



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOQUÍMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS**

**ESTUDIO DE LA TEMPERATURA SUBFISIOLÓGICA EN  
CULTIVOS DE CÉLULAS CHO RECOMBINANTES:  
EFECTOS SOBRE EL METABOLISMO, CICLO Y MUERTE  
CELULAR**

**T E S I S**

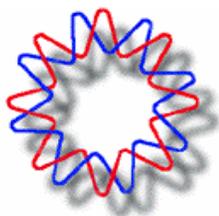
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

**IBT. Mauricio Barrón Castillo**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. Octavio T. Ramírez Reivich**

Cuernavaca, Morelos. 2009





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.

**ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNAM CON LA DIRECCIÓN DEL DR. OCTAVIO TONATIUH RAMÍREZ REIVICH. SE AGRADECE EL APOYO FINANCIERO DE: EL PROYECTO DGAPA IN-217007, LA BECA PARA ESTUDIOS DE POSTGRADO OTORGADA POR CONACYT Y EL APOYO OTORGADO POR CONACYT MEDIANTE EL PROGRAMA DE AYUDANTES DE INVESTIGADOR NACIONAL III DEL SNI.**

**SE AGRADECE A:**

**DRA. ANGÉLICA MENESES ACOSTA (FACULTAD DE FARMACIA, UAEM), POR SU APOYO TÉCNICO, CONCEPTUAL Y MATERIAL EN MÉTODOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO.**

**DR. HORACIO MERCHANT LARIOS (IIB-UNAM), POR LA OBTENCIÓN DE LAS MICROSCOPIAS ELECTRÓNICAS.**

**DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN (IBT-UNAM), POR ASESORIA Y EL PRÉSTAMO DEL REACTIVO LY294002.**

**M. EN C. VANESSA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ POR SU APOYO TÉCNICO**

## **DEDICATORIA**

DEDICADO A MIS PADRES GUSTAVO, GUADALUPE, Y MIS HERMANOS OSVALDO Y ULISES. GRACIAS POR ESTAR SIEMPRE CONMIGO.

ADRY, GRACIAS POR DEJAR UNA HUELLA EN MI EXISTIR.

A MIS AMIGOS, LILÍ, WILLIAM, CUAUHEMOC, JULIO, SARA, SERRATO, VANE, GERMAN, MARTHA, ALICIA, OSCAR, RENÉ, CALEÑO, ANTONINO, LUÍS, KARIN, RUTH, ELIANE, RAMSY, GABY, CHIO, ITZCOATL, CUITAHUAC, GHEORGHE, LILIANA, RICARDO, JIMMY, MABEL, KARINA, CHUCHO, FREDY, DIANA, A MIS SUEGROS, JESÚS, COMPAÑEROS, A LOS QUE ME AYUDARON Y A LOS QUE ME PUSIERON EL PIE. SIN LA PARTICIPACIÓN DE TODOS USTEDES NO HUBIERA LLEGADO A ESTE PUNTO.

A TI ANGÉLICA POR SER MI AMIGA. A LA DRA. LAURA PALOMARES POR SU APOYO MORAL EN TODO MOMENTO.

Y AL DR. OCTAVIO TONATIUH RAMÍREZ POR PERMITIRME APRENDER TANTO BAJO SU TUTORIA.

## CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
NOMENCLATURA.....	vii
RESUMEN.....	viii
1.INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES. ....	3
2.1 LA TEMPERATURA COMO HERRAMIENTA PARA EL AUMENTO DE LA PRODUCTIVIDAD DE PROTEÍNA HETERÓLOGA.....	3
2.2 RESPUESTA A LA HIPOTERMIA MODERADA EN CÉLULAS DE MAMÍFERO.....	4
2.2.1 CICLO CELULAR.....	5
2.2.2 MUERTE CELULAR .....	6
2.2.2.1 APOPTOSIS .....	7
2.2.2.2 VÍAS APOPTÓTICAS.....	8
2.2.2.3 MACROAUTOFAGIA.....	12
2.2.2.4 MAQUINARIA DE AUTOFAGIA.....	13
2.2.3 PROTEÍNAS DE CHOQUE FRÍO (CSP) .....	14
2.2.4 RESPUESTA GLOBAL DE CHOQUE FRÍO.....	16
2.3. ¿POR QUÉ AUMENTA LA PRODUCTIVIDAD DE PROTEÍNA RECOMBINANTE? .....	17
2.3.1 LIBERACIÓN DE ENZIMAS LÍTICAS AL MEDIO DE CULTIVO.....	17
2.3.2 AUMENTO DEL mRNA DE LA PROTEÍNA HETERÓLOGA.....	19
2.3.3 MODELO DE LA RESPUESTA AL CHOQUE FRÍO EN CÉLULAS DE MAMIFERO.....	21
3 JUSTIFICACIÓN.....	23
4 HIPÓTESIS.....	24
5.OBJETIVOS.....	25
5.1.GENERAL.....	25
5.2 ESPECÍFICOS.....	25
6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	26
7 MATERIALES Y MÉTODOS.....	28

