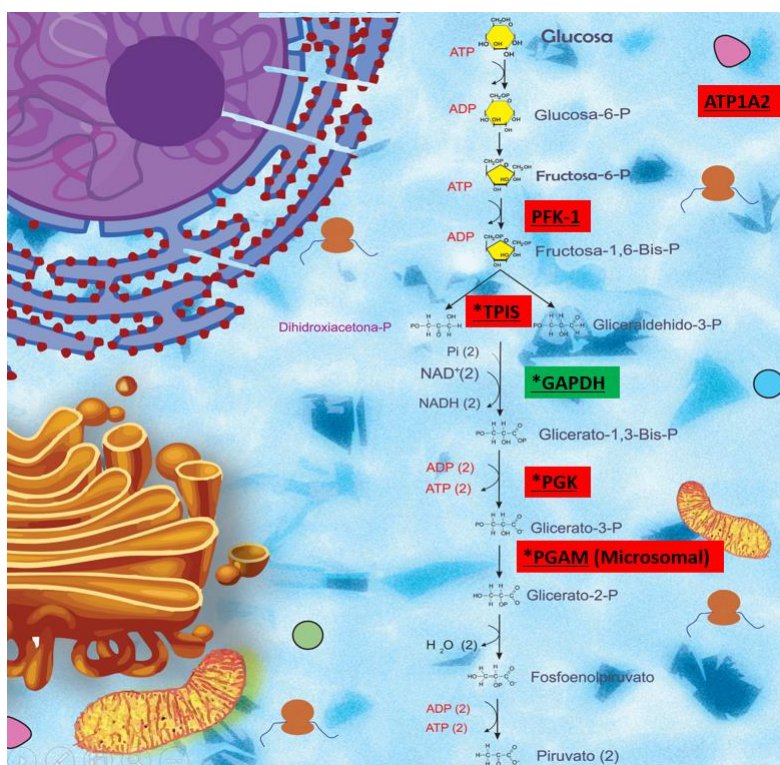


Fig. 21. Proteínas diferenciales ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) involucradas en la ruta de glucólisis. Se muestran en recuadros rojos las proteínas aumentadas en la línea CRL-12445 con respecto a la línea CRL-12444, y en recuadros verdes las disminuidas. A las proteínas que se encontraron en otras fracciones se le añadió a su nombre el lugar donde se encontraron. Las proteínas con un (*) se encontraron en otros estudios proteómicos en células CHO productoras de diferentes PR expresadas de manera diferencial. PFK-1: Fosfofructoquinasa-1; TPIS: Triosa fosfato isomerasa; GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; PGK: Fosfoglicerato quinasa; PGAM: Fosfoglicerato mutasa.

6.5 Validación de los resultados de la proteómica diferencial.

6.5.1 La acumulación diferencial de los candidatos proteicos mediante WB se comportó acorde a los resultados proteómicos.

Con la finalidad de corroborar los resultados proteómicos, propusimos observar la acumulación de algunas proteínas mediante WB. A partir del estudio de expresión diferencial mediante DEP y DEP + NormalyzerDE aplicando tres metodologías de imputación distintas con un límite mayor o igual que 2 veces de cambio en su expresión ($FC \geq 2$), un $FDR \geq 0.05$ y dejando como control las CRL-12444, se obtuvieron proteínas convergentes expresadas diferencialmente de la fracción “mitocondrial”. La cantidad de proteínas convergentes entre las tres metodologías se presenta en la Figura 22.

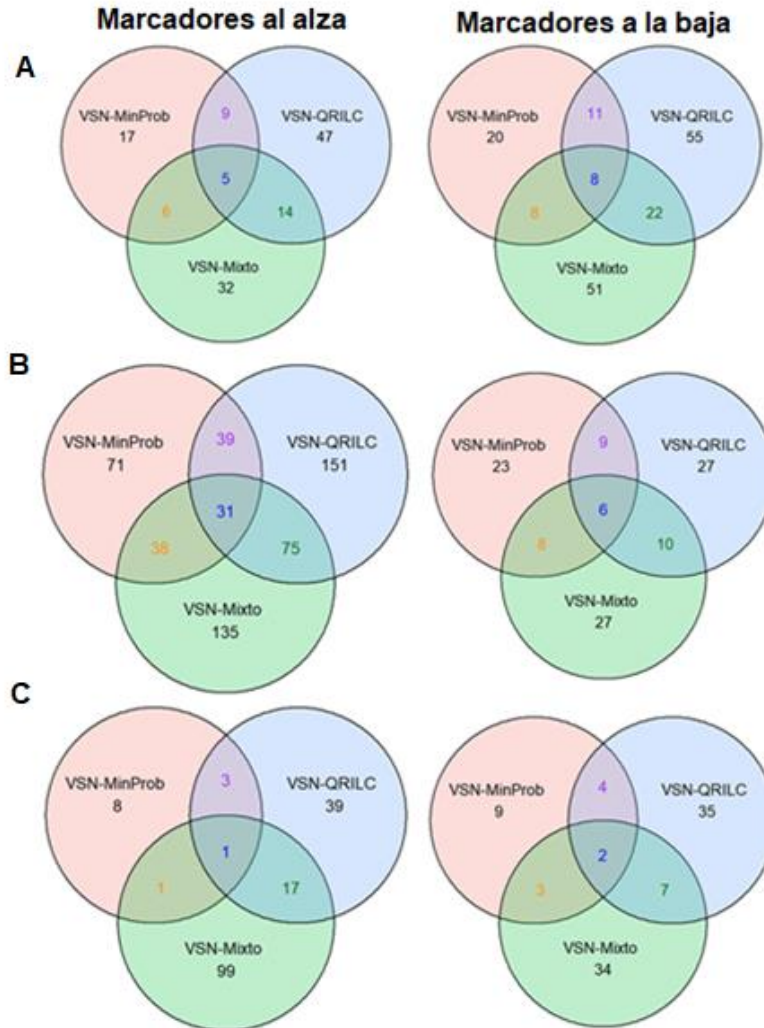


Fig. 22. Análisis de convergencia de las proteínas diferenciales ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) mediante tres métodos de imputación diferentes. Diagramas de Venn de las proteínas expresadas diferencialmente de la banda #4 (A), banda #5 (B) y banda #6 (C) de la fracción mitocondrial obtenidas por los métodos de imputación Mixto, MinProb y QRILC.

Una vez obtenidas las proteínas diferenciales ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) que convergieron (la lista completa de proteínas se muestra en el Anexo 3, Figura 1) se siguieron los criterios de selección expuestos en la sección de “Materiales y Métodos” para validar la proteómica. Se verificó la acumulación diferencial de Grp78, histona H3, Hsp60, HIBADH y ACO2 (Anexo 5, Figuras 1 – 4). La inmuno-detección de las 5 proteínas se muestra en la Figura 23. Cada detección se realizó por triplicado biológico y la variación de intensidad fue normalizada y comparada.

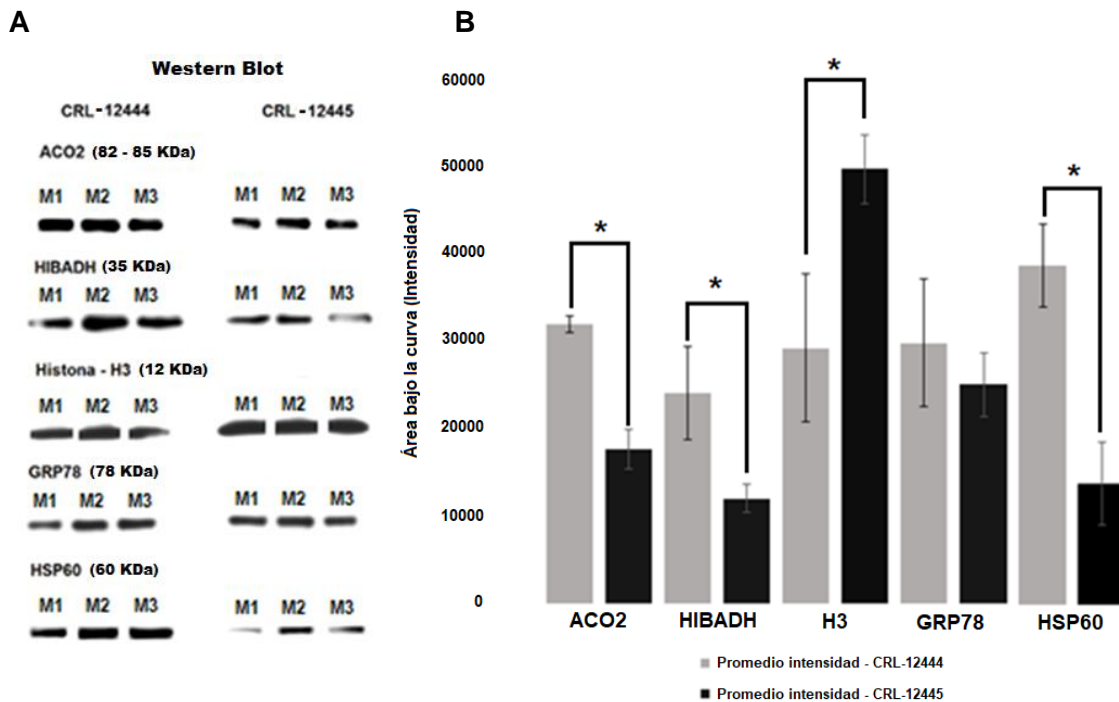


Fig. 23. Comparación de inmunodetección de las proteínas ACO2 (82 – 85 kDa), HIBADH (35 kDa), Histona H3 (12 kDa), GRP78 (78 kDa) y HSP60 (60 kDa) para la validación del estudio proteómico. En la figura A se muestra el triplicado biológico de bandas obtenidas por Western blot de ambas líneas celulares. En la figura B se muestran los análisis estadísticos de la densitometría realizada por ImageJ donde se compararon las áreas bajo la curva de las intensidades de las bandas de cada una de las proteínas analizadas. El promedio de intensidad y la desviación estándar se obtuvieron a partir de tres réplicas biológicas. En gris los resultados correspondientes a la línea CRL-12444 y en negro a la clona CRL-12445. Los asteriscos indican si las mediciones densitométricas determinadas por ImageJ fueron significativamente diferentes entre las proteínas detectadas (*: $P \leq 0.05$, prueba t). M1, M2 y M3 indican los matraces de donde se tomaron las muestras. Los geles de cada medición, las membranas completas, así como los pesos moleculares de las proteínas analizadas se muestran en el Anexo 5, Figuras 1 – 4. ACO2: Aconitasa 2, mitocondrial; HIBADH: 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa; H3: Histona H3; GRP78: Proteína 78 regulada por glucosa; HSP60: Proteína de choque térmico de 60 kDa mitocondrial.

En la aconitasa (ACO2), la intensidad de las bandas de la clona CRL-12444 son 1.81 veces de más intensas ($P \leq 0.05$) que en CRL-12445. El mismo efecto se apreció en el caso de HIBADH y HSP60 ya que las bandas obtenidas en la línea CRL-12444 se acumularon mayoritariamente en comparación de las obtenidas en la clona CRL-12445 con un cambio de 2.01 y 2.82 veces, respectivamente ($P \leq 0.05$). En lo que concierne a la histona H3, en la clona CRL-12445 se encontró expresada al alza 1.7 veces ($P \leq 0.05$) en comparación con la línea CRL-12444. Por último, se llevó a cabo la detección de alguna proteína que no estuviera expresada diferencialmente en los resultados de la proteómica y se escogió a la proteína GRP78 una chaperona localizada en el RE, la cual, en congruencia con los resultados, no mostró diferencia significativa ($P > 0.05$). Los resultados densitométricos fueron congruentes con los resultados proteómicos, aunque existieron diferencias en los niveles de expresión. La diferencia de acumulación de la ACO2 en el WB fue de -1.81 veces ($P \leq 0.05$) mientras que en el análisis proteómico el resultado fue de -2.8 para la línea CRL-12445 respecto a las células CRL-12444 ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$). Para la proteína HIBADH la diferencia de acumulación en el WB fue de -2.01 veces ($P \leq 0.05$) y en el análisis proteómico se estimó un cambio ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) de -7.4 en la línea CRL-12445 respecto la línea CRL-12444. La proteína mitocondrial HSP60, también se corroboró que estaba expresada a la baja en las células CRL-12445 en comparación con las células CRL-12444 ya que se obtuvo un cambio de acumulación de -2.82 veces en el WB ($P \leq 0.05$). Mientras que el análisis proteómico arrojó un valor de cambio de -2.8 veces ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$). Los

resultados obtenidos en el WB para la histona H3 también fueron congruentes con los datos estimados en el análisis proteómico ya que en la línea CRL-12445 esta proteína se encontró al alza respecto a las células CRL-12444 obteniendo valores de 1.7 ($P \leq 0.05$) y 7.5 veces ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$), respectivamente. En la Tabla 10, se muestra un resumen de los valores obtenidos por ambos métodos. En lo que respecta a la proteína GRP78 no se encontró expresada diferencialmente en ambos análisis ($P > 0.05$; $FC < 2$, $FDR \leq 0.05$).

Tabla 10. Comparación de las veces de cambio entre la densitometría de bandas por ImageJ y el análisis proteómico.

Proteína	Veces de cambio en el WB determinado por densitometría	Veces de cambio en el análisis proteómico
ACO2	-1.81*	-2.8**
HIBADH	-2.01*	-7.4**
Histona H3	1.70*	7.5**
GRP78	-1.2	< 2
HSP60	-2.82*	-2.8**

En rojo las proteínas aumentadas en la línea CRL-12445 con respecto a la línea CRL-12444, en verde las disminuidas ($P \leq 0.05$; $FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$) y en gris las que no tuvieron un cambio significativo ($P > 0.05$; $FC < 2$, $FDR \leq 0.05$). Los valores con asteriscos indican parámetros que fueron significativamente diferentes en el análisis de WB por densitometría (*: $p \leq 0.05$, prueba t) y en el análisis proteómico (**: $FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$). ACO2: Aconitasa 2, mitocondrial; HIBADH: 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa; H3: Histona H3; GRP78: Proteína 78 regulada por glucosa; HSP60: Proteína de choque térmico de 60 kDa mitocondrial.

6.5.2 La actividad de la citrato sintasa es acorde al comportamiento de esta enzima en los resultados proteómicos.

Con el objetivo de validar indirectamente el estudio proteómico, se escogió la citrato sintasa por ser la única enzima sobreexpresada del ciclo de Krebs. Se midió la actividad de esta enzima en la fase exponencial y en la fase estacionaria. Los resultados muestran que la actividad de la citrato sintasa en las células CRL-12445 fue casi tres veces mayor ($P \leq 0.05$) en la fase de crecimiento exponencial en comparación con las células CRL-12444. En la fase estacionaria no hubo diferencia significativa de actividad entre ambas líneas celulares ($P > 0.05$). La actividad de citrato sintasa en la línea CRL-12445 se redujo casi 3 veces de la fase exponencial a la fase estacionaria ($P \leq 0.05$) mientras que en la línea CRL-12444 la actividad permaneció prácticamente igual ($P > 0.05$) (Fig. 24).

Fase exponencial	
Actividad citrato sintasa - CRL12444 ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína)	0.025 ± 0.002
Actividad citrato sintasa - CRL12445 ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína)	0.076 ± 0.02
Fase estacionaria	
Concentración citrato sintasa - CRL12444 ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína)	0.024 ± 0.0032
Concentración citrato sintasa - CRL12445 ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína)	0.023 ± 0.0025

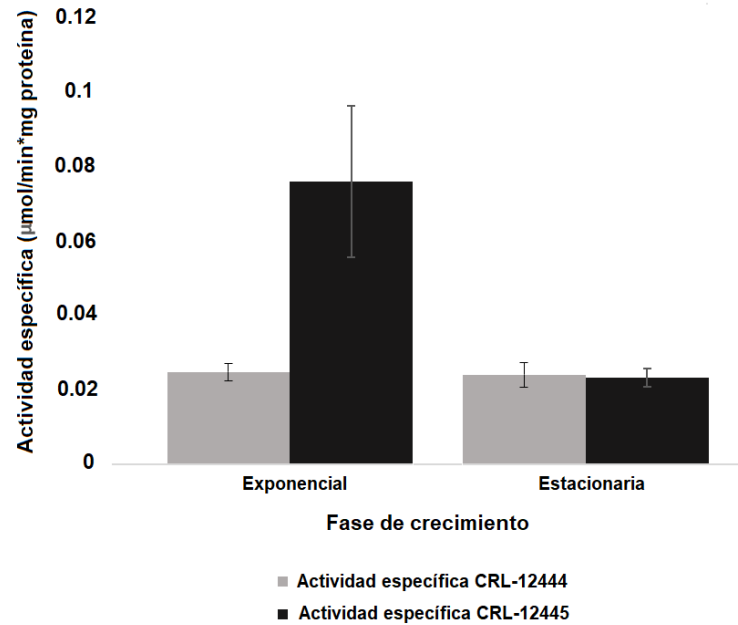


Fig. 24. Ensayos de actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína) de la enzima citrato sintasa durante las fases: exponencial y estacionaria. La denominada fase exponencial corresponde al día cuando se tomaron las muestras proteómicas. En gris los resultados correspondientes a la línea CRL-12444 y en negro a la clona CRL-12445. Los asteriscos indican parámetros que fueron significativamente diferentes (*: $p \leq 0.05$, prueba t).

6.6 Discusión sobre el análisis proteómico de la fracción mitocondrial.

La importancia de las células CHO en el ámbito biofarmacéutico para producir PR terapéuticas ha generado interés en el estudio profundo de su metabolismo para encontrar marcadores que puedan aumentar su qP. Para descifrar los mecanismos involucrados en altas productividades se han realizado estudios proteómicos comparando líneas celulares provenientes de un mismo clon parental con diferentes productividades de PR (Nissom et al., 2006; Carlage et al., 2009; Ho, 2013; Kang et al., 2014; Orellana et al., 2015; Sommeregger et al., 2016; Hausmann et al., 2018). Los estudios proteómicos de células completas no poseen el nivel de resolución para identificar proteínas provenientes de organelos poco abundantes como es el caso de las mitocondrias, de ahí que en este trabajo se llevó a cabo el proceso de fraccionamiento celular con la finalidad de identificar proteínas relacionadas al metabolismo energético mitocondrial con expresión diferencial. De las 106 y 44 proteínas expresadas a la baja y al alza ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$), respectivamente, que convergieron entre las dos metodologías para el análisis de la “fracción mitocondrial”, se identificaron 17 que correspondieron al metabolismo energético mitocondrial. Los grupos ontológicos generados por los softwares de ShinyGo y DAVID fueron usados para identificar las proteínas diferenciales ($FDR \leq 0.05$), tanto de la fracción mitocondrial como de las dos fracciones restantes y el citosol, que pertenecían o se relacionaban al ciclo de Krebs y a la cadena de transporte de electrones. Además, se identificaron proteínas relacionadas a glucólisis por su papel directo con la generación de energía. Los cambios en el nivel de abundancia detectados a partir de los datos proteómicos fueron confirmados por WB y medición de actividad enzimática.

6.6.1 El ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) se encontró regulado a la baja en las células CRL-12445 durante la fase exponencial.

En esta ruta metabólica se identificaron 7 proteínas expresadas a la baja en la línea CRL-12445 que forman parte del ciclo de Krebs (ACO2, IDH3 α , IDH3 β , α KGDH, DLD, SUCLG2 y MDH2) y una sobreexpresada (CS) (FC \geq 2, FDR \leq 0.05). Por otra parte, se identificaron en la línea CRL-12445 otras proteínas que se involucran con TCA ya sea para alimentarlo formando metabolitos mediante catabolismo de aminoácidos (HIBADH, DLD y FAH), formación de acetil CoA (DLAT y DLD) o para ayudar a transportar equivalentes NADH (GPD1 y GPD2) (Devlin et al., 2004; McKee et al., 2013; Nelson y Cox, 2014). HIBADH y DLD se encontraron expresadas a la baja mientras FAH al alza, DLAT y DLD se encontraron expresadas a la baja mientras que GPD1 se encontró sobreexpresada y GPD2 regulada a la baja (FC \geq 2, FDR \leq 0.05).

La aconitasa mitocondrial (ACO2) es una enzima que cataliza la interconversión de citrato a isocitrato en el segundo paso del ciclo de TCA (Nelson y Cox 2017). En un trabajo de proteómica diferencial en células CHO con diferente productividad, la ACO2 fue expresada a la baja en líneas con mayor productividad específica de un anticuerpo (Ho, 2013). La disminución de la actividad enzimática de la ACO2 hace más lenta la velocidad del flujo del ciclo Krebs y, por ende, la producción de poder reductor lo que conlleva a su vez a la inhibición del transporte de electrones que produce ATP (Lushchak et al., 2014). Al estar disminuida la expresión de esta enzima es posible que en las células CRL-12445 el ciclo de Krebs también se afecte. La disminución de la actividad de esta enzima incrementaría los niveles de citrato al no poder convertirlo a isocitrato (Gupta et al., 2012). Por lo tanto, es posible que el citrato pueda ser utilizado para la producción de lípidos necesarios en la generación de biomasa durante la fase exponencial (Chen et al., 2020).

IDH3 α y IDH3 β forman parte del heterotetrámero enzimático denominado como isocitrato deshidrogenasa que cataliza la descarboxilación oxidativa de isocitrato para formar 2-oxoglutarato o α -cetoglutarato y un equivalente NADH (Nelson y Cox, 2017). En algunos estudios se mostró que las subunidades α son responsables de la actividad catalítica de la enzima, mientras las subunidades β y γ fungen como componentes de ensamblaje, soporte y regulación (Grzeschik, 1976; Ramachandran y Colman, 1980; Weiss, et al., 2000; Al-Khallaf, 2017). La regulación de la isocitrato deshidrogenasa se da por la disponibilidad de sustrato y efectores alostéricos. El calcio, el ADP y el citrato la activan, mientras que el ATP, NADH y NADPH inhiben su actividad (Gabriel et al., 1986; Al-Khallaf, 2017). La regulación a la baja de la isocitrato deshidrogenasa genera una respuesta similar que la ACO2 ya que impacta el flujo del ciclo de TCA y la fosforilación oxidativa (Al-Khallaf, 2017). En las células CRL-12445 se encontraron a la baja las subunidades IDH3 α y IDH3 β , lo que indicaría que existe un flujo lento del ciclo de Krebs durante la fase exponencial de crecimiento.

α KGDH es una enzima compleja que consta de múltiples copias de tres subunidades, denominadas como E1, E2 y E3 (Koike et al., 1974; Koike y Koike, 1976; Tretter y Adam, 2005). El complejo enzimático cataliza la conversión α -cetoglutarato en succinil-CoA y CO₂, generando NADH como producto de reacción (Tretter y Adam, 2005). La α KGDH junto con la citrato sintasa y la isocitrato deshidrogenasa, determinan la velocidad general del ciclo de Krebs y son el principal sitio de control del flujo metabólico a través del ciclo de Krebs (Cooney et al., 1981; McCormack et al., 1990; Moreno-Sánchez et al., 1990; Hansford, 1980; Tretter y Adam, 2005). La enzima es inhibida por sus productos finales (succinil-CoA y NADH), ATP, Ca²⁺ y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Smith et al. 1974; Hansford, 1980; Tretter y Adam, 2005; Vatrinet et al., 2017). Por otra parte, el complejo enzimático se

activa mediante presencia de ADP (Vatrinet et al., 2017). La subunidad de este complejo expresada a la baja en las células CRL-12445 corresponde al componente (E1) de la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa, que media la descarboxilación del α KG (Tretter y Adam, 2005), por lo que su actividad enzimática podría estar reducida. Se ha documentado que la conversión de α -KG a isocitrato implica una menor actividad del complejo α KGDH y este efecto genera un funcionamiento en modo inverso del ciclo de Krebs respaldando la síntesis de ácidos grasos de *novo* a partir del citrato (DeBerardinis et al., 2007; DeBerardinis et al., 2008; Fendt et al., 2013; Mullen et al., 2011; Metallo et al., 2011; Vatrinet et al., 2017). Debido a que la α KGDH se encontró expresada a la baja en las células CRL-12445, es posible que, durante la fase de crecimiento exponencial, se aproveche la glutaminólisis para forzar el funcionamiento inverso del ciclo de Krebs con la finalidad de aumentar su densidad celular a partir del citrato generado por esta reacción inversa. Este efecto se ha reportado en células cancerosas, ya que cuando la cadena de transporte de electrones no funciona adecuadamente por defectos o por su regulación a la baja, se puede generar citrato e isocitrato a partir del α -KG derivado de la glutamina (Wise et al., 2011; Mullen et al., 2011). La regulación a la baja de la cadena de transporte de electrones también se encontró en las células CRL-12445, lo que indicaría la posibilidad que se presente esta característica metabólica.

El componente SUCLG2 corresponde a la subunidad beta de la enzima succinil-CoA ligasa. La subunidad beta proporciona la especificidad de ATP o GTP de la enzima y es capaz de unirse al succinato, mientras que los sitios de unión para la coenzima A y el fosfato se encuentran en la subunidad alfa (Mehus et al., 1998; Lambeth et al., 2004; Philips et al., 2009; Van Hove et al., 2010). La succinil-CoA ligasa, también llamada succinato sintasa, es una enzima del ciclo de Krebs que convierte la succinil-CoA en succinato y coenzima A libre donde se acopla la reacción a síntesis de GTP o ATP y representa el único paso de fosforilación a nivel de sustrato en el TCA. (Johnson et al., 1998; Johnson y Mehus et al., 1998; Lambeth et al., 2004; Van Hove et al., 2010). En neuronas la baja actividad de esta enzima produce menor eficiencia de la fosforilación oxidativa (FO) y una mayor producción de ROS mitocondriales (Zhao et al., 2017). Es posible que la regulación a la baja de esta enzima, sea un factor para la regulación a la baja de algunos componentes de la cadena de transporte de electrones en la línea CRL-12445.

MDH2 cataliza la oxidación reversible del malato a oxaloacetato mediante la reducción del NAD^+ en el ciclo de Krebs. Esta enzima se encuentra expresada en mitocondrias y está implicada en las lanzaderas de malato-aspartato (Mullinax et al., 1982; Fahien et al., 1988; Todisco et al., 2019). MDH2 se regula de forma alostérica, se activa con concentraciones elevadas de malato, mientras que niveles altos de oxaloacetato la inhiben (Mullinax et al., 1982; Fahien et al., 1988; Todisco et al., 2019). La regulación negativa de la enzima MDH2 por diferentes compuestos provoca una disminución de la respiración mitocondrial por la reducción de los niveles de NADH (Todisco et al., 2019). Dentro de los estudios de proteómica diferencial en células CHO con diferentes niveles de productividad, Nissom et al., (2006) y Xu et al., (2019) encontraron que MDH2 estaba sobreexpresada en líneas celulares CHO con mayor productividad específica mientras que en la línea CRL-12445 en la fase exponencial esta enzima se encontró regulada a la baja.

La citrato sintasa (CS) cataliza la síntesis de citrato a partir de la condensación de oxaloacetato y acetil coenzima A. Esta proteína se localiza en la matriz mitocondrial, donde desempeña un papel central en el metabolismo energético (Icard et al., 2012; Icard et al., 2021). Se ha reportado que, en células altamente glucolíticas, la producción mitocondrial de ATP se reduce debido a la inhibición de la fosforilación oxidativa (FO) por los altos

niveles de fructosa-1,6-bisfosfato (F-1,6-BP) (Díaz-Ruiz et al., 2008). Debido a esto, el flujo de carbono en el ciclo de TCA está regulado a la baja y el citrato se exporta principalmente al citosol, donde se transforma nuevamente en acetil coenzima A (Acetil-CoA) y oxaloacetato (OAA). En el citosol, la acetil coenzima A se usa para la síntesis de ácidos grasos (Icard et al., 2021). La CS fue la única enzima del ciclo de Krebs que se encontró regulada al alza en la línea CRL-12445. Lo que podría implicar que el citrato promueva la síntesis de lípidos necesarios para obtener biomasa en lugar de que se utilice para la generación de energía. En células de cáncer pancreáticas se demostró que la actividad mejorada de esta enzima contribuye en la síntesis de lípidos de membrana (Schlichtholz et al., 2005). En lo que respecta a la actividad de la enzima CS en células musculares de mamífero, cerebro, corazón e hígado de ratón se determinaron rangos de actividad en $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína de 1.2 – 1.25, 0.055 – 0.075, 1.3 – 2.0 y 0.6 – 0.8, respectivamente (Zhang et al., 2018). Los resultados de este estudio se encontraron dentro de los reportados en la literatura para células de mamíferos. En las proteómicas diferenciales se encontró que la CS estaba sobreexpresada en los estudios de Ho, (2013) y de Sommeregger et al., (2016). En este estudio se evaluó la actividad de la CS en ambos tipos celulares y se observó que la actividad en las células CRL-12445 fue significativamente mayor en la fase de crecimiento exponencial en comparación con las células CRL-12444 mostrando una actividad casi tres veces mayor, mientras que en la fase estacionaria no hubo diferencia significativa. El hecho que disminuyera la actividad entre la fase exponencial y la fase estacionaria en las células CRL-12445, sugiere que las células dejan de lado la generación de lípidos para contribuir al metabolismo oxidante y producir PR.

HIBADH es una enzima mitocondrial que juega un papel importante en el catabolismo de L-valina al realizar la oxidación de 3-hidroxiisobutirato a semialdehído de metilmalonato. El producto final del catabolismo de la L-valina es succinil-CoA, metabolito que puede ser utilizado por el ciclo de Krebs para producir NADH (Marcadier et al., 2013). Dado que HIBADH está expresada diferencialmente a la baja en las células de mayor productividad, puede sugerir que las células CRL-12445 no usen o utilicen de manera reducida la L-valina para mantener en funcionamiento del ciclo de Krebs.

La subunidad DLD o lipoamida deshidrogenasa es el componente E3 perteneciente a tres deshidrogenasas esenciales para la descomposición de moléculas para producir energía. Está involucrada en el catabolismo de leucina, isoleucina y valina para la obtención de acetil-CoA y succinil-CoA mediante la deshidrogenasa de alfa-cetoácidos de cadena ramificada (Nelson y Cox, 2017), en la conversión del piruvato en acetil-CoA ya que forma parte del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) (Nelson y Cox, 2017) y en la generación de succinil-CoA porque también funge como componente de la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa (αKGDH) (Tretter y Adam, 2005; Nelson y Cox, 2017). Debido a esto, es posible que la leucina, isoleucina y valina se utilicen de manera reducida para generar intermediarios del ciclo de Krebs por las células CRL-12445 además de que no se produzca acetil-CoA y succinil CoA para mantener el ciclo de Krebs regulado a la baja evitando un metabolismo oxidativo.

FAH conocida como fumarilacetoacetato hidrolasa cataliza la ruptura de un enlace carbono-carbono del fumarilacetoacetato para producir fumarato y acetoacetato como paso final en la degradación de fenilalanina y tirosina (Bateman et al 2001; Chinsky et al., 2017). Al ser la única enzima regulada al alza que está implicada en el catabolismo de aminoácidos para la formación de metabolitos asociados al ciclo de Krebs, es probable que durante la fase exponencial de crecimiento la línea CRL-12445 utilice aminoácidos específicos para alimentar dicha ruta metabólica y promover su funcionamiento. Un estudio sobre el consumo de aminoácidos durante la fase exponencial y la transición entre la fase

exponencial y la estacionaria, determinó diferencias en el consumo de tirosina, triptófano, isoleucina y treonina (Pan et al., 2017). Esto puede indicar que la tirosina tiene un rol importante en la alimentación del ciclo de Krebs en las células CRL-12445.

DLAT es el componente E2 del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (PDH). El PDH reside en la membrana mitocondrial interna y cataliza la conversión de piruvato en acetil-CoA y CO₂. La dihidrolipoamida acetiltransferasa, acepta grupos acetilo formados por la descarboxilación oxidativa del piruvato y los transfiere a la coenzima A. Este complejo une la vía glucolítica al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Nelson y Cox, 2017). Debido a que durante la fase de crecimiento exponencial en células CHO de mayor productividad por lo general tienen activo el efecto Warburg (Sengupta et al., 2010; Templeton et al., 2013), es posible que en la fase exponencial la línea CRL-12445 no convierta preferentemente el piruvato en acetil-CoA, lo que evita el metabolismo oxidativo, y que las subunidades del complejo PDH se regulen a la baja.

La proteína citosólica GPD1 y su isoforma mitocondrial GPD2 forman parte de la denominada lanzadera de glicerol fosfato que lleva a cabo la transferencia de equivalentes reductores (NADH) producidos durante la glucólisis del citosol a la matriz mitocondrial (Nelson y Cox, 2017). En los estudios de Meleady et al., (2008) y Ho, (2013) se encontró que GPD2 estaba a la baja y al alza, respectivamente, en líneas celulares CHO con mayor productividad específica. En este estudio se encontró sobreexpresada la isoforma citosólica y la isoforma mitocondrial expresada a la baja durante la fase exponencial en las células CRL-12445. Al estar sobreexpresada la isoforma citosólica sugiere un mayor flujo de poder reductor generado por la glucólisis a la matriz mitocondrial para llevar a cabo reacciones anabólicas o para inhibir algunas enzimas de ciclo de Krebs y mantenerlo regulado a la baja.

Con los resultados obtenidos en el análisis proteómico se puede inferir que el ciclo de Krebs se encuentra regulado a la baja durante la fase de crecimiento exponencial de las células CRL-12445 de mayor productividad. Es posible que, durante esta fase de crecimiento, se utilice esta ruta metabólica para generar citrato requerido en la biosíntesis de lípidos fomentando el crecimiento de las células, en lugar de emplearlo para producir ATP que se utilizaría posiblemente para la producción de PR.

6.6.2 La cadena de transporte de electrones (CTE) se encontró regulada a la baja en las células de mayor productividad durante la fase exponencial.

Incluyendo todas las fracciones, en lo que respecta a la cadena de transporte de electrones, se identificaron 5 subunidades proteicas expresadas a la baja que forman parte del complejo I (NDUFV3, NDUFV2, NDUFA8, NDUFA13 y NDUFA6). En lo que concierne al complejo III se encontraron 2 subunidades expresadas diferencialmente a la baja (UQCRC1 y UQCRH). Por otra parte, se determinó 1 subunidad regulada a la baja del complejo IV (COXVa) y 1 subunidad expresada a la baja del complejo V o ATP sintasa (ATP5F1B) ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$). NDUFV3, NDUFA5 y NDUFA13 son subunidades accesorias del complejo I de la cadena de transporte de electrones y no están involucradas con la actividad catalítica del complejo enzimático, pero ayudan a su ensamblaje (Mimaki et al., 2012; Mckenzie y Ryan, 2010). NDUFV2 es la subunidad de 24 kDa del complejo I y participa en la transferencia de electrones, por lo que está involucrada en la actividad catalítica de la enzima, además de ser una subunidad central de la NADH deshidrogenasa (Complejo I) (Mimaki et al., 2012; Mckenzie y Ryan, 2010). NDUFA8 es una proteína de 19 kDa que tiene actividad NADH deshidrogenasa y actividad oxidorreductasa (Mimaki et al., 2012; Mckenzie

y Ryan, 2010). El complejo I (NADH: ubiquinona oxidorreductasa) es el complejo enzimático multimérico más grande de la cadena respiratoria mitocondrial ya que consta de 45 subunidades, en mamíferos (Mimaki et al., 2012; Mckenzie y Ryan, 2010; Nelson y Cox, 2017).

En la Figura 25, se esquematiza la participación de la cadena de transporte de electrones en la generación de ATP, además de mostrar su íntima relación del ciclo de Krebs.

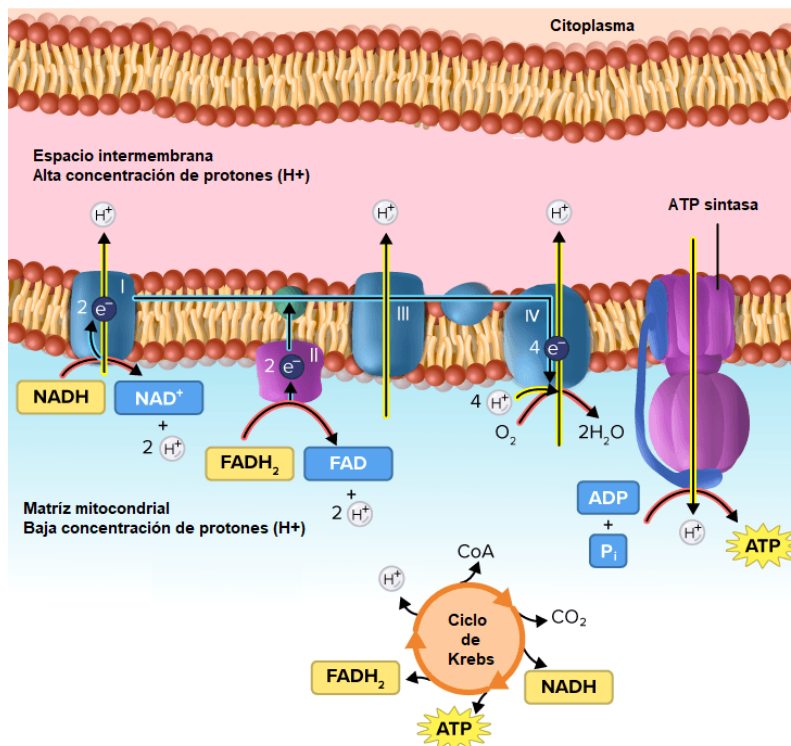


Fig. 25. Relación entre la cadena de transporte de electrones y el ciclo de Krebs (Tomado de Douglas y Brainard, 2012 – CK12.org). El ciclo de Krebs genera el NADH necesario para movilizar los complejos de la cadena de transporte de electrones (I, III y IV), los cuales bombean los protones del NADH al espacio intermembrana con el fin de generar un gradiente electroquímico que contribuye con la función de la ATP sintasa para realizar la fosforilación oxidativa y formar ATP a partir de ADP y P_i (Nelson y Cox, 2017).

En los estudios de proteómica diferencial en células CHO, se encontraron sobreexpresadas las subunidades NDUFS3 y NDUFV1 (Ho, 2013) mientras que Liu et al., (2015) encontraron al alza NDUFA5, NDUFS1 y NDUFS4, y NDUFB8 a la baja. A diferencia de los estudios de célula completa, no se encontraron subunidades del complejo I sobreexpresadas y solo se determinaron subunidades a la baja (NDUFV3, NDUFV2, NDUFA8, NDUFA13 y NDUFA6), atribuible a diferencias en las líneas celulares y las condiciones de cultivo.

UQCRC1 es un componente de la ubiquinol-citocromo C oxidorreductasa (complejo citocromo b-c1, complejo III, CIII). Las proteínas, UQCRC1 y UQCRC2, resultan críticas para el ensamblaje de reductasa y, por lo tanto, están relacionadas con la integridad del complejo III, aunque no forman parte de las subunidades catalíticas (Unni et al., 2019; Shan et al., 2019). UQCRH/QCR6 es una subunidad accesoria, de soporte y no catalítica del complejo III de la cadena de transporte de electrones (Ndi et al., 2018). En este estudio ambas subunidades (UQCRC1 y UQCRH) se encontraron a la baja. Por otra parte, en otros estudios proteómicos de células CHO no se han reportado hallazgos de subunidades expresadas diferencialmente del complejo III.

El complejo citocromo b-c1 o complejo IV, cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo C, vinculando esta reacción redox con la translocación de protones a través de la membrana interna mitocondrial (Unni et al., 2019; Shan et al., 2019). COXVa es una subunidad de soporte y estabilidad del complejo IV. Dicho complejo proteico es la última enzima de la cadena de transporte de electrones mitocondrial que impulsa la fosforilación oxidativa. La citocromo C oxidasa es el componente de la cadena respiratoria que cataliza la reducción de oxígeno a agua (Beck et al., 2015; Kadenbach y Hüttemann, 2015). En el estudio de Van-Dyk et al., (2003) se encontró que la subunidad COX5A del complejo III de la cadena de transporte de electrones estaba diferencialmente al alza, mientras que, en el estudio proteómico de Liu et al., (2015) se encontró expresada a la baja. Los resultados de esta tesis concordaron con lo reportado por Liu et al., (2015).

ATP5F1B es una subunidad de la ATP sintasa mitocondrial que corresponde a la subunidad beta del núcleo catalítico. La ATP sintasa mitocondrial cataliza la síntesis de ATP, utilizando un gradiente electroquímico de protones generado a partir de la cadena de transporte de electrones en la membrana interna mitocondrial (Nelson y Cox, 2017). Ho, (2013) encontró que la subunidad ATP5B del complejo V de la cadena de transporte de electrones estaba expresada diferencialmente a la baja en líneas celulares CHO con mayor productividad específica del anticuerpo quimérico EG2-hFc1. Los resultados obtenidos concordaron con los de Ho, (2013).

El análisis proteómico arrojó resultados esperados ya que como el ciclo de Krebs se encuentra regulado a la baja en las células de mayor productividad durante la fase de crecimiento exponencial, en consecuencia, la cadena de transporte de electrones también debe estar regulada a la baja, sugiriendo la disminución de la participación del metabolismo oxidativo y un ciclo de Krebs enfocado en la producción de citrato para la obtención de lípidos.

6.6.3 Enzimas de glucólisis se encontraron sobreexpresadas en la línea CRL-12445 durante la fase exponencial.

Respecto a la glucólisis, se identificaron 4 proteínas sobreexpresadas (PFK-1, TPIS, PGK y PGAM) y una proteína a la baja (GAPDH) ($FC \geq 2$, $FDR \leq 0.05$), en las fracciones analizadas. Aunque esta ruta metabólica no se relaciona de manera directa con el metabolismo energético dentro de las mitocondrias, la glucólisis juega un papel clave en las células CHO debido a que se caracterizan de poseer el efecto Warburg (Locasale y Cantley, 2011; Bender y Martinou, 2016; Kunji y Lytovchenko, 2017). En la Figura 1 se muestra la diferencia entre el efecto Warburg y la ruta normalmente usada para catabolizar la glucosa. Esta ruta metabólica es capaz de generar ATP mediante fosforilación a nivel sustrato y NADH que puede ser empleado para crecer. PFK-1 o fosfofructocinasa es una enzima glucolítica que lleva a cabo la fosforilación de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bisfosfato. Dado que se usa ATP, se encuentra en la denominada fase de gasto de la glucólisis (Nelson y Cox, 2017). En este estudio la fosfofructocinasa se encontró sobreexpresada en las células de mayor productividad. En la literatura relacionada a proteómica de células CHO no se ha reportado esta enzima glucolítica diferencialmente.

TPIS o triosa fosfato isomerasa es una enzima glucolítica que realiza la isomerización del gliceraldehído 3-fosfato (G3P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP). En los estudios de Pascoe et al., (2007) y Meleady et al., (2011) se encontró que TPIS estaba diferencialmente al alza en líneas celulares CHO con mayor productividad específica de PR. Los resultados de este estudio concordaron con los de la literatura en la línea CRL-12445.

PGK1 es una enzima glucolítica que cataliza la conversión reversible de 1,3-difosfoglicerato en 3-fosfoglicerato o a la inversa. Este paso corresponde a una de dos reacciones productoras de ATP en la fase de beneficio de la glucólisis (Nelson y Cox, 2017). PGAM1 es una proteína mutasa perteneciente a la vía de la glucólisis que lleva a cabo la reacción reversible de 3-fosfoglicerato (3-PGA) a 2-fosfoglicerato (2-PGA) (Nelson y Cox, 2017). En los estudios proteómicos de célula completa con células CHO de qP, solo en Meleady et al., (2011) se encontró PGAM1 sobreexpresada en líneas celulares CHO con mayor productividad específica de un anticuerpo monoclonal. Debido a que las células CRL-12445 requieren una mayor cantidad de energía que las células CRL-12444 para generar biomasa y, a su vez producir más cantidad de PR, es posible que una expresión diferencial al alza de diferentes marcadores de esta ruta permita una mayor producción de ATP mediante fosforilación a nivel sustrato. Se ha propuesto que la fosforilación a nivel sustrato serviría como sustituto al bajo metabolismo oxidativo durante la fase de crecimiento exponencial (Young, 2013).

GAPDH es una enzima que realiza la transformación del gliceraldehído-3-fosfato en presencia de fosfato inorgánico y NAD^+ para su conversión en 1,3 Bisfosfoglicerato y NADH (Nelson y Cox, 2017). Dentro de los estudios de proteómica diferencial en células CHO con mayor productividad, GAPDH se ha encontrado al alza (Carlage et al., 2009; Sommeregger et al., 2016). En este estudio en las células CRL-12445 la enzima GAPDH se encontró diferencialmente regulada a la baja. Sin embargo, debido al comportamiento de consumo de glucosa en las células CRL-12445 y la sobreexpresión de otros marcadores de la glucólisis, apuntan a que esta ruta se encuentra activa.

6.6.4 Discusión sobre el metabolismo energético y sus implicaciones con la productividad de PR en las células CRL-12445.

Nuestros resultados señalaron que durante la fase de crecimiento exponencial, las líneas de mayor productividad poseen un estatus metabólico glucolítico elevado mientras que el CK se mantiene regulado a la baja. El ciclo de los ácidos tricarbónicos funge como productor de citrato necesario para la síntesis de lípidos requeridos en la formación de nuevas membranas. Mientras que en la fase estacionaria donde aumentó la productividad, se mantuvo un metabolismo glucolítico característico de las células CHO ya que las velocidades de consumo de glucosa no variaron entre ambas fases de crecimiento. Al comparar el título de anticuerpo anti-IL8, pasó de 23.05 ± 3.41 a 124.5 ± 46.41 mg/mL de la fase exponencial a la estacionaria lo que implicaría un aumento de 5.4 veces aproximadamente anticuerpo en la línea CRL-12445 lo que sugiere que se podría activar el CK en la fase estacionaria para que el metabolismo oxidativo se use para la producción de PR. Esto sustentado en la plasticidad metabólica de células CHO (Wahrheit et al., 2014). Young, (2018) reportó un análisis de flujos metabólicos (MFA por sus siglas en inglés) de células CHO DHFR^{-/-} que expresaban una inmunoglobulina, asociando la velocidad específica de crecimiento durante la fase exponencial con una producción alta de lactato y un flujo mínimo en CK. Mientras que, durante la fase estacionaria, la producción de IgG alcanzó su punto máximo y la energía se generó principalmente a través del CK y la fosforilación oxidativa. Además, encontraron que a medida que aumentaba la productividad de IgG, disminuía la producción de lactato (Young, 2018). Este mismo efecto se puede observar en las células CRL-12445 ya que en la fase estacionaria se mantiene casi estable la concentración de lactato en el medio (Figura 10).

Templeton et al., (2013) realizaron un análisis MFA en cultivos de lote alimentado de células CHO productoras de un anticuerpo y determinaron que la fase de crecimiento exponencial

se asoció con una producción alta de lactato y un ciclo de TCA mínimo. Además, el metabolismo del lactato cambió de producción a consumo a medida que el cultivo pasaba de la fase exponencial a la producción máxima de anticuerpo. Durante la fase máxima de producción de anticuerpos, la energía se generó principalmente a través de la fosforilación oxidativa. A medida que el ciclo de TCA y la producción de anticuerpos alcanzaron sus picos máximos, la velocidad de crecimiento específico disminuyó conforme el cultivo entraba en la fase estacionaria (Templeton et al., 2013). El aumento de la producción de anticuerpos estuvo estrechamente asociado con el metabolismo del ciclo oxidativo de TCA. Sin embargo, este comportamiento de re-consumo de lactato no se observó en este estudio. Sengupta et al., (2010) evaluaron el metabolismo de células CHO productoras de anticuerpos monoclonales en la fase estacionaria y se determinó que casi la totalidad de la glucosa consumida se desvió hacia la vía de las pentosas fosfato. El piruvato, se desvió hacia el ciclo TCA en la fase estacionaria mientras que, en condiciones de crecimiento, se desvió hacia la producción de ácido láctico (Sengupta et al., 2010). Por otra parte, Altamirano et al. (2001b) evaluaron el metabolismo en la fase exponencial y la mayor parte del flujo se desvió hacia la glucólisis en comparación de los flujos en fase estacionaria. Estos trabajos indicarían que en células CHO productoras de PR, la activación del CK se encuentra asociada a la fase estacionaria.

La plasticidad metabólica también se ha reportado en células con glucólisis exacerbada, como en el caso de las cancerígenas, en las que la producción de ATP mitocondrial se reduce. Esto se debe a la inhibición de la fosforilación oxidativa (FO) por los altos niveles del intermedio glucolítico fructosa-1,6-bisfosfato (Díaz-Ruiz et al., 2008). En las células CHO se han reportado varios efectos en el metabolismo que pueden ocurrir durante la fase estacionaria, desde la reducción en las velocidades de consumo de glucosa y glutamina mientras se mantiene elevada la velocidad del ciclo de Krebs (Ahn y Antoniewicz, 2013; Templeton et al., 2013; Altamirano et al., 2006; Sengupta et al., 2010). Algunos cultivos en crecimiento exponencial de células CHO exhiben glucólisis aeróbica y dependen de un consumo elevado de glutamina para impulsar el metabolismo mitocondrial (Hosios et al., 2016). Esto da como resultado una mayor producción de lactato y amonio a medida que las células reconfiguran su metabolismo para mantener el equilibrio de carbono, nitrógeno y redox. La productividad específica de las PR generalmente no alcanza su punto máximo hasta que el cultivo ha pasado a la fase estacionaria (Smolková et al., 2011; Jose et al., 2011; Vatrinet et al., 2017). La línea CRL-12445 exhibe un comportamiento metabólico similar con una reducción en la generación de glutamato y amonio, productos de la glutaminólisis, en la fase estacionaria (Figura 10). Dado que las concentraciones de los metabolitos producidos no aumentaron significativamente en la fase estacionaria, la velocidad de consumo de glutamina disminuyó durante este intervalo de tiempo. Además de que la productividad de PR alcanzó su pico máximo durante la fase estacionaria en las células CRL-12445. Sin embargo, el consumo de glucosa se mantuvo similar durante la fase exponencial y la fase estacionaria, por ende, es posible que en la fase estacionaria el piruvato producido por la glucólisis se convirtió en Ac.CoA en lugar de formar lactato con la finalidad generar la energía necesaria para producir el anticuerpo, lo que explicaría por qué hubo un cambio de 5.4 veces en el título de PR de la fase exponencial a la fase estacionaria. Por otra parte, no hubo consumo de lactato durante la fase estacionaria además de que no aumentó la concentración de dicho metabolito, lo que indicaría que la velocidad de producción se redujo y, a su vez, apoyaría el hecho de que en la fase estacionaria las células convierten el piruvato en Ac.CoA para fomentar un metabolismo oxidativo. Un escenario metabólico similar también se ha reportado en la literatura en células productoras de anticuerpos (Toussaint et al., 2016).

Aumentar nuestro conocimiento en la compartimentación metabólica y, en particular, en la comprensión de la interconexión de la glucólisis y el ciclo TCA avanzará sustancialmente en la optimización de las líneas de células productoras y los procesos biotecnológicos. Por ende, se plantea que en un futuro se pueda aplicar la misma metodología de proteómica subcelular en ambas líneas celulares durante la fase estacionaria con la finalidad de observar cuales son las enzimas mitocondriales relacionadas al metabolismo energético que más pueden contribuir al aumento de la productividad.

6.7 Relación NAD⁺/NADH celular y número de mitocondrias entre las líneas CRL-12444 y CRL-12445.

6.7.1 Un estatus redox (NAD⁺/NADH) más reductor puede estar asociado con un aumento en la productividad de PR.

El estado redox en las células tendría un aporte importante en el aumento del metabolismo energético de la célula, lo que podría estar relacionado con la diferencia de productividad entre ambas clonas. Por lo tanto, con la finalidad de ver el impacto del estado redox celular en la productividad se midió la relación NAD⁺/NADH durante dos fases diferentes de crecimiento, en este caso, en el día de toma de muestra para el análisis proteómico en la fase exponencial y en la fase estacionaria. En los resultados obtenidos (Figura 26) se observó que la relación NAD⁺/NADH fue significativamente menor ($P \leq 0.05$) en el clon CRL-12445 en ambas fases de crecimiento en comparación con las células CRL-12444 ya que en la fase exponencial la línea CRL-12444 mostró un estatus redox 1.42 veces más oxidante que la CRL-12445 en la fase exponencial y 2.13 veces más oxidante que la CRL-12445 en la fase estacionaria. Además, la línea CRL-12445 volvió más reductor su estatus redox un 44.1% de la fase exponencial a la fase estacionaria ($P \leq 0.05$).

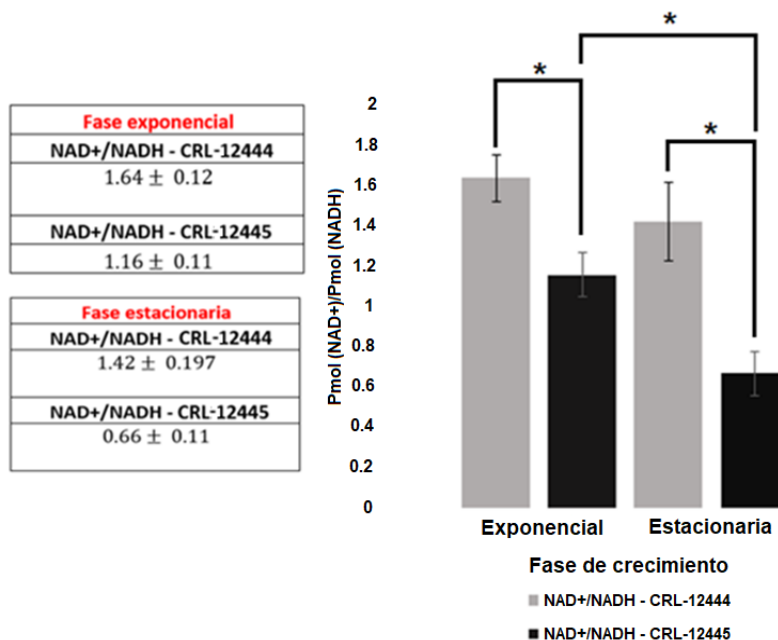


Fig. 26. Determinación de la relación NAD⁺/NADH (Pmol NAD⁺/Pmol NADH) durante las fases: exponencial y estacionaria. La denominada fase exponencial corresponde al día cuando se tomaron las muestras proteómicas. En gris los resultados correspondientes a la línea CRL-12444 y en negro a la clona CRL-12445. Los asteriscos indican parámetros que fueron significativamente diferentes (*: $p \leq 0.05$, prueba t).

Debido a la impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna al NAD^+ y al NADH , el NADH generado por la glucólisis en condiciones aeróbicas depende de la transferencia indirecta de equivalentes reductores a la mitocondria a través de la lanzadera de malato-aspartato (MAS) y la lanzadera de glicerol-fosfato (Kane, 2014). En el estudio de Pérez-Rodríguez et al., (2020b) y en el presente estudio se encontró la MDH1 sobreexpresada mientras que la MDH2 mitocondrial se encontró regulada a la baja, lo que indicaría que la lanzadera malato aspartato puede estar introduciendo componentes reductores a la matriz mitocondrial. Esto concordaría con los resultados ya que en la fase exponencial se encontró un estado más reductor en la línea CRL-12445. Por otra parte, es posible que, en la fase estacionaria, tras la activación del CK aumentara la cantidad de NADH , lo que generó una disminución de la relación NAD^+/NADH en contraste con la fase exponencial.

6.7.2 El número de mitocondrias no estaría asociado con la diferencia de productividad específica entre ambas clonas

En la fracción mitocondrial de la proteómica subcelular se encontraron varios marcadores proteicos relacionados a biogénesis mitocondrial expresados diferencialmente a la baja (FC ≥ 2 , FDR ≤ 0.05) en la línea CRL-12445 durante la fase de crecimiento exponencial (Figura 27). En el Anexo 4 (Figura 1), se muestra un mapa de calor con las veces de cambio de las proteínas involucradas en este proceso (FC ≥ 2 , FDR ≤ 0.05).

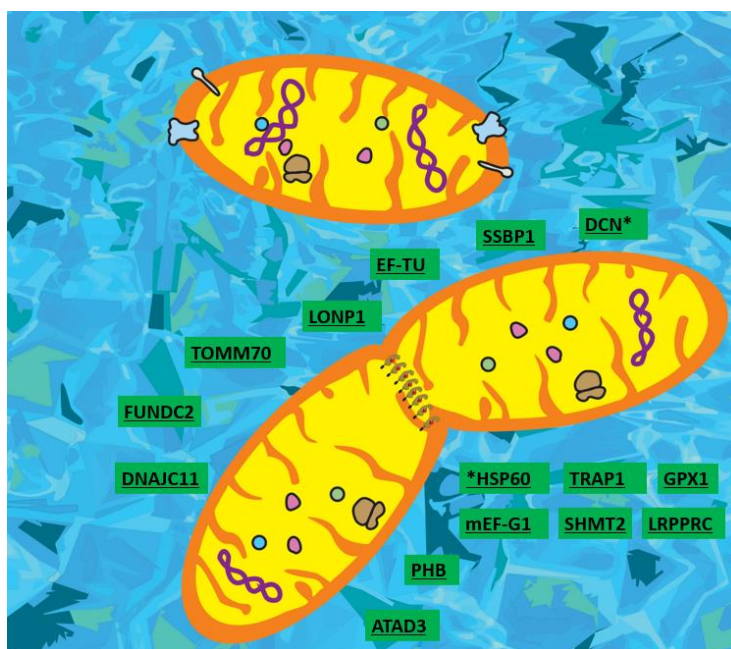


Fig. 27. Proteínas expresadas a la baja relacionadas con la biogénesis mitocondrial en las células CRL-12445 respecto a la línea CRL-12444. En verde los marcadores expresados a la baja. Las proteínas con un (*) en su nombre se encontraron en otros estudios proteómicos en células CHO productoras de diferentes tipos de proteínas recombinantes expresadas de manera diferencial. HSP60: Proteína de choque térmico de 60 kDa mitocondrial; TRAP1: Proteína 1 asociada al receptor de TNF; mEf-G1: Factor de elongación G mitocondrial; SHMT2: Serina Hidroximetiltransferasa 2; GPX1: Glutación peroxidasa 1; TOMM70: Translocasa de la membrana mitocondrial externa 70; FUNDC2: Proteína 2 que contiene el dominio FUN14; PHB: Prohibitina; EF-Tu: Factor de elongación termo inestable; SSBP1: Proteína de unión a ADN monocatenario mitocondrial; DNAJC11: Familia de proteínas de choque térmico DnaJ (Hsp40) Miembro C11; LONP1: Peptidasa Lon 1 mitocondrial; ATAD3: Proteína 3-dominio AAA de la familia ATPasa; LRPPRC: Proteína que contiene motivos PPR ricos en leucina mitocondrial; DCN: Decorina.

Los resultados proteómicos sugieren que la línea CRL-12445 podría tener un número menor de mitocondrias durante la fase exponencial de crecimiento al haber encontrado

expresadas a la baja proteínas involucradas en biogénesis mitocondrial. Para confirmarlo se llevó a cabo la cuantificación relativa de ADN mitocondrial mediante los genes *mit* y *16smt* usando el gen nuclear $\beta 2m$ como referencia.

Durante la fase exponencial, la cuantificación del número de copias mtADN usando el gen *mit* en la línea celular CRL-12445 (640.9 ± 150.84 copias de mtADN) no mostró una diferencia significativa ($P > 0.05$) respecto a la línea celular CRL-12444 (555.43 ± 127.23 copias de mtADN). Tampoco hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) en el número de copias de mtADN al usar el gen *16smt* ya que se determinó una cantidad de copias de mtADN de 660.26 ± 143.23 y 565.19 ± 63.64 , para la línea CRL-12445 y CRL-12444, respectivamente (Figura 28A, Tabla 11). Por otra parte, en la fase estacionaria tampoco hubo diferencias significativas usando ambos genes ($P > 0.05$) ya que para *mit* la línea CRL-12445 obtuvo un número de copias de mtADN de 236.01 ± 28.55 mientras que se determinó para la clona CRL-12444, 412.13 ± 131.83 copias de mtADN. Usando al gen *16smt* se cuantificaron 351.31 ± 143.84 copias de mtADN en la línea CRL-12445 y 514.38 ± 74.35 copias de mtADN en el caso de la clona CRL-12444 (Figura 28B, Tabla 11).

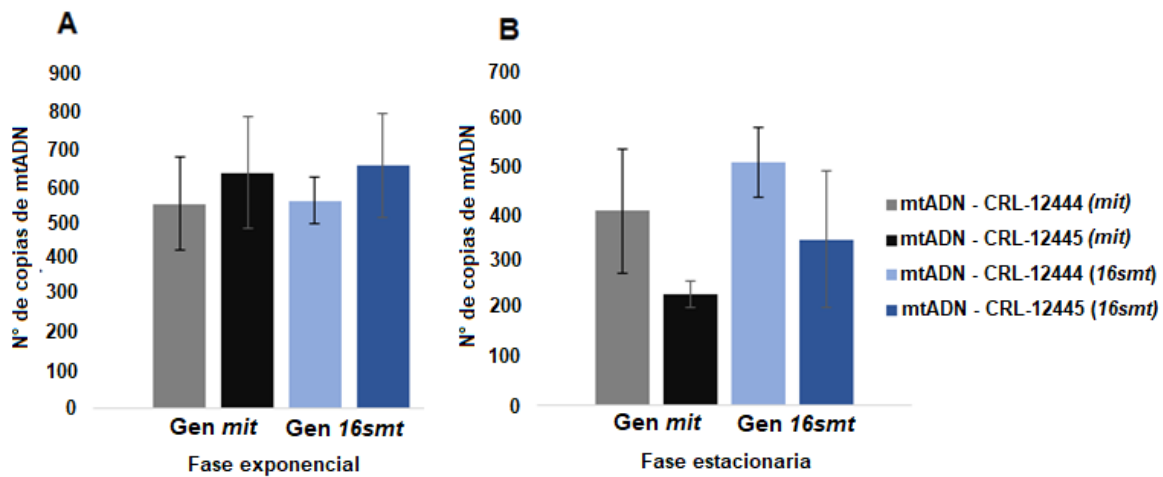


Fig. 28. Número de copias de ADN mitocondrial (mtADN) en las clonas CRL-12444 y CRL-12445 mediante dos genes mitocondriales (*mit* y *16smt*) y usando como referencia el gen $\beta 2m$ nuclear. En la figura A se muestran los resultados durante la fase exponencial, en escala de grises la cuantificación mediante el gen *mit* y en escala de azules usando el gen *16smt*. La denominada fase exponencial corresponde al día cuando se tomaron las muestras proteómicas. En la figura B se muestran los resultados durante la fase estacionaria, en escala de grises la mediante el gen *mit* y en escala de azules usando el gen *16smt*. En ambas fases de crecimiento no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) en la determinación de mtADN entre ambas clonas.

Se calculó el contenido de mtADN relativo dividiendo el contenido de mtADN de la línea CRL-12445 entre el contenido de mtADN de la línea celular control, en este caso, CRL-12444 para cada gen de interés (*mit* y *16smt*). Aunque no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre la cantidad de mtADN entre ambas líneas, los promedios del número de copias determinados por ambos genes mitocondriales mostraron que existió una diferencia de 1.15 (MIT) y 1.17 (16 S) veces mayor cantidad de mtADN en la línea CRL-12445 durante la fase exponencial de crecimiento en contraste con la clona CRL-12444 (Tabla 11). Sin embargo, en la fase estacionaria se determinó que la línea CRL-12445 posee 0.57 (MIT) y 0.68 (16 S) veces la cantidad del mtADN de la línea CRL-12444 (Tabla 11).

Tabla 11. Relación de ADN mitocondrial (mtADN) entre ambas clonas usando los genes *mit* y *16smt* durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria en ambos tipos celulares.

Parámetro	Fase exponencial	Fase estacionaria
^a $\Delta Ct_{CRL-12444} (mit)$	M1: 7.695 M2: 8.37 M3: 8.205	M1: 7.365 M2: 7.42 M3: 8.14
^b $\Delta Ct_{CRL-12444} (16smt)$	M1: 8.085 M2: 8.01 M3: 8.315	M1: 7.805 M2: 7.97 M3: 8.215
^c $\Delta Ct_{CRL-12445} (mit)$	M1: 8.015 M2: 8.66 M3: 8.22	M1: 6.345 M2: 6.665 M3: 7.42
^d $\Delta Ct_{CRL-12445} (16smt)$	M1: 8 M2: 8.64 M3: 8.39	M1: 7.05 M2: 7.085 M3: 8.015
^e $2 \times 2^{\Delta Ct} CRL - 12444 (mit)$	M1: 414.43 M2: 661.68 M3: 590.18 Promedio 555.43 ± 127.23	M1: 329.7 M2: 342.51 M3: 564.18 Promedio 412.13 ± 131.83
^f $2 \times 2^{\Delta Ct} CRL - 12444 (16smt)$	M1: 543.07 M2: 515.56 M3: 636.93 Promedio: 565.19 ± 63.64	M1: 447.27 M2: 501.46 M3: 594.28 Promedio: 514.38 ± 74.35
^g $2 \times 2^{\Delta Ct} CRL - 12445 (mit)$	M1: 517.35 M2: 809.01 M3: 596.34 Promedio: 640.9 ± 150.84	M1: 162.58 M2: 202.95 M3: 342.51 Promedio: 236.01 ± 28.55
^h $2 \times 2^{\Delta Ct} CRL - 12445 (16smt)$	M1: 512 M2: 797.86 M3: 670.92 Promedio: 660.26 ± 143.23	M1: 265.03 M2: 271.54 M3: 517.35 Promedio: 351.31 ± 143.84
Relación $\frac{mtADN_{CRL-12445} (mit)}{mtADN_{CRL-12444}}$	1.15	0.57
Relación $\frac{mtADN_{CRL-12445} (16smt)}{mtADN_{CRL-12444}}$	1.17	0.68

Se obtuvo el ΔCt para cada triplicado biológico en ambas líneas celulares mediante el promedio de un duplicado técnico para determinar el Ct de los tres genes evaluados. Posteriormente, se calculó el número de copias de mtADN para las clonas CRL-12444 y CRL-12445 usando los genes mitocondriales *mit* y *16smt*. El promedio del número de copias del triplicado biológico se usó para determinar el contenido relativo de mtADN de la línea CRL-12445 respecto a las células CRL-12444.

M: Matraz.

a: ΔCt para la línea CRL-12444 del gen *mit* respecto a $\beta 2m$ (variación de *mit* respecto a $\beta 2m$).

b: ΔCt para la línea CRL-12444 del gen *16smt* respecto a $\beta 2m$ (variación de *16smt* respecto a $\beta 2m$).

c: ΔCt para la línea CRL-12445 del gen *mit* respecto a $\beta 2m$ (variación de *mit* respecto a $\beta 2m$).

d: ΔCt para la línea CRL-12445 respecto al gen *16smt* respecto a $\beta 2m$ (variación de *16smt* respecto a $\beta 2m$).

e: N° de copias de mtADN para la línea CRL-12444 usando el gen *mit* respecto a $\beta 2m$.

f: N° de copias de mtADN para la línea CRL-12444 usando el gen *16smt* respecto a $\beta 2m$.

g: N° de copias de mtADN para la línea CRL-12445 usando el gen *mit* respecto a $\beta 2m$.

h: N° de copias de mtADN para la línea CRL-12445 usando el gen *16smt* respecto a $\beta 2m$.

Los resultados de la fase exponencial de crecimiento implicarían que, a pesar de la expresión a la baja de las proteínas involucradas en la biogénesis mitocondrial en la clona CRL-12445, poseería de 15 a 17% mayor cantidad de mitocondrias que la línea CRL-

12444. Por otra parte, en la fase estacionaria, la clona CRL-12445 tendría de 43 – 52% menor cantidad de mitocondrias que las células CRL-12444, lo que sugeriría que un mayor número de mitocondrias no podría estar asociado con un aumento en la qP. Este hecho pudiera indicar que las mitocondrias de la línea CRL-12445 son más eficientes en la producción de energía, por lo tanto, es posible que en esta fase haya una sobreexpresión de las rutas de ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones. Por otra parte, el hecho de que las células CRL-12445 mostraron casi un 20% mayor masa mitocondrial que las CRL-12444 durante la fase exponencial sugiere que las mitocondrias pudieran utilizarse para la producción de citrato con la finalidad de promover el crecimiento celular debido a la baja expresión de rutas generadoras de ATP y, una vez llegada la fase estacionaria, se eliminarían mitocondrias excedentes debido a que las células ya no se dividen y reprogramarían el metabolismo de estos organelos para enfocarse en la producción de PR durante la fase estacionaria.

6.8 Discusión sobre el estado redox (NAD⁺/NADH) y la cuantificación de ADN mitocondrial.

Los resultados indican que la relación NAD⁺/NADH de las células CRL-12445 fue significativamente menor ($P \leq 0.05$) en la fase estacionaria y en la fase de crecimiento exponencial en comparación con las células CRL-12444. Dichos resultados concuerdan con lo obtenido por Gupta et al., (2017) y Juárez et al., (2021) ya que se asocia una relación NAD⁺/NADH más reductora en las líneas celulares de mayor productividad (Gupta et al., 2017; Juárez et al., 2021). Por otra parte, aunque Wilkens y Gerdtzen, (2015) obtuvieron relaciones NAD⁺/NADH oxidantes en sus diferentes clonas CHO DP12 clone#1933 (CRL-12444), mencionan que las células CHO PYC pueden tener un metabolismo energético mejorado debido a que poseen un estatus redox más reductor que las líneas control. Esto se sustenta en que un aumento en la producción de NADH se ha relacionado con mejoras en el metabolismo energético debido a la acumulación de piruvato, así como con una disminución en la síntesis de lactato (Chong et al., 2010; Juárez et al., 2021). Este efecto podría ocurrir en la línea CRL-12445 ya que en la fase estacionaria las concentraciones de lactato quedaron prácticamente iguales.

Gupta et al., (2017) asociaron un estatus redox (NAD⁺/NADH) reductor y el aumento en la productividad con la sobreexpresión de PYC, ya que promovería un mayor transporte del NADH producido en citosol a la mitocondria a través de la lanzadera Malato-Aspartato, lo que aumentaría el metabolismo energético de la célula. El pool de NAD⁺ y NADH tiene un impacto directo en la función mitocondrial. La regulación de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa por el poder reductor se da a través de las sirtuinas. Las sirtuinas mitocondriales, SIRT3–5, participan en la regulación de la producción de ATP, el metabolismo, la apoptosis y la señalización celular (Verdin et al., 2010; Kim et al., 2006; Cimen et al., 2010; Law et al., 2009; Yang et al., 2010; Ahn et al., 2008). Su actividad puede aumentar cuando existe mucho NAD⁺ en la célula. La SIRT3 es capaz de regular la traducción mitocondrial y el acoplamiento de subunidades del transporte de electrones (Verdin et al., 2010; Yang et al., 2010; Ahn et al., 2008). SIRT4 interactúa con un translocador de nucleótidos de adenina cuya función es intercambiar ATP al citosol y ADP a la matriz mitocondrial, con la finalidad de proveer de sustrato al complejo V. SIRT5 solo interactúa con el citocromo C (Ahuja et al., 2007; Verdin et al., 2010). Las sirtuinas también poseen una relación estrecha con enzimas involucradas con el ciclo de Krebs ya que son capaces de regular su función y actividad (Verdin et al., 2010; Kim et al., 2006; Cimen et al., 2010; Law et al., 2009; Yang et al., 2010; Ahn et al., 2008).

Las sirtuinas juegan un papel clave en la activación del acarreador de piruvato mitocondrial (MPC) mediante modificaciones postraduccionales. La sirtuina 3 (SIRT3) es la encargada de desacetilar MPC1 y aumentar potencialmente su actividad (Liang et al., 2015). Un estudio en ratones mostró que la inactivación de SIRT3, produce un aumento drástico de glucólisis y una disminución en el metabolismo oxidativo, lo que indica que el transporte de piruvato podría verse afectado debido a la elevada acetilación de MPC (Fernández y Eaton, 2021). El metabolismo generado por la inactivación de la SIRT3 es similar al observado en células CHO. Es posible que la disminución de la relación $NAD^+/NADH$ de la fase exponencial a la estacionaria en las células CRL-14445 se deba a que en la fase exponencial se requiere un estatus más oxidante para la activación de las sirtuinas se lleve a cabo la activación del MPC y de los complejos de la cadena de transporte de electrones en la fase estacionaria con el fin de promover un estatus energético más dependiente del ciclo de Krebs para generar mayor cantidad de la PR.

Las mitocondrias participan en su propia replicación mediante fisión binaria (Voet y Pratt, 2016) y contienen varias copias de DNA circular (mtDNA) (Devlin, 2004; Voet y Pratt, 2016). En la literatura se reportó un posible aumento en el número de mitocondrias en células de mayor productividad de GFP (Nissom et al., 2006). En otro estudio se asoció el aumento en la masa mitocondrial con el aumento en la productividad (Bi et al., 2004). Yusufi et al., (2017) encontró un incremento en el número de copias de genes mitocondriales en células CHO productoras de PR (Yusufi et al., 2017). En la literatura se encontró que al transfectar la línea CRL-12445 con un miRNA existió mejora en la productividad de PR y que hubo un mayor contenido mitocondrial respecto a la línea parental (Martínez-López et al., 2021). En este estudio, los resultados indicaron una diferencia no significativa ($P > 0.05$) del 15 al 17% de mayor contenido de mtADN en la línea CRL-12445 que en la CRL-12444 durante la fase exponencial, a pesar de que en la proteómica subcelular se encontraron a la baja diferentes proteínas asociadas a la biogénesis mitocondrial. Esto puede indicar que la línea CRL-12445, en principio, posee una mayor cantidad de mitocondrias y que esta diferencia puede aportar mayores niveles de citrato para promover la división celular. En la fase estacionaria, la clona CRL-12445 tuvo de 43 – 52% menor cantidad de mitocondrias que las células CRL-12444 lo que indicaría que posee mitocondrias más eficientes durante la fase estacionaria, brindando mayor cantidad de energía requerida para la producción de PR ya que el título de anticuerpo aumentó 5.4 veces de la fase exponencial a la estacionaria. Los resultados concordaron con la literatura en que durante la fase exponencial existen una mayor cantidad de mitocondrias. Es posible que la disminución de mitocondrias durante la fase estacionaria de la línea de mayor productividad se deba a que en esta fase se activan procesos de autofagia debido al agotamiento de nutrientes (Aguilar-López y Funes, 2019). Además, se ha reportado que en células CHO recombinantes la autofagia es usualmente activada en la fase estacionaria en cultivos en lote (Kim et al., 2013).

7 CONCLUSIONES

Los resultados de la caracterización cinética y estequiométrica concordaron con los obtenidos por Pérez-Rodríguez et al., (2020b) tanto en el comportamiento de la velocidad de crecimiento, la productividad, las curvas de consumo de glucosa y producción de lactato, amonio y glutamato como los valores de q_{Glc} , q_{Lac} , q_{Glu} y $q_{NH_4^+}$. En ambos estudios, la línea CRL-12444 de menor productividad tuvo un μ mayor y un tiempo de duplicación menor que la línea CRL-12445. En el caso de la q_P la línea CRL-12445 produjo aproximadamente 25 veces más PR que la línea CRL-12444 y tampoco hubo diferencias significativas entre los estudios.

En este estudio se analizaron de forma distinta los datos proteómicos reportados por Pérez – Rodríguez et al., (2020b) donde aplicaron centrifugación diferencial e isopícnica para enriquecer organelos poco representados en células CHO productoras de un anticuerpo monoclonal con una diferencia de 26 veces en su q_P . Se hizo énfasis en la “fracción mitocondrial” para la identificación de proteínas involucradas en el metabolismo energético mitocondrial asociadas con el incremento de la productividad específica. De las 150 proteínas expresadas diferencialmente entre la línea CRL-12445 y la línea CRL-12444, solo 17 correspondieron al metabolismo energético mitocondrial. Además, se detectaron de 6.1 a 7.5 veces más marcadores proteicos mitocondriales solo en la fracción mitocondrial del estudio proteómico subcelular que dos estudios proteómicos previos con un enfoque de análisis de célula completa. La cobertura del análisis proteómico subcelular empleado en este proyecto fue de 20.5% alcanzando alrededor del doble que en los estudios de célula completa. Por lo tanto, la aplicación de un proceso de proteómica subcelular puede ser una herramienta más eficaz en comparación con las metodologías proteómicas de análisis de células completas para detectar proteínas de organelos con baja representación.

El análisis proteómico diferencial mostró que algunas proteínas del ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones, se encontraron reguladas a la baja en las células CRL-12445 de mayor productividad de PR en comparación de las células CRL-12444 durante la fase exponencial de crecimiento. Por otra parte, la mayoría de las proteínas identificadas de la glucólisis se encontraron al alza. Debido a que hubo un cambio de 5.4 veces en el título de PR de la fase exponencial a la fase estacionaria en la línea CRL-12445 y, que las células CHO poseen plasticidad metabólica, es posible que la activación de un mayor metabolismo oxidativo durante la fase estacionaria esté asociada con una mayor producción de PR.

Se validó el estudio proteómico mediante el análisis de las proteínas aconitasa (ACO2), 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa (HIBADH), histona H3 (H3) y la proteína de choque térmico de 60 kDa mitocondrial (HSP60) por densitometría en Western Blots cuyas acumulaciones diferenciales fueron acordes a los resultados proteómicos realizados en la fase exponencial. Por otra parte, se evaluó como control la proteína 78 regulada por glucosa (GRP78) y no mostró diferencia significativa en la proteómica ni en el análisis de Western blot.

La actividad enzimática de la citrato sintasa (CS) fue 3 veces mayor en las líneas de mayor productividad durante la fase exponencial de crecimiento, lo que concuerda con los datos proteómicos. Por lo tanto, el Western blot y la medición de actividad enzimática fueron útiles para la validación de datos proteómicos.

La proporción $NAD^+/NADH$ fue significativamente menor en el clon CRL-12445 en las fases de crecimiento exponencial y estacionaria en comparación con las células de menor productividad. Por lo tanto, un estatus redox reductor podría estar asociado con una mayor productividad.

Durante la fase de crecimiento exponencial se encontraron marcadores proteicos que promueven la biogénesis mitocondrial a la baja en las células CRL-12445. Además, no hubo diferencia significativa de copias de ADN mitocondrial entre ambas líneas celulares, en esta fase de crecimiento. Sin embargo, la línea de mayor productividad tuvo menor cantidad de contenido de ADN mitocondrial durante la fase estacionaria, indicando que la cantidad de mitocondrias no estaría asociada a una mayor producción de PR y que dependería más de una sobreexpresión de rutas metabólicas asociadas a la generación de ATP para una mayor eficiencia en la producción de energía.

Las proteínas identificadas como expresadas diferencialmente son biomarcadores útiles para preseleccionar clones de líneas celulares o para que puedan manipularse con el objetivo generar un fenotipo celular más productor en células CHO recombinantes que producen PR.

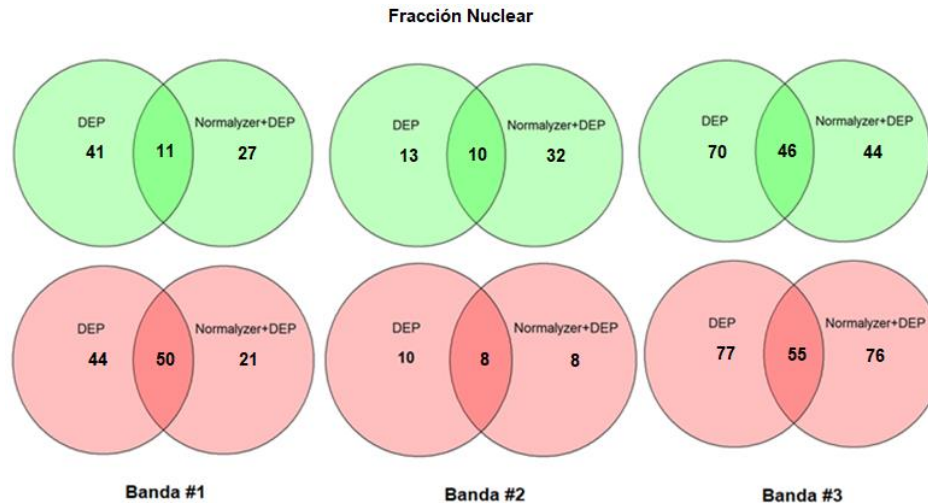
8 PERSPECTIVAS

En este estudio se analizaron datos proteómicos provenientes de un proceso de enriquecimiento de organelos poco representados en dos líneas de células CHO con diferentes niveles de productividad. Debido a que se obtuvo una mayor cobertura en la detección de proteínas del proteoma de las células CHO y que la detección de proteínas mitocondriales fue mayor que los estudios de célula completa, se propone realizar un nuevo proceso de proteómica subcelular con la finalidad de analizar la fase estacionaria. Lo anterior se plantea debido a que existió un aumento de PR de aproximadamente 5.4 veces en la línea de mayor productividad durante la fase estacionaria en comparación con la fase exponencial. Dado que varios estudios indican la plasticidad metabólica de las células CHO productoras de PR de pasar de un estado altamente glucolítico en la fase exponencial a un metabolismo oxidante donde se activa el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones para una mayor producción de la PR. El análisis proteómico subcelular durante la fase estacionaria serviría para corroborar si el ciclo de Krebs en conjunto con otras rutas relacionadas con el metabolismo energético se sobreexpresan para producir mayor cantidad de PR. Por lo tanto, sería posible determinar cuáles son las enzimas o marcadores proteicos que puedan relacionarse con un incremento en la qP. Este nuevo análisis sería útil para comparar los resultados de Pérez-Rodríguez et al., (2020b) en lo que respecta a la vía de secreción clásica y al estudio de la fracción microsomal. Para validar los resultados obtenidos en la proteómica, en lo que refiere al ciclo de Krebs, se pueden llevar a cabo técnicas como análisis de flujo metabólico (MFA por sus siglas en inglés) y mediciones de actividad enzimática de otras enzimas durante la fase de crecimiento exponencial y en la estacionaria. Por otra parte, para evaluar si la cadena de transporte de electrones se encuentra regulada a la baja durante la fase exponencial y se activa durante la fase estacionaria, se pueden realizar análisis de potencial de membrana mitocondrial mediante el tinte catiónico Mitotracker Red (Cottet-Rousselle et al., 2011; Kholmukhamedov et al., 2013; Martínez-López et al., 2021) y por respirometría (Martínez-López et al., 2021). Otros estudios para determinar si la relación $NAD^+/NADH$ sería relevante, como cuantificar el NADH de ambas líneas celulares mediante el uso de microscopía multifotónica aprovechando su fluorescencia intrínseca (Balu et al., 2013).

Además de las aplicaciones expuestas relacionadas con las células CHO, los procedimientos de fraccionamiento subcelular podrían realizarse en otros tipos de células como levaduras y bacterias con la finalidad de determinar los mecanismos o rutas metabólicas que pueden relacionarse con fenotipos de alta productividad.

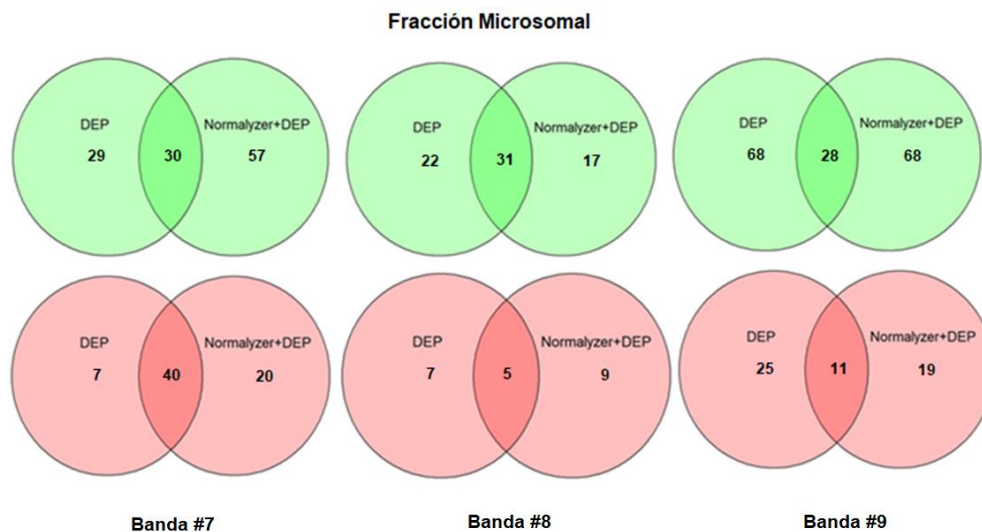
9 ANEXOS

9.1 Anexo 1. Diagramas de Venn de los análisis de convergencia en las fracciones nuclear, microsomal y el citosol.



Anexo 1. Fig. 1. Diagramas de Venn de la cantidad de proteínas diferenciales que convergieron entre DEP y Normalizer + DEP en la fracción nuclear (Banda B1 – B3).

Los diagramas en rojo y verde representan el número de marcadores expresados diferencialmente al alza y a la baja, respectivamente, en la línea CRL-12445 respecto a los de la línea CRL-12444. Los precipitados: nuclear, mitocondrial y microsomal, obtenidos de la centrifugación diferencial, fueron solubilizados en 0.25 M de sacarosa, se centrifugaron en los gradientes de sacarosa a 154693 x g durante 3 h a 4°C. Los gradientes para los precipitados nuclear y mitocondrial se adaptaron a 1 mL de 60% y 3 mL de 55, 40 y 30% (p/v) de sacarosa (Graham, 2004). El precipitado microsomal se separó en un nuevo gradiente de 1 mL de 60% y 2.5 mL de 45, 35, 30 y 10% (m/v) de sacarosa (Tomado de Pérez-Rodríguez et al., 2020b). Cada banda se nombró acorde el precipitado. B1 – B3 son las bandas o fracciones obtenidas en la centrifugación por gradiente de sacarosa para el precipitado nuclear, las bandas o fracciones B4 – B6 corresponden al precipitado mitocondrial y las bandas o fracciones B7 – B9 para el precipitado microsomal. Revisar las Figuras 5 y 6, para más detalles.

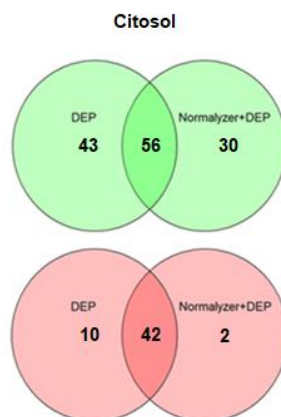


Anexo 1. Fig. 2. Diagramas de Venn de la cantidad de proteínas diferenciales que convergieron entre DEP y Normalizer + DEP en la fracción microsomal (B7 – B9).

Los diagramas en rojo y verde representan el número de marcadores expresados diferencialmente al alza y a la baja, respectivamente, en la línea CRL-12445 respecto a los de la línea CRL-12444. Los precipitados: nuclear, mitocondrial y

microsomal, obtenidos de la centrifugación diferencial, fueron solubilizados en 0.25 M de sacarosa, se centrifugaron en los gradientes de sacarosa a 154693 x g durante 3 h a 4°C. Los gradientes para los precipitados nuclear y mitocondrial se adaptaron a 1 mL de 60% y 3 mL de 55, 40 y 30% (p/v) de sacarosa (Graham, 2004). El precipitado microsomal se separó en un nuevo gradiente de 1 mL de 60% y 2.5 mL de 45, 35, 30 y 10% (m/v) de sacarosa (Tomado de Pérez-Rodríguez et al., 2020b).

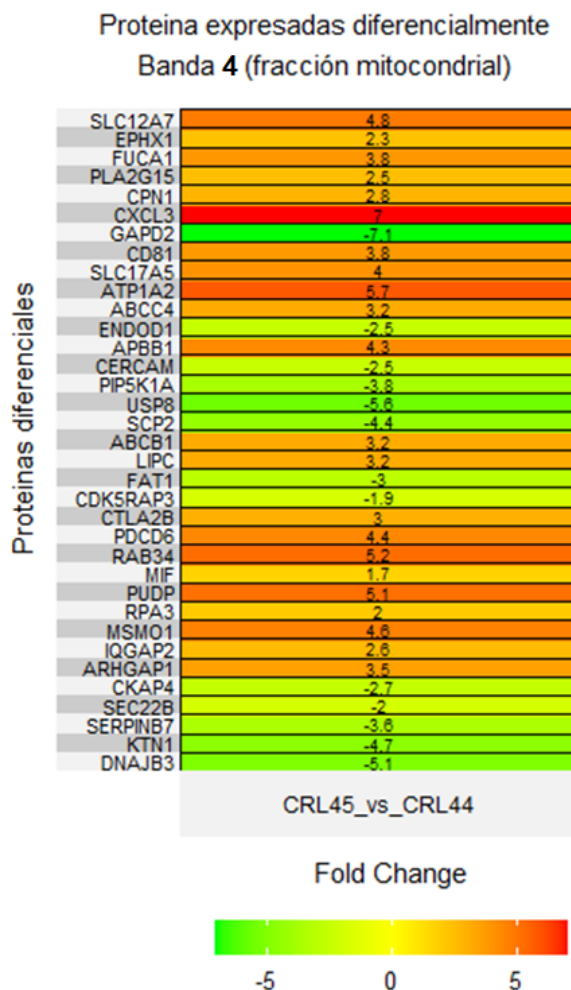
Cada banda se nombró acorde el precipitado. B1 – B3 son las bandas o fracciones obtenidas en la centrifugación por gradiente de sacarosa para el precipitado nuclear, las bandas o fracciones B4 – B6 corresponden al precipitado mitocondrial y las bandas o fracciones B7 – B9 para el precipitado microsomal. Revisar las Figuras 5 y 6, para más detalles.



Anexo 1. Fig. 3. Diagramas de Venn de la cantidad de proteínas diferenciales que convergieron entre DEP y Normalyzer + DEP en el citosol.

Los diagramas en rojo y verde representan el número de marcadores expresados diferencialmente al alza y a la baja, respectivamente, en la línea CRL-12445 respecto a los de la línea CRL-12444.

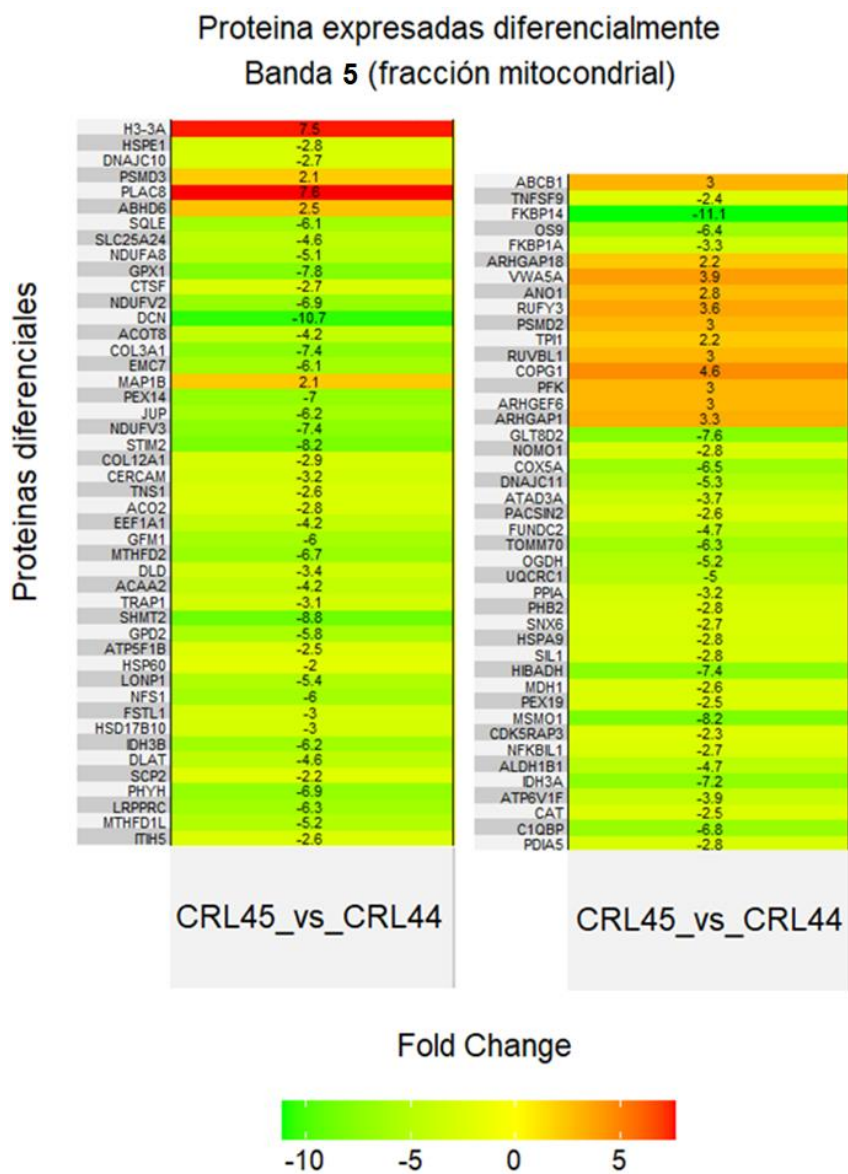
9.2 Anexo 2. Mapas de calor de las proteínas totales expresadas diferencialmente e identificadas exclusivamente en la fracción mitocondrial.



Anexo 2. Fig. 1. Mapa de calor de las proteínas totales expresadas diferencialmente en la banda #4 de la fracción mitocondrial.

Se muestran en rojo las proteínas aumentadas en la línea CRL-12445 con respecto a la línea CRL-12444, y en verde las disminuidas. Los valores mostrados en el centro de cada fila corresponden al valor de veces de cambio en la acumulación del marcador en cuestión en la proteómica diferencial. Los precipitados: nuclear, mitocondrial y microsomal, obtenidos de la centrifugación diferencial, fueron solubilizados en 0.25 M de sacarosa, se centrifugaron en los gradientes de sacarosa a 154693 x g durante 3 h a 4°C. Los gradientes para los precipitados nuclear y mitocondrial se adaptaron a 1 mL de 60% y 3 mL de 55, 40 y 30% (p/v) de sacarosa (Graham, 2004). El precipitado microsomal se separó en un nuevo gradiente de 1 mL de 60% y 2.5 mL de 45, 35, 30 y 10% (m/v) de sacarosa (Tomado de Pérez-Rodríguez et al., 2020b). Cada banda se nombró acorde el precipitado. B1 – B3 son las bandas o fracciones obtenidas en la centrifugación por gradiente de sacarosa para el precipitado nuclear, las bandas o fracciones B4 – B6 corresponden al precipitado mitocondrial y las bandas o fracciones B7 – B9 para el precipitado microsomal. Revisar las Figuras 5 y 6, para más detalles. SLC12A7: Miembro 7 de la familia de portadores de solutos 12; EPHX1: Epóxido hidrolasa 1; FUCA1: Alfa-L-fucosidasa; PLA2G15: Fosfolipasa A2 del grupo XV; CPN1: Cadena catalítica de la carboxipeptidasa N; CXCL3: Quimiocina ligando 3 con motivo C-X-C; GAPD2: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; CD81: Grupo de diferenciación 81; SLC17A5: Sialina, ATP1A2: Subunidad alfa-2 de la ATPasa de transporte de potasio y sodio; ABCC4: Miembro 4 de la subfamilia C de casete de unión a ATP; ENDOD1: Endonucleasa que contiene dominio 1; APBB1: Miembro 1 de la familia B de unión a proteína precursora de amiloide beta A4; CERCAM: Molécula de adhesión de células endoteliales cerebrales; PIP5K1A: Fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinasa tipo-1 alfa; USP8: Peptidasa específica de ubiquitina 8; ABCB1: Glucoproteína-P1; LIPC: Lipasa hepática; FAT1: FAT Cadherina atípica 1; CDK5RAP3: Proteína 3 asociada a la subunidad reguladora CDK5; CTLA2B: Proteína 2-beta asociada a linfocitos T citotóxicos; PDCD6: Proteína de muerte celular programada 6; RAB34: Proteína relacionada con Ras Rab-34; MIF: Factor inhibidor de la migración de macrófagos; PUDP: Pseudouridina 5'-fosfatasa; RPA3: Proteína de replicación A subunidad de 14 kDa; MSMO1: Metilsterol monooxigenasa 1; IQGAP2: Proteína activadora de

GTPasa 2 que contiene motivo IQ; ARHGAP1: Proteína activadora de la GTPasa Rho 1; CKAP4: Proteína 4 asociada al citoesqueleto; SEC22B: Homólogo B de la proteína de tráfico de vesículas SEC22; SERPINB7: Miembro 7 de la Familia B Serpin; KTN1: Cinectina; DNAJB3: Miembro 3 de la subfamilia B homóloga a DnaJ.

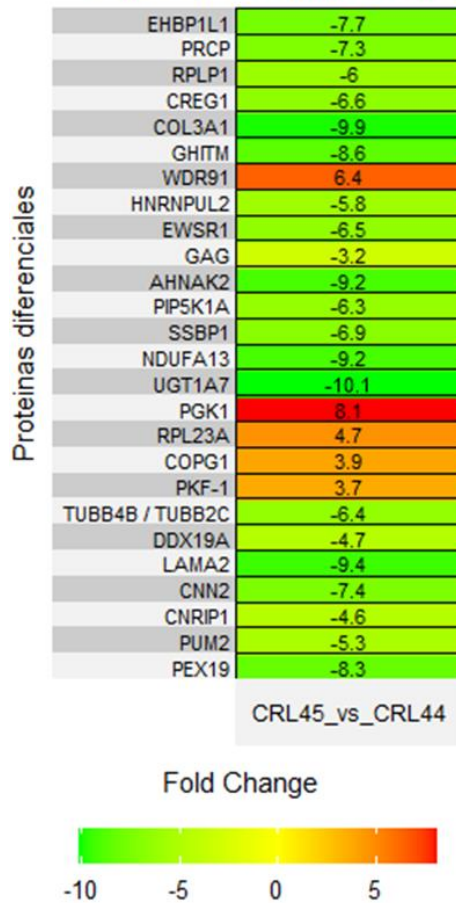


Anexo 2. Fig. 2. Mapa de calor de las proteínas totales expresadas diferencialmente en la banda #5 de la fracción mitocondrial.

Se muestran en rojo las proteínas aumentadas en la línea CRL-12445 con respecto a la línea CRL-12444, y en verde las disminuidas. Los valores mostrados en el centro de cada fila corresponden al valor de veces de cambio en la acumulación del marcador en cuestión en la proteómica diferencial. Los precipitados: nuclear, mitocondrial y microsomal, obtenidos de la centrifugación diferencial, fueron solubilizados en 0.25 M de sacarosa, se centrifugaron en los gradientes de sacarosa a 154693 x g durante 3 h a 4°C. Los gradientes para los precipitados nuclear y mitocondrial se adaptaron a 1 mL de 60% y 3 mL de 55, 40 y 30% (p/v) de sacarosa (Graham, 2004). El precipitado microsomal se separó en un nuevo gradiente de 1 mL de 60% y 2.5 mL de 45, 35, 30 y 10% (m/v) de sacarosa (Tomado de Pérez-Rodríguez et al., 2020b). Cada banda se nombró acorde el precipitado. B1 – B3 son las bandas o fracciones obtenidas en la centrifugación por gradiente de sacarosa para el precipitado nuclear, las bandas o fracciones B4 – B6 corresponden al precipitado mitocondrial y las bandas o fracciones B7 – B9 para el precipitado microsomal. Revisar las Figuras 5 y 6, para más detalles. H3-3A: Histona H3; HSPE1/HSP60: Proteína de choque térmico de 60 kDa mitocondrial; DNAJC10: Familia de proteínas de choque térmico DnaJ (Hsp40) Miembro C10; PSMD3: Subunidad 3 reguladora del proteasoma 26S no ATPasa; PLAC8: Proteína 8 asociada a placenta; ABHD6: 2-araquidonilglicerol hidrolasa que contiene dominio alfa/beta-hidrolasa; SQLE: Escualeno monooxigenasa; SLC25A24: Proteína transportadora mitocondrial de unión a calcio SCAmC-1; NDUFA8: NADH Deshidrogenasa [Ubiquinona] 1 Subcomplejo Alfa Subunidad 8; GPX1: Glutatión peroxidasa 1; CTSF: Catepsina F; NDUFV2: NADH Deshidrogenasa

(Ubiquinona) Flavoproteína 2; DCN: Decorina; ACOT8: Acilcoenzima A tioesterasa 8; COL3A1: Cadena alfa 1 de colágeno tipo III; EMC7: Subunidad 7 del complejo proteico de la membrana del Retículo Endoplásmico; MAP1B: Proteína 1B asociada a los microtúbulos; PEX14: Proteína de membrana peroxisomal 14; JUP: Plakoglobina de unión o gamma-catenina; NDUFV3: NADH Deshidrogenasa (Ubiquinona) Flavoproteína 3; STIM2: Molécula de interacción con el estroma 2; COL12A1: Cadena de colágeno alfa-1(XII); CERCAM: Molécula de adhesión de células endoteliales cerebrales; TNS1: Tensina-1; ACO2: Aconitasa 2 mitocondrial; EEF1A1/EF-Tu: Factor eucarionte de elongación de la traducción 1 Alfa 1; GFM1/mtEf-G1: Factor de elongación G de traducción mitocondrial; MTHFD2: Metileno tetrahidrofolato deshidrogenasa 2; DLD: Dihidrolipoil deshidrogenasa; ACAA2: 3-Cetoacil-CoA tiasa; TRAP1: Proteína 1 asociada al receptor de TNF; SHMT2: Serina Hidroximetiltransferasa 2; GPD2: Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2 mitocondrial; ATP5F1B: Subunidad beta de la sección F1 de la ATP sintasa; HSP60 Proteína de choque térmico de 60 kDa mitocondrial; LONP1: Peptidasa Lon 1 mitocondrial; NFS1: Cisteína desulfurasa mitocondrial; FSTL1: Proteína 1 relacionada con la folistatina; HSD17B10: 3-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa tipo 2; IDH3β: Subunidad beta de la isocitrato deshidrogenasa; DLAT: Dihidrolipoamida acetiltransferasa; SCP2: Proteína transportadora de esteroides 2; PHYH: Fitanoil-CoA 2-hidroxilasa; LRPPRC: Proteína que contiene motivos PPR ricos en leucina mitocondrial; MTHFD1L: Tetrahidrofolato sintasa monofuncional C1 mitocondrial; ITIH5: Cadena pesada del inhibidor de la inter-alfa-tripsina 5; ABCB1: Glucoproteína-P1; TNFSF9: Miembro 9 de la superfamilia TNF; FKBP14: Peptidil-Protil Cis-Trans Isomerasa FKBP14; OS9: Osteosarcoma amplificado 9 – lectina del retículo endoplásmico; FKBP1A: Peptidil-protil cis-trans isomerasa FKBP1A; ARHGAP18: Proteína 18 activadora de la GTPasa Rho; VWA5A: Factor A Von Willebrand que contiene el dominio 5A; ANO1: Anoctamina-1; RUFY3: Proteína 3 que contiene el dominio RUN y FYVE; PSM2: Subunidad reguladora 2 no ATPasa del proteasoma 26S; TPI1/TPIS: Triosa fosfato isomerasa; RUVBL1: Proteína 1 similar a RuvB; COPG1: Subunidad gamma 1 del complejo de la capa COPI; PFK-1: Fosfofructoquinasa-1; ARHGEF6: Factor 6 de intercambio de nucleótidos de guanina Rho; ARHGAP1: Proteína 18 activadora de la GTPasa Rho; GLT8D2: Proteína 2 que contiene el dominio glicosiltransferasa 8; NOMO1: Modulador nodal 1; COX5A: Subunidad 5A del complejo citocromo c oxidasa mitocondrial; DNAJC11: Familia de proteínas de choque térmico DnaJ (Hsp40) Miembro C11; ATAD3A: Proteína 3 que contiene el dominio AAA de la familia ATPasa; PACSIN2: Proteína 2 quinasa C y sustrato de caseína quinasa en neuronas; FUNDC2: Proteína 2 que contiene el dominio FUN14; TOMM70: Translocasa de la membrana mitocondrial externa 70; OGDH/αKGDH: α-Cetoglutarato deshidrogenasa; UQCRC1: Subunidad 1 del complejo citocromo b-c1 mitocondrial; PPIA: Peptidil-protil cis-trans isomerasa A; PHB2: Prohibitina-2; SNX6: Sorting nexina 6; HSPA9/HSP70: Proteína de choque térmico mitocondrial de 70 kDa; SIL1: Factor de intercambio de nucleótidos SIL1; HIBADH: 3-Hidroxiisobutirato deshidrogenasa; MDH2: Malato deshidrogenasa de citosol; PEX19: Factor de biogénesis peroxisomal 19; MSMO1: Metilsterol monooxigenasa 1; CDK5RAP3: Proteína 3 asociada a la subunidad reguladora CDK5; NFKBIL1: Proteína 2 de reparación de ADN similar a Tonkotsu; ALDH1B1: Aldehído deshidrogenasa 1 miembro de la familia mitocondrial B1; IDH3α: Subunidad alfa de la isocitrato deshidrogenasa; ATP6V1F: Subunidad F de la ATPasa protónica de tipo V; CAT: Catalasa; C1QBP: Componente del complemento 1 Proteína de unión al subcomponente Q mitocondrial; PDIA5: Proteína Disulfuro Isomerasa Familia A Miembro 5.

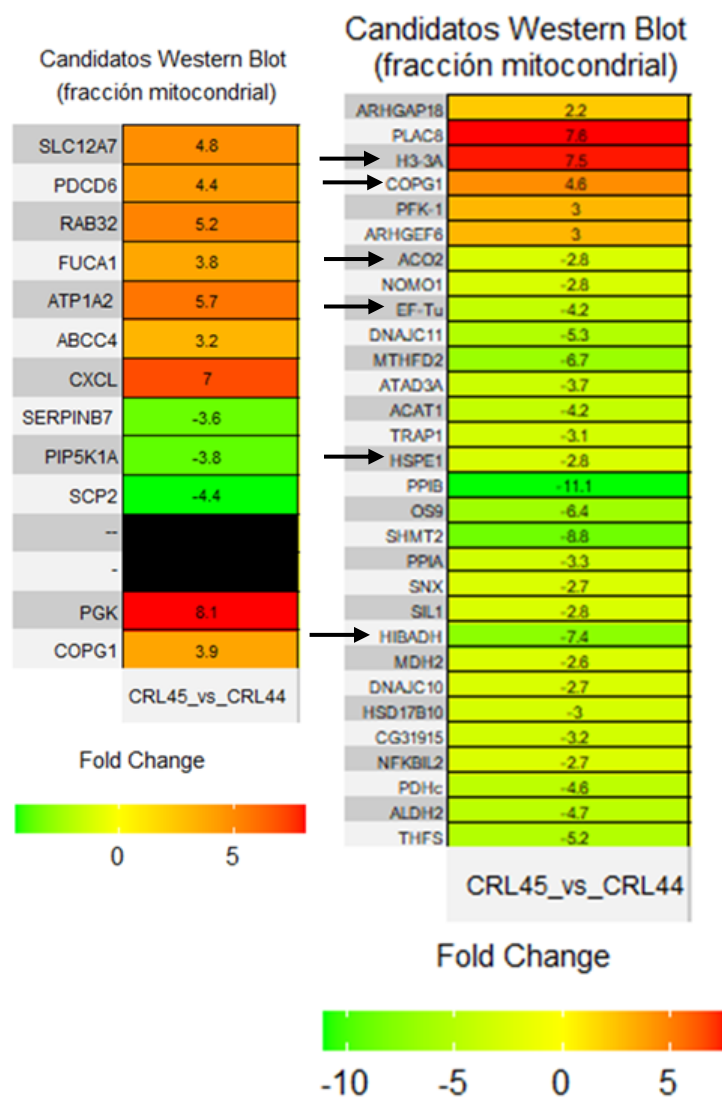
Proteína expresadas diferencialmente
Banda 6 (fracción mitocondrial)



Anexo 2. Fig. 3. Mapa de calor de las proteínas totales expresadas diferencialmente en la banda #6 de la fracción mitocondrial.

Se muestran en rojo las proteínas aumentadas en la línea CRL-12445 con respecto a la línea CRL-12444, y en verde las disminuidas. Los valores mostrados en el centro de cada fila corresponden al valor de veces de cambio en la acumulación del marcador en cuestión en la proteómica diferencial. Los precipitados: nuclear, mitocondrial y microsomal, obtenidos de la centrifugación diferencial, fueron solubilizados en 0.25 M de sacarosa, se centrifugaron en los gradientes de sacarosa a 154693 x g durante 3 h a 4°C. Los gradientes para los precipitados nuclear y mitocondrial se adaptaron a 1 mL de 60% y 3 mL de 55, 40 y 30% (p/v) de sacarosa (Graham, 2004). El precipitado microsomal se separó en un nuevo gradiente de 1 mL de 60% y 2.5 mL de 45, 35, 30 y 10% (m/v) de sacarosa (Tomado de Pérez-Rodríguez et al., 2020b). Cada banda se nombró acorde el precipitado. B1 – B3 son las bandas o fracciones obtenidas en la centrifugación por gradiente de sacarosa para el precipitado nuclear, las bandas o fracciones B4 – B6 corresponden al precipitado mitocondrial y las bandas o fracciones B7 – B9 para el precipitado microsomal. Revisar las Figuras 5 y 6, para más detalles. EHBP1L1: Proteína similar a la proteína 1 de unión al dominio EH; PRCP: Carboxipeptidasa lisosomal; RPLP1: Proteína P1 ribosómica ácida 60S; CREG1: Represor celular 1 de genes estimulados de E1A; COL3A: Cadena alfa 1 de colágeno tipo III; GHITM: Proteína transmembrana inducible por hormona de crecimiento; WDR91: Proteína 91 que contiene repeticiones WD; HNRNPUL2: Ribonucleoproteína nuclear heterogénea U tipo 2; EWSR1: Proteína de unión a ARN EWS; GAG: Antígeno específico de grupo; AHNAK2: Nucleoproteína asociada a la diferenciación de neuroblastos; PIP5K1A: Fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa tipo 1 alfa; SSBP1: Proteína de unión a ADN monocatenario mitocondrial; NDUFA13: NADH Deshidrogenasa [Ubiquinona] 1 Subcomplejo Alfa Subunidad 13; UGT1A7: UDP glucuronosiltransferasa 1 polipéptido A7; PGK1: Fosfoglicerato quinasa, RPL23A: Proteína Ribosomal L23; COPG1: Subunidad gamma 1 del complejo de la capa COPI; PFK-1: Fosfofructoquinasa-1; TUBB4B: cadena tubulina beta-4B; DDX19A: Helicasa DEAD-Box 19A; LAMA2: Subunidad alfa-2 en la laminina 2; CNN2: Calponina 2; CNRIP1: Proteína 1 que interactúa con el receptor cannabinoide; PUM2: Miembro de la familia de unión a ARN de Pumilio; PEX19: Factor de biogénesis peroxisomal 19.

9.3 Anexo 3. Mapa de calor de las proteínas que convergieron entre las tres metodologías de imputación pertenecientes a la “fracción mitocondrial”.

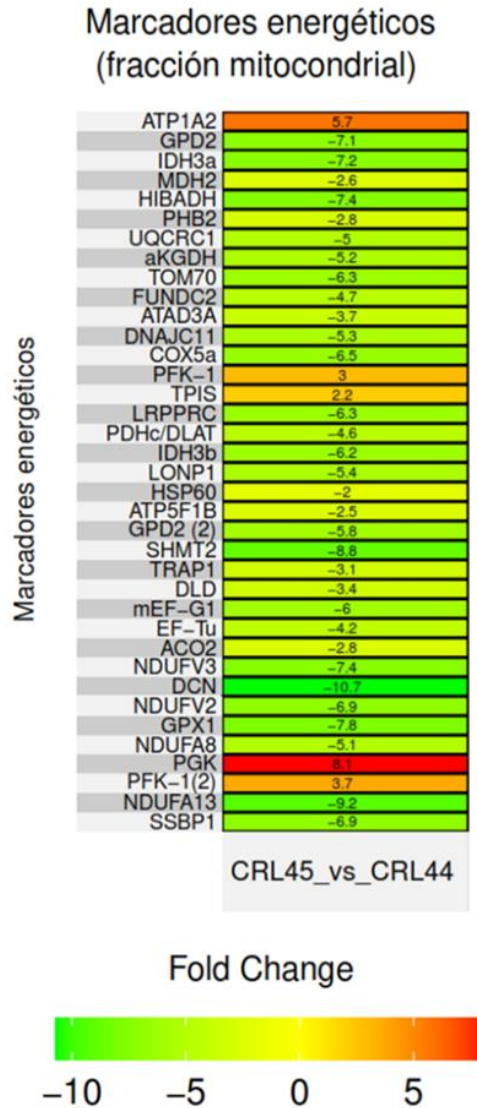


Anexo 3. Fig. 1. Mapa de calor de las proteínas expresadas diferencialmente que convergieron en las tres metodologías de imputación consideradas como candidatas para la validación del análisis proteómico.

Con flechas las proteínas que se seleccionaron para su evaluación en WB y que cumplieron con las condiciones de expuestas en la sección 5.3.1 de “Materiales y Métodos”. Además de estos marcadores de interés, se muestran los identificados para la ruta de glucólisis debido a su relación directa con la producción de energía. Se muestran en rojo las proteínas aumentadas en la línea CRL-12445 con respecto a la línea CRL-12444, y en verde las disminuidas. Los valores mostrados en el centro de cada fila corresponden al valor de veces de cambio en la acumulación del marcador en cuestión en la proteómica diferencial. SLC12A7: Miembro 7 de la familia de portadores de solutos 12; PDCD6: Proteína de muerte celular programada 6; RAB32: Proteína relacionada con Ras Rab-32; FUCA1: Alfa-L-fucosidasa; ATP1A2: Subunidad alfa-2 de la ATPasa de transporte de potasio y sodio; ABCC4: Miembro 4 de la subfamilia C de casete de unión a ATP; CXCL: Quimiocina ligando 1 con motivo C-X-C; SERPINB7: Miembro 7 de la Familia B Serpin; PIP5K1A: Fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa tipo 1 alfa; SCP2: Proteína transportadora de esteroides 2; PGK: Fosfoglicerato quinasa; COPG1: Subunidad gamma 1 del complejo de la capa COPI; ARHGAP18: Proteína 18 activadora de la GTPasa Rho; PLAC8: Proteína 8 asociada a placenta; H3-3A: Histona H3; PFK1: Fosfofructoquinasa-1; ARHGEF6: Factor 6 de intercambio de nucleótidos de guanina Rho; ACO2: Aconitasa 2 mitocondrial; NOMO1: Modulador nodal 1; EF-Tu: Factor de elongación termo inestable; DNAJC11: Familia de proteínas de choque térmico DnaJ (Hsp40) Miembro C11; MTHFD2: Metileno tetrahidrofolato deshidrogenasa 2; ATAD3A: Proteína 3 que contiene el dominio AAA de la familia ATPasa; ACAT1: Ac. CoA acetiltransferasa mitocondrial; TRAP1: Proteína 1 asociada al receptor de TNF; HSPE1/HSP60: Proteína de choque térmico de 60 kDa mitocondrial; PPIB: Peptidil-prolil cis-trans isomerasa B; OS9: Osteosarcoma amplificado 9 – lectina del retículo endoplásmico; SHMT2: Serina Hidroximetiltransferasa 2; PPIA: Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A; SNX1: Sorting nexina 1; SIL1: Factor de intercambio de

nucleótidos SIL1; HIBADH: 3-Hidroxiisobutirato deshidrogenasa; MDH2: Malato deshidrogenasa 2 mitocondrial; DNAJC10: Familia de proteínas de choque térmico DnaJ (Hsp40) Miembro C10; HSD17B10: 3-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa tipo 2; CG31915: Miembro de la familia de la glicosiltransferasa 25; NFKBIL2: Proteína 2 de reparación de ADN similar a Tonkotsu; PDHC/DLAT: Dihidrolipoamida acetiltransferasa; ALDH2: Aldehído deshidrogenasa mitocondrial; THFS: Formato - tetrahidrolato ligasa.

9.4 Anexo 4. Mapa de calor de las proteínas expresadas diferencialmente identificadas exclusivamente en la fracción mitocondrial (Bandas: B4 – B6) relacionadas con el metabolismo energético mitocondrial, glucólisis y biogénesis mitocondrial.

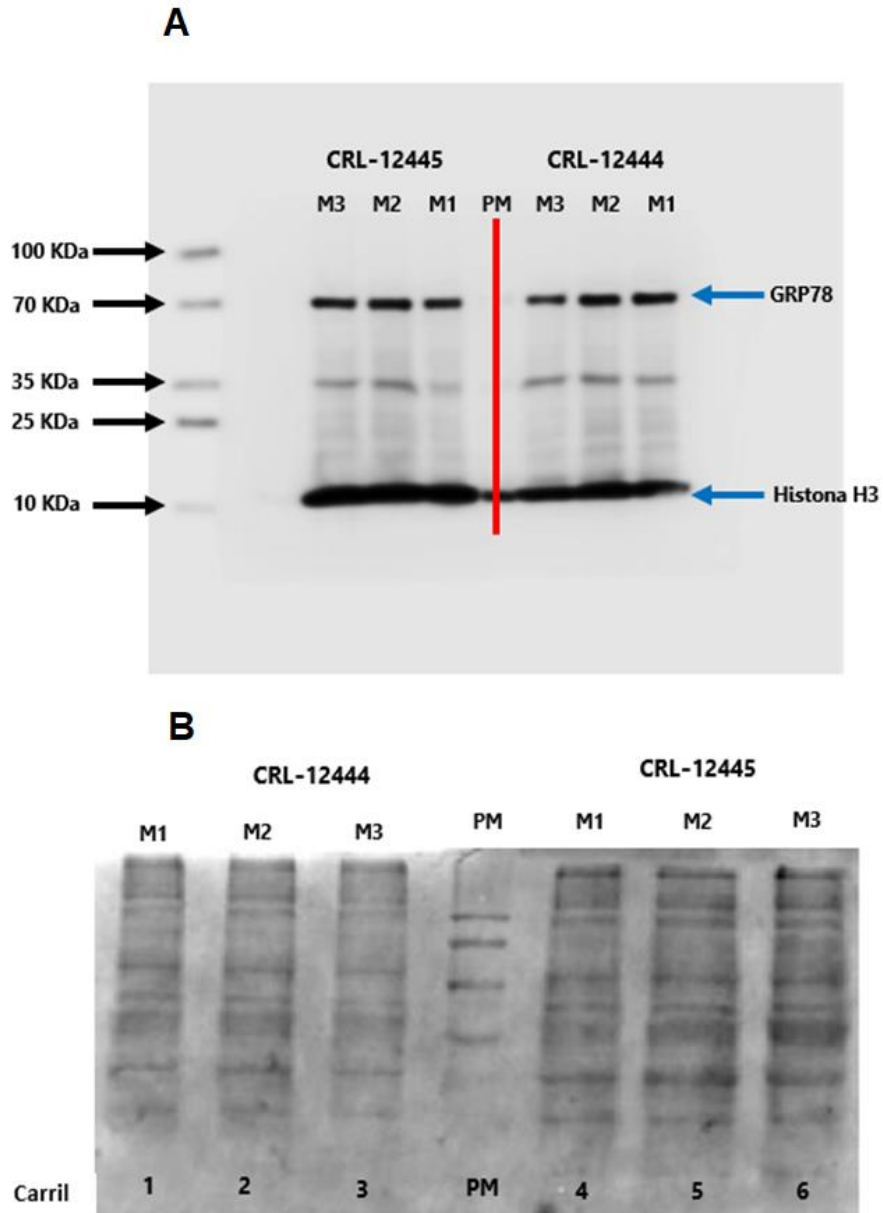


Anexo 4. Fig. 1. Mapa de calor de las proteínas expresadas diferencialmente en la fracción mitocondrial (Bandas B4 – B6), relacionadas con el metabolismo energético mitocondrial y biogénesis mitocondrial.

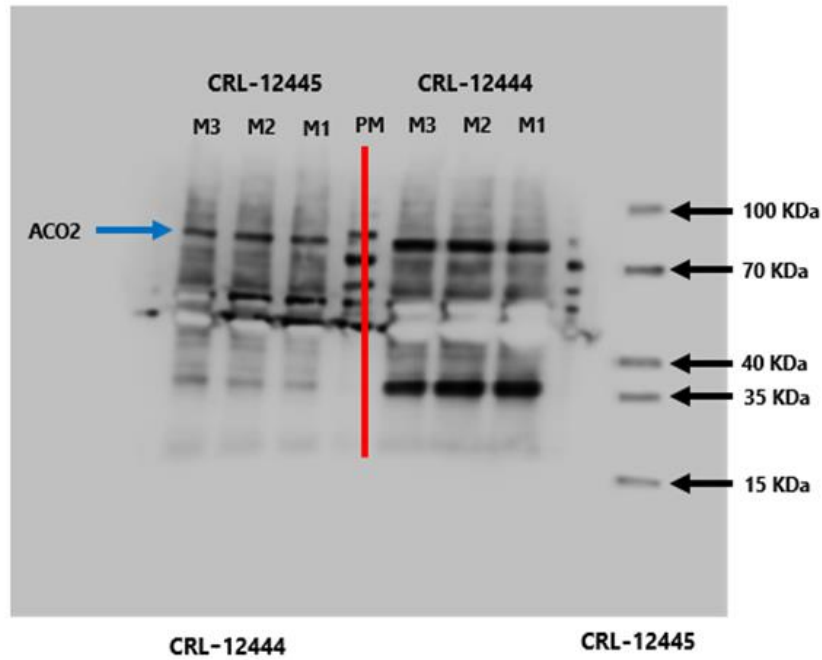
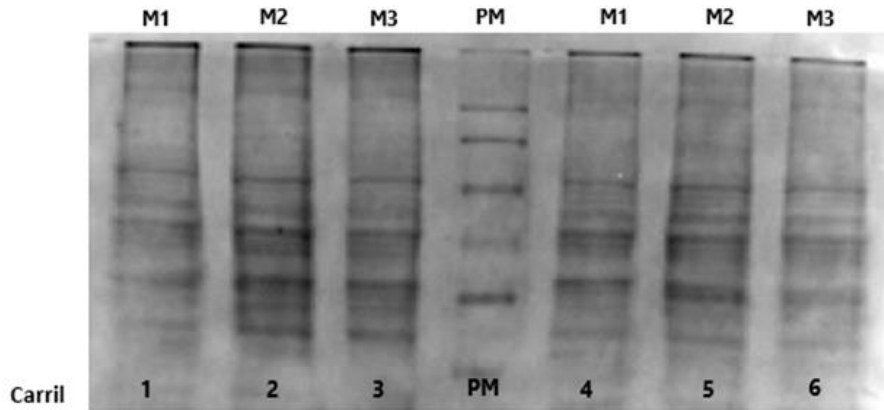
Además de estos marcadores de interés, se muestran los identificados para la ruta de glucólisis debido a su relación directa con la producción de energía. Se muestran en rojo las proteínas aumentadas en la línea CRL-12445 con respecto a la línea CRL-12444, y en verde las disminuidas. Los valores mostrados en el centro de cada fila corresponden al valor de cambio en la acumulación del marcador en cuestión en la proteómica diferencial. ATP1A2: Subunidad alfa-2 de la ATPasa de transporte de potasio y sodio; GPD2: Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2 mitocondrial; IDH3a: Subunidad alfa de la isocitrato deshidrogenasa; MDH2: Malato deshidrogenasa 2 mitocondrial; HIBADH: 3-Hidroxiisobutirato deshidrogenasa; PHB2: Prohibitina-2; UQCRC1: Subunidad 1 del complejo citocromo b-c1 mitocondrial, α KGDH: α -Cetoglutarato deshidrogenasa; TOM70: Translocasa de la membrana mitocondrial externa 70; FUNDC2: Proteína 2 que contiene el dominio FUN14; ATAD3A: Proteína 3 que contiene el dominio AAA de la familia ATPasa; DNAJC11: Familia de proteínas de choque térmico DnaJ (Hsp40) Miembro C11; COX5a: Subunidad 5A del complejo citocromo c oxidasa mitocondrial; PFK-1: Fosfofructoquinasa-1; TPIS: Triosa fosfato isomerasa;

LRPPRC: Proteína que contiene motivos PPR ricos en leucina mitocondrial; DLAT: Dihidrolipoamida acetiltransferasa; IDH3β: Subunidad beta de la isocitrato deshidrogenasa; LONP1: Peptidasa Lon 1 mitocondrial; HSP60: Proteína de choque térmico de 60 kDa mitocondrial; ATP5F1B: Subunidad beta de la sección F1 de la ATP sintasa, SHMT2: Serina Hidroximetiltransferasa 2; TRAP1: Proteína 1 asociada al receptor de TNF; DLD: Dihidrolipoil deshidrogenasa; mEf-G1: Factor de elongación G mitocondrial; EF-Tu: Factor de elongación termo inestable; ACO2: Aconitasa 2 mitocondrial; NDUFV3: NADH Deshidrogenasa (Ubiquinona) Flavoproteína 3; DCN: Decorina; NDUFV2: NADH Deshidrogenasa (Ubiquinona) Flavoproteína 2; GPX1: Glutatión peroxidasa 1; NDUFA8: NADH Deshidrogenasa [Ubiquinona] 1 Subcomplejo Alfa Subunidad 8; PGK: Fosfoglicerato quinasa; NDUFA13: NADH Deshidrogenasa [Ubiquinona] 1 Subcomplejo Alfa Subunidad 13; SSBP1: Proteína de unión a ADN monocatenario mitocondrial.

9.5 Anexo 5. Geles SDS – PAGE y membranas completas de PVDF utilizados para el WB de las proteínas GRP78, Histona H3, ACO2, HIBADH y HSP60 para la validación de la proteómica.

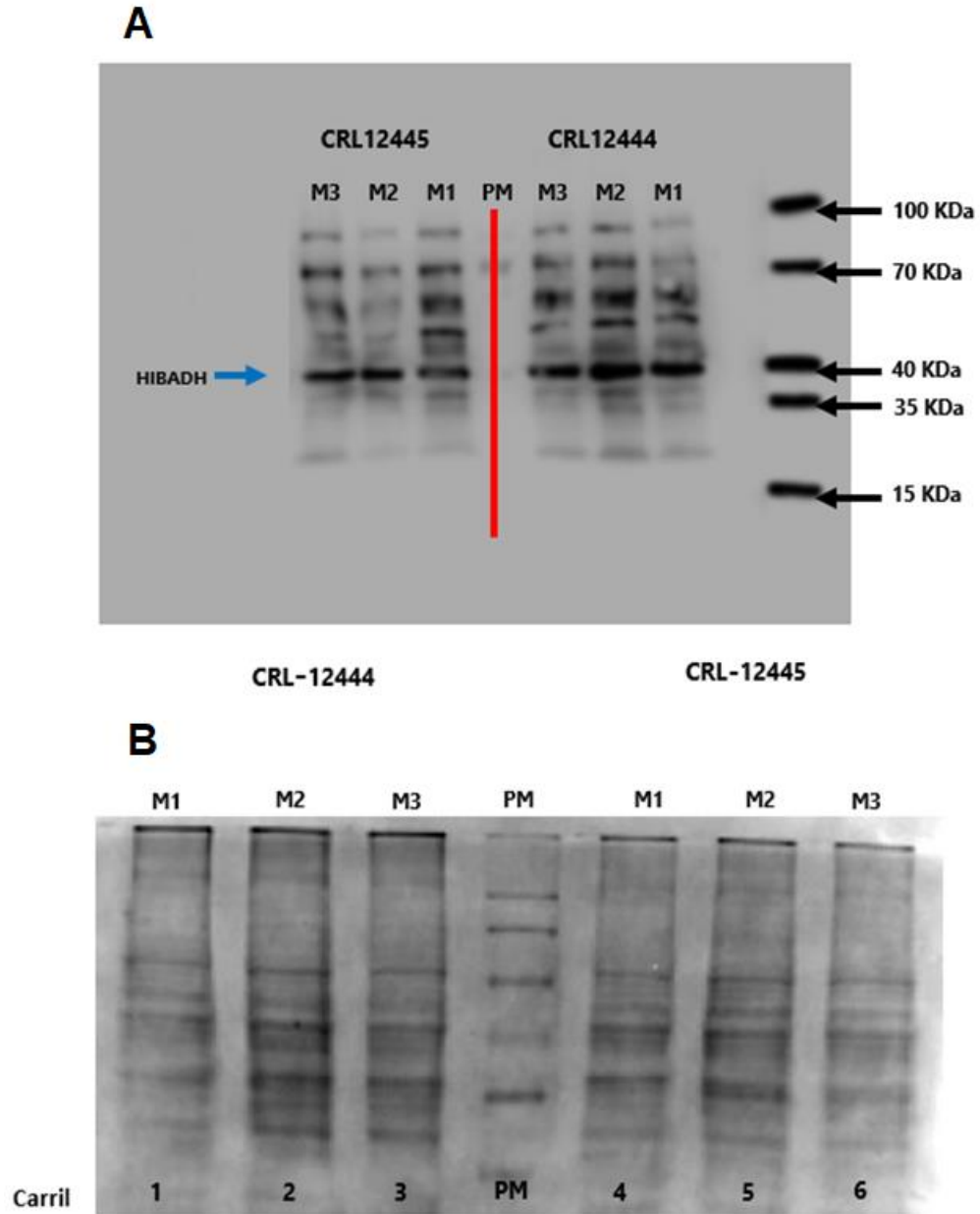


Anexo 5. Fig. 1. Detección de GRP78 (78 kDa) y la histona H3 (12 kDa) mediante Western Blot por triplicado biológico. La toma de la muestra se hizo al tercer día durante la fase exponencial del cultivo de ambas líneas celulares (el mismo día que se tomaron las muestras para llevar a cabo el análisis proteómico por Pérez – Rodríguez et al., (2020b)). A) Se muestran los resultados de la detección de GRP78 y de la histona H3 en el Western Blot. Se aprecia que no existió diferencia de expresión entre ambas líneas celulares para la proteína GRP78, sin embargo, se nota mayor intensidad en la detección de la histona H3 en las líneas CRL-12445 en comparación con las células CRL-12444. Estos resultados convergen con lo obtenido en el análisis proteómico. B) Geles SDS usados para la transferencia de las proteínas a las membranas de PVDF. Los geles SDS-PAGE fueron utilizados como control de carga para la cuantificación por densitometría utilizando el método “normalización por proteína total (TPN por sus siglas en inglés). M1, M2 y M3 indican los matraces de donde se tomaron las muestras, PM: Corresponde al marcador de peso molecular. GRP78: Proteína 78 regulada por glucosa; H3: Histona H3.

A**B**

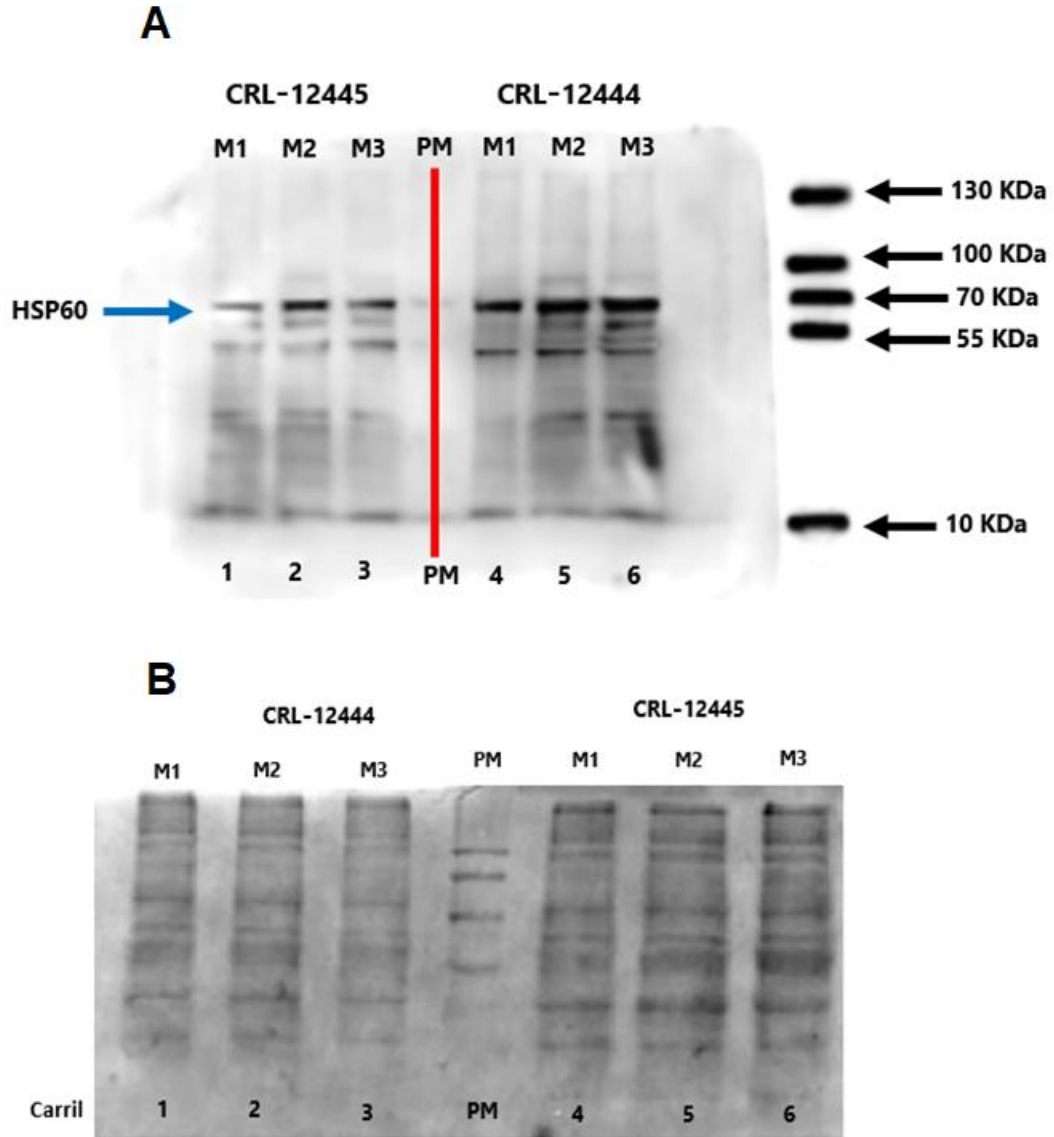
Anexo 5. Fig. 2. Detección de ACO2 (82 – 85 kDa) mediante Western Blot por triplicado biológico.

La toma de la muestra se hizo al tercer día durante la fase exponencial del cultivo de ambas líneas celulares (el mismo día que se tomaron las muestras para llevar a cabo el análisis proteómico por Pérez – Rodríguez et al., (2020b)). A) Se muestran los resultados de la detección de la enzima aconitasa mitocondrial (ACO2) en el Western Blot. Se aprecia que hubo sobreexpresión de esta enzima las células CRL-12444 en comparación con las células CRL-124445 durante la fase de crecimiento exponencial. Estos resultados fueron acordes con lo obtenido en el análisis proteómico. B) Geles SDS usados para la transferencia de las proteínas a las membranas de PVDF. Los geles SDS-PAGE fueron utilizados como control de carga para la cuantificación por densitometría utilizando el método “normalización por proteína total (TPN por sus siglas en inglés). M1, M2 y M3 indican los matraces de donde se tomaron las muestras, PM: Corresponde al marcador de peso molecular. ACO2: Aconitasa 2, mitocondrial.



Anexo 5. Fig. 3. Detección de HIBADH (35 kDa) mediante Western Blot por triplicado biológico.

La toma de la muestra se hizo al tercer día durante la fase exponencial del cultivo de ambas líneas celulares (el mismo día que se tomaron las muestras para llevar a cabo el análisis proteómico por Pérez – Rodríguez et al., (2020b)). A) Se muestran los resultados de la detección de la enzima HIBADH mitocondrial en el Western Blot. Se aprecia que hubo sobreexpresión de esta enzima las células CRL-12444 en comparación con las células CRL-12445 durante la fase de crecimiento exponencial. Estos resultados fueron acordes con lo obtenido en el análisis proteómico. B) Geles SDS usados para la transferencia de las proteínas a las membranas de PVDF. Los geles SDS-PAGE fueron utilizados como control de carga para la cuantificación por densitometría utilizando el método "normalización por proteína total (TPN por sus siglas en inglés). M1, M2 y M3 indican los matraces de donde se tomaron las muestras, PM: Corresponde al marcador de peso molecular. HIBADH: 3-hidroxibutirato deshidrogenasa.



Anexo 5. Fig. 4. Detección de HSP60 (60 kDa) mediante Western Blot por triplicado biológico. La toma de la muestra se hizo al tercer día durante la fase exponencial del cultivo de ambas líneas celulares (el mismo día que se tomaron las muestras para llevar a cabo el análisis proteómico por Pérez – Rodríguez et al., (2020b)). A) Se muestran los resultados de la detección de la enzima HSP60 en el Western Blot. Se aprecia que hubo sobreexpresión de esta enzima las células CRL-12444 en comparación con las células CRL-124445 durante la fase de crecimiento exponencial. Estos resultados fueron acordes con lo obtenido en el análisis proteómico. B) Geles SDS usados para la transferencia de las proteínas a las membranas de PVDF. Los geles SDS-PAGE se usaron como control de carga para la cuantificación por densitometría utilizando el método "normalización por proteína total (TPN por sus siglas en inglés). M1, M2 y M3 indican los matraces de donde se tomaron las muestras, PM: Corresponde al marcador de peso molecular. HSP60: Proteína mitocondrial de choque térmico de 60 kDa.

10 REFERENCIAS

Abcam (2021). Will this antibody cross-react? 05/01/2022, de Abcam. Sitio web: <https://www.abcam.com/help/will-this-antibody-cross-react>

Aguilar-López JL y Funes S (2019). Autophagy in stationary phase of growth. Biogenesis of fatty acids, lipids and membranes, 849–866. doi:10.1007/978-3-319-50430-8_6

Ahn BH, Kim HS, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, Deng CX y Finkel T (2008). A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(38), 14447–14452. doi:10.1073/pnas.0803790105

Ahn WS y Antoniewicz MR (2013). Parallel labeling experiments with [1,2-13C] glucose and [U-13C] glutamine provide new insights into CHO cell metabolism. Metabolic Engineering, 15, 34–47. doi:10.1016/j.ymben.2012.10.001

Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, Maechler P y Verdin E (2007). Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. Journal of Biological Chemistry, 282(46), 33583–33592. doi:10.1074/jbc.m705488200

Alano CC, Tran A, Tao R, Ying W, Karliner JS y Swanson RA (2007). Differences among cell types in NAD⁺ compartmentalization: A comparison of neurons, astrocytes, and cardiac myocytes. Journal of Neuroscience Research, 85(15), 3378–3385. doi:10.1002/jnr.21479

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson AD, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P (2013). Essential cell biology (4th ed.). Garland Publishing.

Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT y Weiler IJ (2008). The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. Journal of neuroscience methods, 172(2), 250–254. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.05.003

Al-Khallaf H (2017). Isocitrate dehydrogenases in physiology and cancer: biochemical and molecular insight. Cell & bioscience, 7(1), 37. doi:10.1186/s13578-017-0165-3

Altamirano C, Berrios J, Vergara M y Becerra S (2013). Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. Electronic Journal of Biotechnology 16(3), 10. <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-2>

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

American Type Culture Collection (2021). CHO DP-12 clone#1934 [CHO DP-12, clone#1934 aIL8.92 NB 28605/14] CRL-12445™. Rockville, Md.: American Type Culture Collection. <https://www.atcc.org/products/crl-12445>

Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA y Mann M (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. Nature, 426(6966), 570–574. doi:10.1038/nature02166

Anderson KA, Madsen AS, Olsen CA y Hirschey MD (2017). Metabolic control by sirtuins and other enzymes that sense NAD⁺, NADH, or their ratio. Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics, 1858(12), 991–998. doi:10.1016/j.bbabi.2017.09.005

Ansell R, Granath K, Hohmann S, Thevelein JM y Adler L (1997). The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct

roles in osmoadaptation and redox regulation. *The EMBO Journal*, 16(9), 2179–2187. doi:10.1093/emboj/16.9.2179

Baik JY, Joo EJ, Kim YH y Lee GM (2008). Limitations to the comparative proteomic analysis of thrombopoietin producing Chinese hamster ovary cells treated with sodium butyrate. *Journal of Biotechnology*, 133(4), 461–468. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.11.008

Baik JY, Lee MS, An SR, Yoon SK, Joo EJ, Kim YH, Park HW y Lee GM (2006). Initial transcriptome and proteome analyses of low culture temperature-induced expression in CHO cells producing erythropoietin. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(2), 361–371. doi:10.1002/bit.20717

Bai RK y Wong LJ (2004). Detection and quantification of heteroplasmic mutant mitochondrial DNA by Real-Time amplification refractory mutation system quantitative PCR analysis: A Single-Step Approach. *Clinical Chemistry*, 50(6), 996–1001. doi:10.1373/clinchem.2004.03115

Bai RK y Wong LJ (2005). Simultaneous detection and quantification of mitochondrial DNA deletion(s), depletion, and over-replication in patients with mitochondrial disease. *The Journal of molecular diagnostics: JMD*, 7(5), 613–622. doi:10.1016/s1525-1578(10)60595-8

Bairoch A y Apweiler R (2000). The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 45–48. doi:10.1093/nar/28.1.45

Balu M, Mazhar A, Hayakawa CK, Mittal R, Krasieva TB, König K, Venugopalan V, Tromberg BJ (2013). In vivo multiphoton NADH fluorescence reveals depth-dependent keratinocyte metabolism in human skin. *Biophysical Journal*, 104(1), 258–267. doi:10.1016/j.bpj.2012.11.3809

Bateman RL, Bhanumoorthy P, Witte JF, McClard RW, Grompe M y Timm DE (2001). Mechanistic inferences from the crystal structure of Fumarylacetoacetate hydrolase with a bound phosphorus-based inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 15284–15291. doi:10.1074/jbc.m007621200

Beck EA, Thompson AC, Sharbrough J, Brud E y Llopart A (2015). Gene flow between *Drosophila yakuba* and *Drosophila santomea* in subunit V of cytochrome c oxidase: A potential case of cytonuclear cointegration. *Evolution; international journal of organic evolution*, 69(8), 1973–1986. doi:10.1111/evo.12718

Beckmann T, Thüte T, Heinrich C, Büntemeyer H y Noll T (2011). Proteomic and metabolomic characterization of CHO DP-12 cell lines with different high passage histories. *BMC proceedings*, 5 Suppl 8(Suppl 8), 92. doi:10.1186/1753-6561-5-s8-p92

Bedoya-López A, Estrada K, Sánchez-Flores A, Ramírez OT, Altamirano C, Segovia L, Miranda-Ríos J, Trujillo-Roldán MA y Valdez-Cruz NA (2016). Effect of temperature downshift on the transcriptomic responses of Chinese hamster ovary cells using recombinant human tissue plasminogen activator production culture. *PloS one*, 11(3), e0151529. doi:10.1371/journal.pone.0151529

Bender T y Martinou JC (2016). The mitochondrial pyruvate carrier in health and disease: To carry or not to carry? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(10), 2436–2442. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.01.017

Berting A, Farcet MR y Kreil TR. (2010). Virus susceptibility of Chinese hamster ovary (CHO) cells and detection of viral contaminations by adventitious agent testing. *Biotechnology and bioengineering*, 106(4), 598–607. doi:10.1002/bit.22723

Bi JX, Shuttleworth J y Al-Rubeai M (2004). Uncoupling of cell growth and proliferation results in enhancement of productivity in p21CIP1-arrested CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(7), 741–749. doi:10.1002/bit.20025

Böttlinger L, Oeljeklaus S, Guiard B, Rospert S, Warscheid B y Becker T (2015). Mitochondrial heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp10 cooperate in the formation of Hsp60 complexes. *The Journal of biological chemistry*, 290(18), 11611–11622. doi:10.1074/jbc.m115.642017

Brunet S (2003). Organelle proteomics: looking at less to see more. *Trends in Cell Biology*, 13(12), 629–638. doi:10.1016/j.tcb.2003.10.006

Bulté DB, Palomares LA, Parra CG, Martínez JA, Contreras MA, Noriega LG y Ramírez OT (2020). Overexpression of the mitochondrial pyruvate carrier reduces lactate production and increases recombinant protein productivity in CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*. doi:10.1002/bit.27439

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett, J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J y Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797

Cambronne XA, Stewart ML, Kim D, Jones-Brunette AM, Morgan RK, Farrens DL, Cohen MS y Goodman RH (2016). Biosensor reveals multiple sources for mitochondrial NAD⁺. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6292), 1474–1477. doi:10.1126/science.aad5168

Capella Roca B, Alarcón Miguez A, Keenan J, Suda S, Barron N, O’Gorman D, Pdraig D y Clynes M (2019). Zinc supplementation increases protein titer of recombinant CHO cells. *Cytotechnology*. doi:10.1007/s10616-019-00334-1

Chapel A, Kieffer-Jaquinod S, Sagné C, Verdon Q, Ivaldi C, Mellal M, Thirion J, Jadot M, Bruley C, Garin J, Gasnier B y Journet, A. (2013). An extended proteome map of the lysosomal membrane reveals novel potential transporters. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 12(6), 1572–1588. doi:10.1074/mcp.m112.021980

Carvalho AV, Santos SS, Calado J, Haury M y Carrondo MJT (2003). Cell growth arrest by nucleotides, nucleosides and bases as a tool for improved production of recombinant proteins. *Biotechnology Progress*, 19(1), 69–83. doi:10.1021/bp0255917

Chawade A, Alexandersson E y Levander F (2014) ‘Normalizer: A tool for rapid evaluation of normalization methods for omics data sets.’, *Journal of Proteome Research* 13(6), p. 3114–3120. doi: 10.1021/pr401264n.

Chawade A, Alexandersson E y Levander F (2018) ‘Normalizer: A tool for rapid evaluation of normalization methods for omics data sets.’, *Journal of Proteome Research* 13(6), p. 3114–3120. doi: 10.1021/pr401264n.

Chen Y, Cai GH, Xia B, Wang X, Zhang CC, Xie BC, Shi XC, Liu H, Lu JF, Zhang RX, Zhu MQ, Liu M, Yang SZ, Zhang DY, Chu XY, Khan R, Wang YL y Wu, J. W. (2020). Mitochondrial aconitase controls adipogenesis through mediation of cellular ATP production. *The FASEB Journal*. doi:10.1096/fj.201903224rr

Chiang GG & Sisk WP (2005). Bcl-xL mediates increased production of humanized monoclonal antibodies in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 91(7), 779–792. doi:10.1002/bit.20551

Chinsky JM, Singh R, Ficicioglu C, van Karnebeek CDM, Grompe M, Mitchell G, Waisbren SE, Guzsavas-Calikoglu M, Wasserstein MP, Coakley K y Scott CR (2017). Diagnosis and treatment of tyrosinemia type I: a US and Canadian consensus group review and recommendations. *Genetics in Medicine*, 19(12). doi:10.1038/gim.2017.101

Chong WPK, Yusufi FNK, Lee DY, Reddy SG, Wong NSC, Heng CK, Yap MGS y Ho YS (2011). Metabolomics-based identification of apoptosis-inducing metabolites in recombinant fed-batch CHO

culture media. *Journal of Biotechnology* 151 (2): 218-224. ScholarBank-NUS Repository. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.12.010

Christensen CE, Karlsson M, Winther JR, Jensen PR y Lerche MH (2014). Non-invasive in-cell determination of free cytosolic [NAD⁺]/[NADH] ratios using hyperpolarized glucose show large variations in metabolic phenotypes. *The Journal of biological chemistry*, 289(4), 2344–2352. doi:10.1074/jbc.M113.498626

Christopher JA, Stadler C, Martin CE, Morgenstern M, Pan Y, Betsinger CN, Rattray DG, Mahdessian D, Gingras AC, Warscheid B, Lehtiö J, Cristea IM, Foster LJ, Emili A y Lilley, KS (2021). Subcellular proteomics. *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1). doi:10.1038/s43586-021-00029-y

Chu L y Robinson DK (2001). Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 180–187. doi:10.1016/s0958-1669(00)00197-x

Cimen H, Han MJ, Yang Y, Tong Q, Koc H y Koc EC (2010). Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry*, 49(2), 304–311. doi:10.1021/bi901627u

Cockett MI, Bebbington CR y Yarranton GT (1990). High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase gene amplification. *Nature Biotechnology*, 8(7), 662–667. doi:10.1038/nbt0790-662

Coleman O, Suda S, Meiller J, Henry M, Riedl M, Barron N, Clynes M y Meleady P (2019). Increased growth rate and productivity following stable depletion of miR-7 in a mAb producing CHO cell line causes an increase in proteins associated with the Akt pathway and ribosome biogenesis. *Journal of Proteomics*. doi:10.1016/j.jprot.2019.01.003

Cooney GJ, Taegtmeyer H y Newsholme EA (1981). Tricarboxylic acid cycle flux and enzyme activities in the isolated working rat heart. *The Biochemical journal*, 200(3), 701–703. doi:10.1042/bj2000701

Cost GJ, Freyvert Y, Vafiadis A, Santiago Y, Miller JC, Rebar E, Collingwood TN, Snowden A y Gregory PD (2010). BAK and BAX deletion using zinc-finger nucleases yields apoptosis-resistant CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 105(2), 330–340. doi:10.1002/bit.22541

Cottet-Rousselle C, Ronot X, Leverve X y Mayol JF (2011). Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry Part A*, 79A(6), 405–425. doi:10.1002/cyto.a.21061

Cox J y Mann M (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 26(12), 1367–1372. doi:10.1038/nbt.1511

DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB (2008). The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7(1):11–20. doi:10.1016/j.cmet.2007.10.002

DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S y Thompson CB (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19345–19350. doi:10.1073/pnas.0709747104

Dell A, Galadari A, Sastre F y Hitchen P (2010). Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. *International Journal of Microbiology*, 2010, 1–14. doi:10.1155/2010/148178

Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane H y Lempicki RA (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biology*, 4(9), R60. doi:10.1186/gb-2003-4-9-r60

Devlin T (2004). *Bioquímica*. Cuarta edición. Ciudad de México, México: Reverte.

Dhami N, Trivedi DK, Goodacre R, Mainwaring D y Humphreys DP (2018). Mitochondrial aconitase is a key regulator of energy production for growth and protein expression in Chinese hamster ovary cells. *Metabolomics*, 14(10). doi:10.1007/s11306-018-1430-0

Dhiman H, Campbell M, Melcher M, Smith KD & Borth N (2020). Predicting favorable landing pads for targeted integrations in Chinese hamster ovary cell lines by learning stability characteristics from random transgene integrations. *Computational and structural biotechnology journal*, 18, 3632–3648. doi:10.1016/j.csbj.2020.11.008

Díaz-Ruiz R, Avéret N, Araiza D, Pinson B, Uribe-Carvajal S, Devin A y Rigoulet M (2008). Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 283(40), 26948–26955. doi:10.1074/jbc.m800408200

Doolan P, Clarke C, Kinsella P, Breen L, Meleady P, Leonard M, Zhang L, Clynes M, Aherne ST y Barron, N. (2013). Transcriptomic analysis of clonal growth rate variation during CHO cell line development. *Journal of Biotechnology*, 166(3), 105–113. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.04.0

Doolan P, Melville M, Gammell P, Sinacore M, Meleady P, McCarthy K, Francullo L, Leonard M, Charlebois T y Clynes M (2008). Transcriptional profiling of gene expression changes in a PACE-transfected CHO DUKX cell line secreting high levels of rhBMP-2. *Molecular Biotechnology*, 39(3), 187–199. doi:10.1007/s12033-008-9039-6

Douglas W y Brainard J (2012). Cellular Respiration Stage III: Electron Transport. *Electron Transport*. Recuperado de: <https://www.ck12.org/biology/electron-transport/lesson/Electron-Transport-BIO/>

Dreesen IAJ y Fussenegger M (2011). Ectopic expression of human mTOR increases viability, robustness, cell size, proliferation, and antibody production of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), 853–866. doi:10.1002/bit.22990

Dumont J, Ewart D, Mei B, Estes S y Kshirsagar R (2016). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical reviews in biotechnology*, 36(6), 1110–1122. doi:10.3109/07388551.2015.1084266

Durocher Y y Butler, M. (2009). Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), 700–707. doi:10.1016/j.copbio.2009.10.008

Easlson E, Tsang F, Dilova I, Wang C, Lu SP, Skinner C y Lin SJ (2007). The dihydrolipoamide acetyltransferase is a novel metabolic longevity factor and is required for calorie restriction-mediated life span extension. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(9), 6161–6171. doi:10.1074/jbc.M607661200

Eigentler A, Draxl A, Wiethüchter A, Kuznetsov AV, Lassing B y Gnaiger E (2012). Laboratory protocol: citrate synthase a mitochondrial marker enzyme. *Mitochondrial Physiology Network*, 17(04), 1-12.

Essuman K, Summers DW, Sasaki Y, Mao X, DiAntonio A y Milbrandt J (2017). The SARM1 toll/interleukin-1 receptor domain possesses intrinsic NAD⁺ cleavage activity that promotes pathological axonal degeneration. *Neuron* 93, 1334.e5–1343.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2017.02.022.

Fahien LA, Kmiotek EH, MacDonald MJ, Fibich B y Mandic M (1988). Regulation of malate dehydrogenase activity by glutamate, citrate, alpha-ketoglutarate, and multienzyme interaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 1988, 263, 10687–10697. doi: 10.1016/s0021-9258(18)38026-8

Fan L, Kadura I, Krebs LE, Hatfield CC, Shaw MM y Frye CC (2011). Improving the efficiency of CHO cell line generation using glutamine synthetase gene knockout cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(4), 1007–1015. doi:10.1002/bit.24365

- Fan Y, Jimenez Del Val I, Müller C, Wagtberg Sen J, Rasmussen SK, Kontoravdi C, Weilguny D y Andersen MR (2014). Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(3), 521–535. doi:10.1002/bit.25450
- Fendt SM, Bell EL, Keibler MA, Olenchock BA, Mayers JR, Wasylenko TM, Vokes NI, Guarente L, Vander Heiden MG y Stephanopoulos G (2013). Reductive glutamine metabolism is a function of the α -ketoglutarate to citrate ratio in cells. *Nature communications*, 4(1), 2236. doi:10.1038/ncomms3236
- Fernandez-Caggiano M y Eaton P (2021). Heart failure—emerging roles for the mitochondrial pyruvate carrier. *Cell Death & Differentiation*, 28(4), 1149–1158. doi:10.1038/s41418-020-00729-0
- Fernández-Martell A, Johari YB y James DC (2017). Metabolic phenotyping of CHO cells varying in cellular biomass accumulation and maintenance during fed-batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(3), 645–660. doi:10.1002/bit.26485
- Fischer S, Paul AJ, Wagner A, Mathias S, Geiss M, Schandock F, Domnowski M, Zimmermann J, Handrick R, Hesse F y Otte, K. (2015). miR-2861 as novel HDAC5 inhibitor in CHO cells enhances productivity while maintaining product quality. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(10), 2142–2153. doi:10.1002/bit.25626
- Fogolín MB, Wagner R, Etcheverrigaray M y Kratje R (2004). Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 109(1-2), 179–191. doi:10.1016/j.jbiotec.2003.10.035
- Fomina-Yadlin D, Mujacic M, Maggiora K, Quesnell G, Saleem R y McGrew JT (2015). Transcriptome analysis of a CHO cell line expressing a recombinant therapeutic protein treated with inducers of protein expression. *Journal of Biotechnology*, 212, 106–115. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.08.025
- Gabriel JL, Zervos PR y Plaut GWE (1986). Activity of purified NAD-specific isocitrate dehydrogenase at modulator and substrate concentrations approximating conditions in mitochondria. *Metabolism*, 35(7), 661–667. doi:10.1016/0026-0495(86)90175-7
- Gamper N, Stockand JD y Shapiro MS (2005). The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51(3), 177–185. doi:10.1016/j.vascn.2004.08.00
- Gawlitzek M, Ryll T, Lofgren J y Sliwkowski MB (2000). Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: Degradative versus biosynthetic mechanisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(6), 637–646. doi:10.1002/(sici)1097-0290(20000620)68:6<637::aid-bit6>3.0.co;2-c
- Ge SX, Jung D y Yao R (2019). ShinyGO: a graphical enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*. doi:10.1093/bioinformatics/btz931
- Ghaderi D, Zhang M, Hurtado-Ziola N y Varki A (2012). Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 28(1), 147–176. doi:10.5661/bger-28-147
- Grant R, Berg J, Mestayer R, Braidly N, Bennett J, Broom S y Watson J (2019). A pilot study investigating changes in the human plasma and urine NAD⁺ metabolome during a 6-hour intravenous infusion of NAD⁺. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11. doi:10.3389/fnagi.2019.00257
- Graw S, Tang J, Zafar MK, Byrd AK, Bolden C, Peterson EC y Byrum SD (2020). proteiNorm – A user-friendly tool for normalization and analysis of TMT and label-free protein quantification. *ACS Omega*, 5(40), 25625–25633. doi:10.1021/acsomega.0c02564

- Grzeschik KH (1976). Assignment of a gene for human mitochondrial isocitrate dehydrogenase (ICD-M, EC 1.1.1.41) to chromosome 15. *Human Genetics*. 1976;34(1):23–28. doi:10.1007/bf00284430
- Goetzman ES y Prochownik EV (2018). The role for Myc in coordinating glycolysis, oxidative phosphorylation, glutaminolysis, and fatty acid metabolism in normal and neoplastic tissues. *Frontiers in Endocrinology*, 9. doi:10.3389/fendo.2018.00129
- Gorfien SF, Dzimian JL, Tilkins ML, Godwin GP y Fike R (1998). Recombinant protein production by CHO cells cultured in a chemically defined medium. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 247–252. doi:10.1007/978-94-011-5161-0_42
- Gu H, Chen C, Hao X, Su N, Huang D, Zou Y, Lin SH, Chen X, Zheng D, Liu L, Yu Z, Xie L, Zhang Y, He X, Lai X, Chen QG, Zhao Y, Yang Y, Loscalzo J y Zheng, J. (2020). MDH1-mediated malate-aspartate NADH shuttle maintains the activity levels of fetal liver hematopoietic stem cells. *Blood*. doi:10.1182/blood.2019003940
- Gupta KJ, Shah JK, Brotman Y, Jahnke K, Willmitzer L, Kaiser WM, Bauwe H, Igamberdiev AU (2012). Inhibition of aconitase by nitric oxide leads to induction of the alternative oxidase and to a shift of metabolism towards biosynthesis of amino acids. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1773–1784. doi:10.1093/jxb/ers053
- Gupta SK, Srivastava SK, Sharma A, Nalage VHH, Salvi D, Kushwaha H, Chitnis NB y Shukla P (2017). Metabolic engineering of CHO cells for the development of a robust protein production platform. *Plos One*, 12(8), e0181455. doi:10.1371/journal.pone.0181455
- Habte ML y Beyene EA (2020). Biological application and disease of oxidoreductase enzymes. In (Ed.8), *Oxidoreductase*. IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.93328
- Hanahan D y Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hansford RG (1980). Control of mitochondrial substrate oxidation. *Current Topics in Bioenergetics*. 10, 217-278. doi:10.1016/B978-0-12-152510-1.50012-2
- Hata J, Tamura T, Yokoshima S, Yamashita S, Kabeno S, Matsumoto K y Onodera K (1992). Chemically defined medium for the production of biologically active substances of CHO cells. *Cytotechnology*, 10(1), 9–14. doi:10.1007/bf00376095
- Heinrich C, Beckmann T, Büntemeyer H y Noll T (2011). Utilization of multifrequency permittivity measurements in addition to biomass monitoring. *BMC proceedings*, 5(Suppl 8), 30. doi:10.1186/1753-6561-5-s8-p30
- Ho R (2013) Proteomic analysis of Chinese hamster ovary cells producing glycosylated monoclonal antibodies. MSc Thesis. University of Waterloo. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10012/762>
- Hosios AM, Hecht VC, Danai LV, Johnson MO, Rathmell JC, Steinhäuser ML, Manalis SR y Vander Heiden MG (2016). Amino acids rather than glucose account for the majority of cell mass in proliferating mammalian cells. *Developmental cell*, 36(5), 540–549. doi:10.1016/j.devcel.2016.02.012
- Huber LA (2003). Is proteomics heading in the wrong direction? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(1), 74–80. doi:10.1038/nrm1007
- Hung MC y Link W (2011). Protein localization in disease and therapy. *Journal of Cell Science*, 124(20), 3381–3392. doi:10.1242/jcs.089110
- Hwang SO, Chung JY y Lee GM (2003). Effect of doxycycline-regulated ERp57 expression on specific thrombopoietin productivity of recombinant CHO cells. *Biotechnology Progress*, 19(1), 179–184. doi:10.1021/bp025578m

- Icard P, Coquerel A, Wu Z, Gligorov J, Fuks D, Fournel L, Lincet H y Simula L (2021). Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells and tumors: An update. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6587. doi:10.3390/ijms22126587
- Icard P, Poulain L y Lincet H (2012). Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1825(1), 111–116. doi:10.1016/j.bbcan.2011.10.007
- Jadhav V, Hackl M, Klanert G, Hernandez BJA, Kunert R, Grillari J y Borth N (2014). Stable overexpression of miR-17 enhances recombinant protein production of CHO cells. *Journal of biotechnology*, 175, 38–44. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.01.032
- Jamnkar U, Nikolic P, Belic A, Blas M, Gaser D, Francky A, Laux H, Blejec A, Baebler S y Gruden K (2015). Transcriptome study and identification of potential marker genes related to the stable expression of recombinant proteins in CHO clones. *BMC Biotechnology*, 15(1). doi:10.1186/s12896-015-0218-9
- Johnson JD, Mehus JG, Tews K, Milavetz BL y Lambeth DO (1998). Genetic evidence for the expression of ATP- and GTP-specific succinyl-CoA synthetases in multicellular eucaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(42), 27580–27586. doi:10.1074/jbc.273.42.27580
- Johnson JD, Muhonen WW y Lambeth DO (1998). Characterization of the ATP- and GTP-specific succinyl-CoA synthetases in pigeon. *Journal of Biological Chemistry*, 273(42), 27573–27579. doi:10.1074/jbc.273.42.27573
- Jose C, Bellance N y Rossignol R (2011). Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: A tumor's dilemma? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(6), 552–561. doi:10.1016/j.bbabi.2010.10.012
- Jung E, Heller M, Sanchez JC y Hochstrasser DF (2000). Proteomics meets cell biology: The establishment of subcellular proteomes. *Electrophoresis*, 21(16), 3369–3377. doi:10.1002/1522-2683(20001001)21:16<3369::aid-elps3369>3.0.co;2-7
- Kadenbach B y Hüttemann M (2015). The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*, 24, 64–76. doi:10.1016/j.mito.2015.07.002
- Kane, D. A. (2014). Lactate oxidation at the mitochondria: a lactate-malate-aspartate shuttle at work. *Frontiers in Neuroscience*, 8. doi:10.3389/fnins.2014.00366
- Kantardjieff A, Jacob NM, Yee JC, Epstein E, Kok YJ, Philp R, Betenbaugh M, Hu WS (2010). Transcriptome and proteome analysis of Chinese hamster ovary cells under low temperature and butyrate treatment. *Journal of Biotechnology*, 145(2), 143–159. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.09.008
- Kelly PS, Breen L, Gallagher C, Callagher C, Kelly S, Henry M, Lao NT, Meleady P, O’Gorman D, Clynes M y Barron N (2015). Re-programming CHO cell metabolism using miR-23 tips the balance towards a highly productive phenotype. *Biotechnology Journal*, 10(7), 1029–1040. doi:10.1002/biot.201500101
- Kelly PS, Clarke C, Costello A, Monger C, Meiller J, Dhiman H, Borth N, Betenbaugh MJ, Clynes M y Barron, N (2017). Ultra-deep next generation mitochondrial genome sequencing reveals widespread heteroplasmy in Chinese hamster ovary cells. *Metabolic Engineering*, 41, 11–22. doi:10.1016/j.ymben.2017.02.001
- Kholmukhamedov A, Schwartz JM y Lemasters JJ (2013). Isolated mitochondria infusion mitigates ischemia-reperfusion injury of the liver in rats: mitotracker probes and mitochondrial membrane potential. *Shock (Augusta, Ga.)*, 39(6), 543. doi:10.1097/SHK.0b013e318292300d

- Kim JY, Kim YG y Lee GM (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 917–930. doi:10.1007/s00253-011-3758-5
- Kim JY, Kim YG, Han YK, Choi HS, Kim YH, Lee GM (2011) Proteomic understanding of intracellular responses of recombinant Chinese hamster ovary cells cultivated in serum-free medium supplemented with hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(6), 1917–1928. doi:10.1007/s00253-011-3106-9
- Kim M, O’Callaghan PM, Droms KA y James DC (2011). A mechanistic understanding of production instability in CHO cell lines expressing recombinant monoclonal antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(10), 2434–2446. doi:10.1002/bit.23189
- Kim SH y Lee GM (2006). Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 152–159. doi:10.1007/s00253-006-0654-5
- Kim SC, Sprung R, Chen Y, Xu Y, Ball H, Pei, J., Cheng T, Kho Y, Xiao H, Xiao L, Grishin NK, White M, Yang XJ y Zhao, Y. (2006). Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Molecular Cell*, 23(4), 607–618. doi:10.1016/j.molcel.2006.06.026
- Kim YJ, Baek E, Lee JS y Lee GM (2013). Autophagy and its implication in Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology Letters*, 35(11), 1753–1763. doi:10.1007/s10529-013-1276-5
- Kinsella RJ, Kähäri A, Haider S, Zamora J, Proctor G, Spudich G, Almeida-King J, Staines D, Derwent P, Kerhornou A, Kersey P y Flicek P (2011). Ensembl BioMarts: a hub for data retrieval across taxonomic space. *Database: the journal of biological databases and curation*, 2011(0), bar030. doi:10.1093/database/bar030
- Klausing S, Krämer O y Noll T (2011). Bioreactor cultivation of CHO DP-12 cells under sodium butyrate treatment - comparative transcriptome analysis with CHO cDNA microarrays. *BMC proceedings*, 5 Suppl 8(Suppl 8), 98. doi:10.1186/1753-6561-5-s8-p98
- Koike K, Hamada M, Tanaka N, Otsuka KI, Ogasahara K y Koike M (1974) Properties and subunit composition of the pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase. *The journal of biological chemistry*. 249 (12), pp. 3336-3842. doi:10.1016/s0021-9258(19)42550-7
- Koike M y Koike K (1976). Structure, assembly and function of mammalian alpha-keto acid dehydrogenase complexes. *Advances in Biophysics* 9:187-227.
- Krahmer N, Hilger M, Kory N, Wilfling F, Stoehr G, Mann M, Farese RV y Walther TC (2013). Protein correlation profiles identify lipid droplet proteins with high confidence. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 12(5), 1115–1126. doi:10.1074/mcp.m112.020230
- Ku SCY, Ng DTW, Yap MGS y Chao SH (2007). Effects of overexpression of X-box binding protein 1 on recombinant protein production in Chinese hamster ovary and NS0 myeloma cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(1), 155–164. doi:10.1002/bit.21562
- Kunji ERS y Lytovchenko O (2017). Expression and putative role of mitochondrial transport proteins in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1858(8), 641–654. doi:10.1016/j.bbabi.2017.03.00
- Kuystermans D y Al-Rubeai M (2009). cMyc increases cell number through uncoupling of cell division from cell size in CHO cells. *BMC Biotechnology*, 9(1), 76. doi:10.1186/1472-6750-9-76

- Kwon RJ, Kim SK, Lee SI, Hwang SJ, Lee GM, Kim JS y Seol W (2006). Artificial transcription factors increase production of recombinant antibodies in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Letters*, 28(1), 9–15. doi:10.1007/s10529-005-4680-7
- Lai T, Yang Y y Ng SK (2013). Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(5), 579–603. doi:10.3390/ph6050579
- Lakshmanan M, Kok YJ, Lee AP, Kyriakopoulos S, Lim HL, Teo G, Poh SL, Tang WQ, Hong J, Tan AHM, Bi X, Ho YS, Zhang P, Ng SK y Lee DY (2019). Multi-omics profiling of CHO parental hosts reveals cell line-specific variations in bioprocessing traits. *Biotechnology and Bioengineering*. doi:10.1002/bit.27014
- Lalonde ME y Durocher Y (2017). Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *Journal of Biotechnology*, 251, 128–140. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.04.028.
- Lambeth DO, Tews KN, Adkins S, Frohlich D y Milavetz BI (2004). Expression of two succinyl-CoA synthetases with different nucleotide specificities in mammalian tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36621–36624. doi:10.1074/jbc.m406884200
- Lao MS y Toth D (1997). Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology Progress*, 13(5), 688–691. doi:10.1021/bp9602360
- Law IKM, Liu L, Xu A, Lam KSL, Vanhoutte PM, Che CM, Leung PTY y Wang, Y. (2009). Identification and characterization of proteins interacting with SIRT1 and SIRT3: implications in the anti-aging and metabolic effects of sirtuins. *Proteomics*, 9(9), 2444–2456. doi:10.1002/pmic.200800738
- Le Fourn V, Girod PA, Buceta M, Regamey A y Mermoud N (2014). CHO cell engineering to prevent polypeptide aggregation and improve therapeutic protein secretion. *Metabolic Engineering*, 21, 91–102. doi:10.1016/j.jymben.2012.12.003
- Lee AP, Kok YJ, Lakshmanan M, Leong D, Zheng L, Lim HL, Chen S, Mak SY, Ang KS, Templeton N, Salim T, Wei X, Gifford E, Tan AHM, Bi X, Ng SK, Lee DY, Ling WLW y Ho, Y. S. (2021). Multi-omics profiling of a CHO cell culture system unravels the effect of culture pH on cell growth, antibody titer, and product quality. *Biotechnology and Bioengineering*. doi:10.1002/bit.27899
- Lee JS, Ha TK, Park JH y Lee GM (2013). Anti-cell death engineering of CHO cells: Co-overexpression of Bcl-2 for apoptosis inhibition, Beclin-1 for autophagy induction. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(8), 2195–2207. doi:10.1002/bit.24879
- Li F, Vijayasankaran N, Shen AY, Kiss R y Amanullah A (2010). Cell culture processes for monoclonal antibody production. *mAbs*, 2(5), 466–479. doi:10.4161/mabs.2.5.12720
- Liang L, Li Q, Huang L, Li D y Li X (2015). Sirt3 binds to and deacetylates mitochondrial pyruvate carrier 1 to enhance its activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(4), 807–812. doi:10.1016/j.bbrc.2015.11.036
- Lin SJ, Ford E, Haigis M, Liszt G y Guarente L (2004). Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes & development*, 18(1), 12–16. doi:10.1101/gad.1164804.
- Lin SJ y Guarente L (2003). Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2), 241–246. doi:10.1016/s0955-0674(03)00006-1
- Liu Z, Dai S, Bones J, Ray S, Cha S, Karger BL, Li JJ, Wilson L, Hinckle G y Rossomando A (2015). A quantitative proteomic analysis of cellular responses to high glucose media in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Progress*, 31(4), 1026–1038. doi:10.1002/btpr.2090

- Liu J, He H, Xie D, Wen Y y Liu Z (2021). Probing low-copy-number proteins in single living cells using single-cell plasmonic immunosandwich assays. *Nature Protocols*, 16(7), 3522–3546. doi:10.1038/s41596-021-00547-9
- Locasale JW y Cantley LC (2011). Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell metabolism*, 14(4), 443–451. doi:10.1016/j.cmet.2011.07.014
- Loh WP, Loo B, Zhou L, Zhang P, Lee DY, Yang Y y Lam KP (2014). Overexpression of microRNAs enhances recombinant protein production in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Journal*, 9(9), 1140–1151. doi:10.1002/biot.201400050
- Loh WP, Yang Y y Lam KP (2017). miR-92a enhances recombinant protein productivity in CHO cells by increasing intracellular cholesterol levels. *Biotechnology Journal* 12 (4). doi:10.1002/biot.201600488
- Lushchak OV, Piroddi M, Galli F y Lushchak VI (2014). Aconitase post-translational modification as a key in linkage between Krebs cycle, iron homeostasis, redox signaling, and metabolism of reactive oxygen species. *Redox Report*, 19(1), 8–15. doi:10.1179/1351000213y.0000000073
- Madden T (2002). The BLAST sequence analysis tool. 2002 Oct 9 [Updated 2003 Aug 13]. In: McEntyre J, Ostell J, editors. *The NCBI Handbook* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2002-. Chapter 16. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/>
- Majors BS, Betenbaugh MJ, Pederson NE y Chiang GG (2009). Mcl-1 overexpression leads to higher viabilities and increased production of humanized monoclonal antibody in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Progress*, 25(4), 1161–1168. doi:10.1002/btpr.192
- Marcadier JL, Smith AM, Pohl D, Schwartzentruber J, Al-Dirbashi OY, Majewski J, Ferdinandusse S, Wanders RJ, Bulman DE, Boycott KM, Chakraborty P y Geraghty MT (2013). Mutations in ALDH6A1 encoding methylmalonate semialdehyde dehydrogenase are associated with dysmyelination and transient methylmalonic aciduria. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(1), 98. doi:10.1186/1750-1172-8-98
- Martínez-López JE, Coleman O, Meleady P y Clynes M (2021). Transfection of miR-31* boosts oxidative phosphorylation metabolism in the mitochondria and enhances recombinant protein production in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biotechnology*, 333, 86–96. doi:10.1016/j.jbiotec.2021.04.012
- MaxQuantDocumentation (2018). Protein groups table. 05/06/2020, de Coxdocs. Recuperado de: <http://www.coxdocs.org/doku.php?id=maxquant:table:proteingrouptable>
- McCormack JG, Longo EA y Corkey BE (1990). Glucose-induced activation of pyruvate dehydrogenase in isolated rat pancreatic islets. *Biochemical Journal*, 267(2), 527–530. doi:10.1042/bj2670527
- McDonald A (2019). The enzyme list class 1—oxidoreductases. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB).
- McKee J y McKee T (2014). *Bioquímica. las bases moleculares de la vida*. Quinta edición. Ciudad de México, México: McGraw-Hill.
- Mckenzie M y Ryan MT (2010). Assembly factors of human mitochondrial complex I and their defects in disease. *IUBMB Life*, 62(7), 497–502. doi:10.1002/iub.335
- Meinken J, Walker G, Cooper CR y Min XJ (2015). MetazSecKB: the human and animal secretome and subcellular proteome knowledgebase. Database, 2015, bav077. doi:10.1093/database/bav077

Metabolic-database (2011). Glutaminolysis: metabolic scheme. Recuperado de: https://www.metabolic-database.com/html/glutaminolysis_energy_scheme.html

Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, Mattaini KR, Yang J, Hiller K, Jewell CM, Johnson ZR, Irvine DJ, Guarente L, Kelleher JK, Vander Heiden MG, Iliopoulos O y Stephanopoulos G (2011). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*, 481(7381), 380–384. doi:10.1038/nature10602

Mimaki M, Wang X, McKenzie M, Thorburn DR y Ryan MT (2012). Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817(6), 851–862. doi:10.1016/j.bbabi.2011.08.010

Moreno-Sánchez R, Hogue BA y Hansford RG (1990). Influence of NAD-linked dehydrogenase activity on flux through oxidative phosphorylation. *The Biochemical journal*, 268(2), 421–428. doi:10.1042/bj2680421

Mulukutla BC, Kale J, Kalomeris T, Jacobs M y Hiller GW (2017). Identification and control of novel growth inhibitors in fed-batch cultures of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(8), 1779–1790. doi:10.1002/bit.26313

Mullen AR, Wheaton WW, Jin ES, Chen PH, Sullivan LB, Cheng T, Yang Y, Linehan WM, Chandel NS y DeBerardinis RJ (2011). Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature*, 481(7381), 385–388. doi:10.1038/nature10642

Mullinax TR, Mock JN, McEvily AJ y Harrison JH (1982). Regulation of mitochondrial malate dehydrogenase. Evidence for an allosteric citrate-binding site. *Journal of Biology and Chemistry*. 1982, 257(22), 13233–13239.

Ndi M, Marin-Buera L, Salvatori R, Singh AP y Ott M (2018). Biogenesis of the bc 1 complex of the mitochondrial respiratory chain. *Journal of Molecular Biology*. doi:10.1016/j.jmb.2018.04.036

Nelson DL y Cox MM (2014). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Quinta Edición. Ciudad de México, México: Omega.

Nelson DL y Cox MM (2017). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Séptima Edición. Ciudad de México, México: Omega.

Nikita G, Stockand JD y Shapiro MS (2005). The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51(3), 177–185. doi:10.1016/j.vascn.2004.08.008

Nissom PM, Sanny A, Kok YJ, Hiang YT, Chuah SH, Shing TK, Lee YY, Wonh KTK, Hu WS, Sim MYG y Philp R (2006). Transcriptome and proteome profiling to understanding the biology of high productivity CHO cells. *Molecular Biotechnology*, 34(2), 125–140. doi:10.1385/mb:34:2:125

Noh JH, Kim KM, Pandey PR, Noren Hooten N, Munk R, Kundu G, De S, Martindale JL, Yang X, Evans MK, Abdelmohsen K y Gorospe M (2019). Loss of RNA-binding protein GRSF1 activates mTOR to elicit a proinflammatory transcriptional program. *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/gkz082

Orellana CA, Marcellin E, Gray PP y Nielsen LK (2017). Overexpression of the regulatory subunit of glutamate-cysteine ligase enhances monoclonal antibody production in CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(8), 1825–1836. doi:10.1002/bit.26316

Oshima N, Ishida R, Kishimoto S, Beebe K, Brender JR, Yamamoto K, Urban D, Rai G, Johnson MS, Benavides G, Squadrito GL, Crooks D, Jackson J, Joshi A, Mott BT, Shrimp JH, Moses MA, Lee MJ, Yun A, Lee TD, Hu X, Anderson T, Kusewitt D, Hathaway HH, Jadhav A, Picard D, Trepel JB, Mitchell JB, Stott GM, Moore W, Simeonov A, Sklar LA, Norenberg JP, Linehan WM, Maloney DJ,

- Dang CV, Waterson AG, Hall M, Darley-USmar VM, Krishna MC, Neckers LM (2020). Dynamic imaging of LDH inhibition in tumors reveals rapid in vivo metabolic rewiring and vulnerability to combination therapy. *Cell Reports*, 30(6), 1798–1810.e4. doi:10.1016/j.celrep.2020.01.03
- Ozturk SS, Riley MR y Palsson BO (1992). Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 39(4), 418–431. doi:10.1002/bit.260390408
- Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK, Hill DE, Vidal M, Evans JG, Thorburn DR, Carr SA y Mootha VK (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*, 134(1), 112–123. doi:10.1016/j.cell.2008.06.016
- Palomares LA, Valdez-Cruz NA y Ramírez OT (2007) Superando los retos del cultivo de células animales a través de la bioingeniería. *Biotecnología* 14, 385-399.
- Pascoe DE, Arnott D, Papoutsakis ET, Miller WM y Andersen DC (2007). Proteome analysis of antibody-producing CHO cell lines with different metabolic profiles. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(2), 391–410. doi:10.1002/bit.21460
- Patterson SD y Aebersold RH (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nature Genetics*, 33(3s), 311–323. doi:10.1038/ng1106
- Paulo JA, Gaun A, Kadiyala V, Ghouli A, Banks PA, Conwell DL y Steen H (2013). Subcellular fractionation enhances proteome coverage of pancreatic duct cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834(4), 791–797. doi:10.1016/j.bbapap.2013.01.01
- Peng RW, Abellan E y Fussenegger M (2010). Differential effect of exocytic SNAREs on the production of recombinant proteins in mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(3), 611–620. doi:10.1002/bit.22986
- Pereira S, Kildegaard HF y Andersen MR (2018). Impact of CHO metabolism on cell growth and protein production: An overview of toxic and inhibiting metabolites and nutrients. *Biotechnology Journal*, 13(3), 1700499. doi:10.1002/biot.201700499
- Pérez-Rodríguez S, Ramírez OT, Trujillo-Roldán MA y Valdez-Cruz NA (2020c). Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis of Chinese hamster ovary cell homogenates. *Electronic Journal of Biotechnology*, 48, 86–94. doi:10.1016/j.ejbt.2020.09.006
- Pérez-Rodríguez S, Wulff T, Voldborg BG, Altamirano C, Trujillo-Roldán MA y Valdez-Cruz, NA (2020b). Compartmentalized proteomic profiling outlines the crucial role of the classical secretory pathway during recombinant protein production in Chinese hamster ovary cells. *ACS Omega*, 6(19), 12439–12458. doi:10.1021/acsomega.0c06030
- Philips D, Aponte AM, French SA, Chess DJ y Balaban RS (2009). Succinyl-CoA synthetase is a phosphate target for the activation of mitochondrial metabolism. *Biochemistry*, 48(30), 7140–7149. doi:10.1021/bi900725c
- Plöscher M, Granvogl B, Reisinger V, Masanek A y Eichacker LA (2009). Organelle proteomics. *Methods Molecular Biology* 519: 65–82.
- Ponizovskiy MR (2016). Role of Krebs cycle in the mechanism of stability internal medium and internal energy in an organism in norm and in mechanisms of cancer pathology. *Modern Chemistry & Applications*, 04(04). doi:10.4172/2329-6798.1000191

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

Pybus LP, Dean G, West NR, Smith A, Daramola O, Field R, Wilkinson SJ y James DC (2013). Model-directed engineering of “difficult-to-express” monoclonal antibody production by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(2), 372–385. doi:10.1002/bit.25116

R Core Team (2020). ‘R: A language and environment for statistical computing.’, R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. Recuperado de: <http://www.R-project.org/>.

Ramachandran N y Colman RF (1980). Chemical characterization of distinct subunits of pig heart DPN-specific isocitrate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*. 1980; 18:8859–8864. doi: 10.1016/s0021-9258(18)43581-8

Rappsilber J, Mann M y Ishihama Y (2007). Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols*, 2(8), 1896–906. doi:10.1038/nprot.2007.261

Rastogi SC (2010). *Cell and molecular biology*. Ciudad de México, México: New Age International Pvt. Ltd.

Reinhart, D., Damjanovic, L., Kaisermayer, C., & Kunert, R. (2015). Benchmarking of commercially available CHO cell culture media for antibody production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(11), 4645–4657. doi:10.1007/s00253-015-6514-4

Roxas BAP y Li Q (2008). Significance analysis of microarray for relative quantitation of LC/MS data in proteomics. *BMC Bioinformatics*, 9(1), p. 187. doi: 10.1186/1471-2105-9-187

Safer B (1975). The metabolic significance of the malate-aspartate cycle in heart. *Circulation Research*, 37(5), 527–533. doi: 10.1161/01.res.37.5.527

Sánchez N, Kelly P, Gallagher C, Lao NT, Clarke C, Clynes M y Barron N (2013). CHO cell culture longevity and recombinant protein yield are enhanced by depletion of miR-7 activity via sponge decoy vectors. *Biotechnology Journal*, 9(3), 396–404. doi:10.1002/biot.201300325

Sánchez R y Arboleda G (2008). Mitochondria y muerte celular. 29/11/2018, Recuperado de NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA10_ARTREVIS3_MITOCO.pdf

Schlichtholz B, Turyn J, Goyke E, Biernacki M, Jaskiewicz K, Sledzinski Z y Swierczynski, J (2005). Enhanced citrate synthase activity in human pancreatic cancer. *Pancreas*, 30(2), 99–104. doi:10.1097/01.mpa.0000153326.698

Schneider M (1996). The importance of ammonia in mammalian cell culture. *Journal of Biotechnology*, 46(3), 161–185. doi:10.1016/0168-1656(95)00196-4

Sellick CA, Croxford AS, Maqsood AR, Stephens G, Westerhoff HV, Goodacre R y Dickson, AJ (2011). Metabolite profiling of recombinant CHO cells: Designing tailored feeding regimes that enhance recombinant antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(12), 3025–3031. doi:10.1002/bit.23269

Sengupta N, Rose ST y Morgan JA (2010). Metabolic flux analysis of CHO cell metabolism in the late non-growth phase. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(1), 82–92. doi:10.1002/bit.22890

- Seth G, Hossler P, Yee JC y Hu WS (2006). Engineering cells for cell culture bioprocessing – physiological fundamentals. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 101(1), 119–164. doi:10.1007/10_017
- Shan W, Li J, Xu W, Li H y Zuo Z (2019). Critical role of UQCRC1 in embryo survival, brain ischemic tolerance and normal cognition in mice. *Cellular and Molecular Life Sciences*. doi:10.1007/s00018-019-03007-6
- Shang M, Kwon T, Hamel JP, Lim CT, Khoo BL y Han J (2021). Investigating the influence of physiologically relevant hydrostatic pressure on CHO cell batch culture. *Scientific reports*, 11(1), 162. doi:10.1038/s41598-020-80576-8
- Shi Y, Wang H, Yan Y, Cao H, Liu X, Lin F y Lu J (2018). Glycerol-3-phosphate shuttle is involved in development and virulence in the rice blast fungus *Pyricularia oryzae*. *Frontiers in plant science*, 9, 687. doi: 10.3389/fpls.2018.00687
- Smith CM, Bryla J y Williamson JR (1974). Regulation of mitochondrial alpha-ketoglutarate metabolism by product inhibition at alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*. 249, 1497-15.
- Smits A (2020). DEP: A package for Differential Enrichment analysis of Proteomics data. 05/06/2020, Recuperado de Bioconductor: <https://rdrr.io/bioc/DEP/>
- Smolková K, Plecítá-Hlavatá L, Bellance N, Benard G, Rossignol R y Ježek P (2011). Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(7), 950–968. doi:10.1016/j.biocel.2010.05.003
- Sommeregger W, Mayrhofer P, Steinfellner W, Reinhart D, Henry M, Clynes M, Meleady P, y Kunert R (2016). Proteomic differences in recombinant CHO cells producing two similar antibody fragments. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(9), 1902–1912. doi:10.1002/bit.25957
- Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Salviati L y Angelini C (2012). Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nature Protocols*, 7(6), 1235–1246. doi:10.1038/nprot.2012.058
- Stein LR y Imai S (2012). The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends in endocrinology and metabolism*, 23(9), 420–428. doi:10.1016/j.tem.2012.06.005
- Strasser L, Farrell A, Ho JTC, Scheffler K, Cook K, Pankert P, Mowlds P, Viner R, Karger BL and Bones J (2021). Proteomic profiling of IgG1 producing CHO cells using LC/LC-SPS-MS3: The effects of bioprocessing conditions on productivity and product quality. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9(1), 569045. doi: 10.3389/fbioe.2021.569045
- Sung YH, Lee JS, Park SH, Koo J y Lee GM (2007). Influence of co-down-regulation of caspase-3 and caspase-7 by siRNAs on sodium butyrate-induced apoptotic cell death of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Metabolic Engineering*, 9(5-6), 452–464. doi:10.1016/j.ymben.2007.08.001
- Suomi T, Seyednasrollah F, Jaakkola MK, Faux T y Elo LL (2017) 'ROTS: An R package for reproducibility-optimized statistical testing.', *PLoS Computational Biology* 13(5), p. e1005562. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005562.
- Tang Y, Huang A y Gu Y (2020). Global profiling of plant nuclear membrane proteome in *Arabidopsis*. *Nature Plants*, 6(7), 838–847. doi:10.1038/s41477-020-0700-9

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

ThermoFisher Scientific, (2020). Easy and accurate normalization of western blot data using no-stain protein labeling reagent. Waltham, Massachusetts, EUA. Recuperado de <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Application-Notes/easy-accurate-normalization-western-blot-data-app-note.pdf>

Tigges M y Fussenegger M (2006). Xbp1-based engineering of secretory capacity enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. *Metabolic Engineering*, 8(3), 264–272. doi:10.1016/j.ymben.2006.01.006

Todisco S, Convertini P, Iacobazzi V y Infantino V (2019). TCA cycle rewiring as emerging metabolic signature of hepatocellular carcinoma. *Cancers*, 12(1), 68. doi:10.3390/cancers12010068

Toussaint C, Henry O y Durocher Y (2016). Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, 217, 122–131. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.11.010

Tretter L y Adam-Vizi V (2005). Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1464), 2335–2345. doi:10.1098/rstb.2005.1764

Unni S, Thiagarajan S, Srinivas Bharath MM y Padmanabhan B (2019). Tryptophan oxidation in the UQCRC1 subunit of mitochondrial complex III (Ubiquinol-Cytochrome C Reductase) in a mouse model of myodegeneration causes large structural changes in the complex: A molecular dynamics simulation study. *Scientific Reports*, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-47018-6

Urlaub G y Chasin LA (1980). Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(7), 4216–4220. doi:10.1073/pnas.77.7.4216

Urlaub G, Käs E, Carothers AM y Chasin LA (1983). Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. *Cell*, 33(2), 405–412. doi:10.1016/0092-8674(83)90422-1

Valdez-Cruz NA, García-Hernández E, Espitia C, Cobos-Marín L, Altamirano C, Bando-Campos CG, Cofas-Vargas LF, Coronado-Aceves EW, González-Hernández RA, Hernández-Peralta P, Juárez-López D, Ortega-Portilla PA, Restrepo-Pineda S, Zelada-Cordero P y Trujillo-Roldán MA (2021). Integrative overview of antibodies against SARS-CoV-2 and their possible applications in COVID-19 prophylaxis and treatment. *Microbial Cell Factories*, 20(1). doi:10.1186/s12934-021-01576-5

Välikangas T, Suomi T y Elo LL (2016). A systematic evaluation of normalization methods in quantitative label-free proteomics. *Briefings in Bioinformatics*, bbw095. doi:10.1093/bib/bbw095

Van Hove JL, Saenz MS, Thomas JA, Gallagher RC, Lovell MA, Fenton LZ, Shanske S, Myers SM, Wanders RJ, Ruiters J, Turkmen M y Waterham HR (2010). Succinyl-CoA ligase deficiency: A mitochondrial hepatoencephalomyopathy. *Pediatric Research*, 68(2), 159–164. doi:10.1203/pdr.0b013e3181e5c3a4

Van Dyk DD, Misztal DR, Wilkins MR, Mackintosh JA, Poljak A, Varnai JC, Teber E, Walsh BJ, Gray PP (2003). Identification of cellular changes associated with increased production of human growth hormone in a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *Proteomics*, 3(2), 147–156. doi:10.1002/pmic.200390023

- Vander Heiden MG, Cantley LC y Thompson CB (2009). Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033. doi:10.1126/science.1160809
- Vatrinet R, Leone G, De Luise M, Girolimetti G, Vidone M, Gasparre G y Porcelli AM (2017). The α -ketoglutarate dehydrogenase complex in cancer metabolic plasticity. *Cancer & Metabolism*, 5(1). doi:10.1186/s40170-017-0165-0
- Veech RL, Guynn R y Veloso D (1972). The time-course of the effects of ethanol on the redox and phosphorylation states of rat liver. *The Biochemical journal*, 127(2), 387–397. doi:10.1042/bj1270387
- Venegas V, Wang J, Dimmock D y Wong LJ (2011). Real-time quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content. *Current Protocols in Human Genetics*, 68(1), 19.7.1–19.7.12. doi:10.1002/0471142905.hg1907s6
- Verdin E, Hirschey MD, Finley LWS y Haigis MC (2010). Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(12), 669–675. doi:10.1016/j.tibs.2010.07.003
- Vergara M, Torres M, Müller A, Avello V, Acevedo C, Berrios J, Reyes JG, Valdez-Cruz NA y Altamirano C (2018). High glucose and low specific cell growth but not mild hypothermia improve specific r-protein productivity in chemostat culture of CHO cells. *PLOS ONE*, 13(8), e0202098. doi:10.1371/journal.pone.0202098
- Voet D, Voet JG y Pratt CW (2008). *Fundamentals of biochemistry: Life at the molecular level*. Hoboken, NJ: Wiley.
- Voet D, Voet JG y Pratt CW (2016). *Bioquímica. Cuarta edición*. Ciudad de México, México: Editorial Médica Panamericana.
- Voos W y Röttgers K (2002). Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1592(1), 51–62. doi:10.1016/s0167-4889(02)00264-1
- Wadi L, Meyer M, Weiser J, Stein LD y Reimand J (2016). Impact of outdated gene annotations on pathway enrichment analysis. *Nature methods*, 13(9), 705–706. doi:10.1038/nmeth.3963
- Wagner R (1997). 2.1 Metabolic control of animal cell culture processes. *Mammalian cell biotechnology in protein production*. p. 233-276. doi:10.1515/9783110809282.193
- Wahrheit J, Niklas J y Heinzle E (2014). Metabolic control at the cytosol–mitochondria interface in different growth phases of CHO cells. *Metabolic Engineering*, 23, 9–21. doi:10.1016/j.ymben.2014.02.001
- Wakade C, Chong R, Bradley E, Thomas B y Morgan J (2014). Upregulation of GPR109A in Parkinson's disease. *Plos one*, 9(10), e109818. doi:10.1371/journal.pone.010981
- Walsh G. (2014). Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature Biotechnology*, 32(10), 992–1000. doi:10.1038/nbt.3040
- Walsh G. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology*, 36(12), 1136–1145. doi:10.1038/nbt.4305
- Wang H, Franco F, Tsui YC, Xie X, Trefny MP, Zappasodi R, Mohmood SR, Fernández-García J, Tsai CH, Schulze I, Picard F, Meylan E, Silverstein R, Goldberg I, Fendt SM, Wolchok JD, Merghoub T, Jandus C, Zippelius A y Ho PC (2020). CD36-mediated metabolic adaptation supports regulatory T cell survival and function in tumors. *Nature immunology*, 21(3), 298–308. doi:10.1038/s41590-019-0589-5

- Wang HL, Chu CH, Tsai SJ y Yang RJ (2016). Aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase detection on paper-based analytical devices with inkjet printer-sprayed reagents. *Micromachines*, 7(1), 9. doi: 10.3390/mi7010009
- Wang J, Ma J y Wen X (2018). Basic concepts of density gradient ultracentrifugation. *Nanoseparation using density gradient ultracentrifugation*, 21–36. doi:10.1007/978-981-10-5190-6_2
- Weiss C, Zeng Y, Huang J, Sobocka MB y Rushbrook JI (2000). Bovine NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase: Alternative splicing and tissue-dependent expression of subunit 1. *Biochemistry*, 39(7), 1807–1816. doi:10.1021/bi991691i
- Wiese S, Gronemeyer T, Ofman R, Kunze M, Grou CP, Almeida JA, Eisenacher M, Stephan C, Hayen H, Schollenberger L, Korosec T, Waterham HR, Schliebs W, Erdmann R, Berger J, Meyer HE, Just W, Azevedo JE, Wanders RJA y Warscheid B (2007). Proteomics characterization of mouse kidney peroxisomes by tandem mass spectrometry and protein correlation profiling. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(12), 2045–2057. doi:10.1074/mcp.m700169-mcp200
- Wilhelm F y Hirrlinger J (2011). The NAD⁺/NADH redox state in astrocytes: Independent control of the NAD⁺ and NADH content. *Journal of Neuroscience Research*, 89(12), 1956–1964. doi:10.1002/jnr.22638
- Wilkens CA y Gerdtzen ZP (2015). Comparative metabolic analysis of CHO cell clones obtained through cell engineering for IgG productivity, growth and cell longevity. *PLOS ONE*, 10(3), e0119053. doi:10.1371/journal.pone.0119053
- Williamson DH y Krebs HA (1967). The redox state of free nicotinamide- adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *The Biochemical journal*, 103(2), 514–527. doi:10.1042/bj1030514
- Wippermann A, Klausning S, Rupp O, Albaum SP, Büntemeyer H, Noll T y Hoffrogge R (2014). Establishment of a CpG island microarray for analyses of genome-wide DNA methylation in Chinese hamster ovary cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(2), 579–589. doi:10.1007/s00253-013-5282-2
- Wippermann A, Rupp O, Brinkrolf K, Hoffrogge R y Noll T (2015). The DNA methylation landscape of Chinese hamster ovary (CHO) DP-12 cells. *Journal of Biotechnology*, 199, 38–46. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.02.014
- Wise DR, Ward PS, Shay JE, Cross JR, Gruber JJ, Sachdeva UM, Platt JM, DeMatteo RG, Simon MC y Thompson CB (2011). Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), 19611–19616. doi:10.1073/pnas.1117773108
- Wong DCF, Wong KTK, Nissom PM, Heng CK y Yap MGS (2006). Targeting early apoptotic genes in batch and fed-batch CHO cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(3), 350–361. doi:10.1002/bit.20871
- Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, Feng T, Zhou L, Tang W, Zhan L, Fu X, Liu S, Bo X y Yu G (2021). clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation*, 2(3), 100141. doi:10.1016/j.xinn.2021.100141
- Wurm F (2014). CHO quasispecies—implications for manufacturing processes. *Processes*, 1(3), 296–311. doi:10.3390/pr1030296
- Wurm FM (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1393–1398. doi:10.1038/nbt1026

- Xu X, Nagarajan H, Lewis NE, Pan S, Cai Z, Liu X, Chen W, Xie M, Wang W, Hammond S, Andersen MR, Neff N, Passarelli B, Koh W, Fan HC, Wang J, Gui Y, Lee KH, Betenbaugh MJ, Quake SR, Famili I, Palsson BO, Wang J (2011). The genomic sequence of the Chinese hamster ovary CHO-K1 cell line. *Nature Biotechnology*, 29(8), 735–741. doi:10.1038/nbt.1932
- Xu J, Tang P, Yongky A, Drew B, Borys MC, Liu S y Li ZJ (2018). Systematic development of temperature shift strategies for Chinese hamster ovary cells based on short duration cultures and kinetic modeling. *mAbs*, 21(23), 105-146. doi:10.1080/19420862.2018.1525262
- Xu N, Ou J, Si Y, Goh KY, Flanigan DD, Han X, Yang Y, Yang ST, Zhou L y Liu, X. (Margaret) (2019). Proteomics insight into the production of monoclonal antibody. *Biochemical Engineering Journal*. 145(3), 177-185. doi:10.1016/j.bej.2019.02.022
- Yang C, Ko B, Hensley CT, Jiang L, Wasti AT, Kim J, Sudderth J, Calvaruso MA, Lumata L, Mitsche M, Rutter J, Merrit ME y DeBerardinis RJ (2014). Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. *Molecular Cell*, 56(3), 414–424. doi:10.1016/j.molcel.2014.09.02
- Yang M y Butler M (2002). Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms. *Biotechnology Progress*, 18(1), 129–138. doi:10.1021/bp0101334
- Yang Y, Cimen H, Han MJ, Shi T, Deng JH, Koc H, Palacios OM, Montier L, Bai Y, Tong Q, y Koc EC (2010). NAD⁺-dependent deacetylase SIRT3 regulates mitochondrial protein synthesis by deacetylation of the ribosomal protein MRPL10. *The Journal of biological chemistry*, 285(10), 7417–7429. doi:10.1074/jbc.M109.053421
- Young, J. D. (2013). Metabolic flux rewiring in mammalian cell cultures. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(6), 1108–1115. doi:10.1016/j.copbio.2013.04.016
- Young J (2018). ¹³C flux analysis in industrial CHO cell culture applications. *Cell Culture Engineering XVI*, A. Robinson, PhD, Tulane University R. Venkat, PhD, MedImmune E. Schaefer, ScD, J&J Janssen Eds, ECI Symposium Series. Recuperado de: <https://dc.engconfintl.org/ccexvi/152>
- Yusufi FNK, Lakshmanan M, Ho YS, Loo BLW, Ariyaratne P, Ng SK, Tan TRM, Yang Y, Yeo HC, Lim HL, Ng SW, Hiu AP, Chow CP, Wan C, Chen S, Teo G, Song, G, Chin JX, Ruan X, Sung KWK, Hu WS, Yap MGS, Bardor M, Nagarajan N y Lee DY (2017). Mammalian systems biotechnology reveals global cellular adaptations in a recombinant CHO cell line. *Cell Systems*, 4(5), 530–542.e6. doi:10.1016/j.cels.2017.04.009
- Zhang Y, Brasher AL, Park NR, Taylor HA, Kavazis AN y Hood WR (2018). High activity before breeding improves reproductive performance by enhancing mitochondrial function and biogenesis. *The Journal of Experimental Biology*, 221(7), jeb177469. doi:10.1242/jeb.177469
- Zhao Y, Tian J, Sui S, Yuan X, Chen H, Qu C, Du Y, Guo L y Du H (2017). Loss of succinyl-CoA synthase ADP-forming β subunit disrupts mtDNA stability and mitochondrial dynamics in neurons. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-05168-5
- Zhou M, Crawford Y, Ng D, Tung J, Pynn AFJ, Meier A, Yuk IH, Vijayasankaran N, Leach K, Joly J, Snedecor B y Shen A (2011). Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. *Journal of Biotechnology*, 153(1-2), 27–34. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.03.0