7.1. CULTIVOS CELULARES.....	28
7.2. CONCENTRACIÓN , VIABILIDAD Y DIÁMETRO CELULAR.....	28
7.3. CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA, LACTATO , GLUTAMINA Y GLUTAMATO .....	29
7.4. DETERMINACIÓN DE tPA.....	29
7.5. DETERMINACIÓN DE CICLO CELULAR Y POBLACIÓN SUB-G1.....	29
7.6 ENSAYO DE FRAGMENTACIÓN DE DNA CROMOSOMAL POR ELECTROFORESIS.....	30
7.7 DETERMINACIÓN DE LC3II POR WESTERN BLOT.....	31
7.8 MICROSCOPIAS ELECTRÓNICAS DE TRANSMISIÓN.....	31
7.9 CÁLCULOS .....	32
8 RESULTADOS .....	34
8.1. DETERMINACIÓN DEL MEJOR TIEMPO PARA CAMBIO DE TEMPERATURA: 37 A 30°C.....	34
8.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA SUBFISIOLÓGICA SOBRE EL METABOLISMO, CICLO Y MUERTE CELULAR.....	38
8.2.2 CRECIMIENTO CELULAR, VIABILIDAD Y DIAMETRO CELULAR.....	38
8.2.3 METABOLISMO DE GLUCOSA, LACTATO, GLUTAMINA Y GLUTAMATO.....	41
8.2.3.1 GLUCOSA Y LACTATO.....	41
8.2.3.2 GLUTAMINA Y GLUTAMATO.....	44
8.2.4 CICLO CELULAR.....	47
8.2.5 FRAGMENTACIÓN DE DNA.....	50
8.2.5.1 POBLACIÓN SUB-G1.....	50
8.2.5.2 FRAGMENTACIÓN ESPECÍFICA DE DNA.....	52
8.2.6 MORFOLOGÍA ULTRAESTRUCTURAL DE LA MUERTE CELULAR.....	54
8.2.6.1 MORFOLOGÍA ULTRAESTRUCTURAL DEL CULTIVO A 37°C.....	56
8.2.6.2 MORFOLOGÍA ULTRAESTRUCTURAL DEL CULTIVO BIFÁSICO.....	57
8.2.6.3 MORFOLOGÍA ULTRAESTRUCTURAL DEL CULTIVO A 30°C.....	58
8.2.6.4 MORFOLOGÍA ULTRAESTRUCTURAL DEL CULTIVO A 30°C/4.....	59
8.2.7 PROCESAMIENTO DE LC3.....	59
8.3. INHIBICIÓN DE AUTOFAGIA.....	61
8.3.1 CRECIMIENTO CELULAR, VIABILIDAD Y DIAMETROS CELULARES.....	61
8.3.2 CONCENTRACIÓN DE tPA.....	64

<b>9 DISCUSIÓN.....</b>	<b>65</b>
<b>9.1. DETERMINACIÓN DEL MEJOR TIEMPO PARA CAMBIO DE TEMPERATURA: 37 A 30°C.....</b>	<b>66</b>
<b>9.2 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA SUBFISIOLÓGICA SOBRE EL METABOLISMO, CICLO Y MUERTE CELULAR.....</b>	<b>67</b>
<b>9.2.1 CULTIVO CONTROL 37°C: ¿APOPTOSIS O AUTOFAGIA? .....</b>	<b>67</b>
<b>9.2.2 CULTIVO BIFÁSICO: LA AUTOFAGIA COMO PROCESO CATABÓLICO.....</b>	<b>70</b>
<b>9.2.3 CULTIVOS A 30°C : FACTORES DE CRECIMIENTO Y AUTOFAGIA.....</b>	<b>73</b>
<b>9.3 INHIBICIÓN DE AUTOFAGIA.....</b>	<b>78</b>
<b>9.4 CICLO CELULAR.....</b>	<b>79</b>
<b>10 CONCLUSIONES.....</b>	<b>80</b>
<b>11 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>81</b>
<b>12 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>82</b>

## ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1.-	BIOTERAPÉUTICOS PRODUCIDOS EN CÉLULAS CHO.....	2
TABLA 2.-	EFFECTO DE LA TEMPERATURA SUBFISIOLÓGICA EN LA PRODUCTIVIDAD DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFERO.....	3
TABLA 3.-	EFFECTO DEL TIEMPO DE CAMBIO DE TEMPERATURA EN EL DESEMPEÑO DE CULTIVOS BIFÁSICOS.....	36
TABLA 4.-	PARÁMETROS METABÓLICOS DE LOS DIFERENTES ESQUEMAS DE CULTIVOS A HIPOTERMIA MODERADA.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1.-	REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UN PROCESO BIFÁSICO EN EL CUAL SE BAJA LA TEMPERATURA EN EL MOMENTO INDICADO POR LA LÍNEA VERTICAL.....	4
FIGURA 2.-	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS.....	7
FIGURA 3.-	VÍAS PRINCIPALES DE MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS. ....	11
FIGURA 4.-	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA AUTOFAGIA EN CÉLULAS CHO.....	12
FIGURA 5.-	ESQUEMA GENERAL DEL PROCESO AUTOFÁGICO. ....	14
FIGURA 6.-	ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA PROTEÍNA CIRP.....	15
FIGURA 7.-	CINÉTICAS DE APOPTOSIS EN CULTIVOS DE CÉLULAS CHO A DOS TEMPERATURAS....	18
FIGURA 8.-	ACTIVIDAD DE DOS PROTEASAS IDENTIFICADAS EN SOBRENADANTE DE CULTIVOS DE CÉLULAS CHO A 37°C Y CULTIVOS A BAJA TEMPERATURA.....	18
FIGURA 9.-	EL AUMENTO DE LA PRODUCTIVIDAD SE DEBE AL NIVEL DE mRNA Y ÉSTE A SU VEZ DE LA FASE DEL CICLO CELULAR. ....	20
FIGURA 10.-	MODELO HIPOTÉTICO DE LA RESPUESTA GLOBAL A LA HIPOTERMIA MODERADA EN CÉLULAS DE MAMÍFERO. ....	22
FIGURA 11.-	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL SEGUIDA PARA EL DESARROLLO DEL PROYECTO.....	27
FIGURA 12.-	CULTIVOS BIFÁSICOS CON CAMBIO DE TEMPERATURA DE 37°C A 30°C EN DIFERENTES TIEMPOS DEL CULTIVO.....	35
FIGURA 13.-	CONCENTRACIÓN DE TPA COMO FUNCIÓN DE ICV (INTEGRAL DE CÉLULAS VIABLES).....	37
FIGURA 14.-	EFFECTO DE LA TEMPERATURA SUBFISIOLÓGICA EN DIFERENTES ESQUEMAS DE CULTIVO.....	39
FIGURA 15.-	HISTOGRAMAS DE DIAMETROS PROMEDIO MEDIDOS EN CONTADOR DE PARTÍCULAS.	40

FIGURA 16.- EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA Y LACTATO EN DIFERENTES ESQUEMAS DE CULTIVOS A TEMPERATURA SUBFISIOLÓGICA. ....	42
FIGURA 17.- EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUTAMINA Y GLUTAMATO EN DIFERENTES ESQUEMAS DE CULTIVOS A TEMPERATURA SUBFISIOLÓGICA. ....	46
FIGURA 18.- HISTOGRAMA CARACTERÍSTICO DE CICLO CELULAR CON TINCIÓN CON IODURO DE PROPIDIO. ....	47
FIGURA 19.- CINÉTICAS DE DISTRIBUCIÓN DE CICLO CELULAR EN DIFERENTES ESQUEMAS DE CULTIVOS A TEMPERATURA SUBFISIOLÓGICA. ....	48
FIGURA 20.- HISTOGRAMAS DE CONTENIDO DE DNA DE CÉLULAS CHO CULTIVADAS A 37 Y 30°C. SE OBSERVA LA APARICIÓN DE UNA POBLACIÓN OCTOPLOIDE DE CÉLULAS CHO.....	50
FIGURA 21.- CINÉTICAS DE APARICIÓN DE SUB-G1 EN DIFERENTES ESQUEMAS DE CULTIVOS A TEMPERATURA SUBFISIOLÓGICA. ....	52
FIGURA 22.- PERFIL DE FRAGMENTACIÓN ESPECÍFICA DE DNA CROMOSOMAL.....	53
FIGURA 23.- MICROSCOPIAS DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (MET) CARACTERÍSTICA DE LA LÍNEA TF70R. ....	54
FIGURA 24.- MET DE CULTIVOS A A) 37°C Y B) BIFÁSICO EN LAS PRIMERAS 24 H.....	55
FIGURA 25.- MET DE CULTIVOS A 37°C. A) 168 H Y B) 288 H. ....	56
FIGURA 26.- MET DEL CULTIVO BIFÁSICO A A) 216 H Y B) 384 H. ....	57
FIGURA 27.- MET DE CULTIVOS A 30°C A A) 24 H Y B) 384 H. ....	58
FIGURA 28.- MET DE CULTIVOS A 30°C/4 A A) 24 H Y B) 216 H. ....	59
FIGURA 29.- INMUNO-DETECCIÓN DEL PROCESAMIENTO DE LC3 EN DIFERENTES ESQUEMAS DE CULTIVOS A TEMPERATURA SUBFISIOLÓGICA. ....	60
FIGURA 30.- ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE AUTOFAGIA A 37°C Y 30°C CON LY29002 (5µM)...	63
FIGURA 31.- PRODUCCIÓN DE TPA EN ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE AUTOFAGIA CON LY29002 (5µM). ....	64
FIGURA 32.- ESQUEMA GENERAL DEL METABOLISMO DE GLUCOSA Y GLUTAMINA EN CÉLULAS DE MAMÍFERO. ....	77

## **NOMENCLATURA.**

tPA:	Activador del plasminógeno tisular.
CHO:	Células de ovario de hámster chino.
TCA:	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
$X_{V_{max}}$ :	Concentración máxima de células viables.
tPA <sub>max</sub> :	Concentración máxima de tPA en medio de cultivo.
30°C/4:	Cultivo a 30°C con $4 \times 10^5$ cel/mL de inóculo.
LY30:	Cultivo a 30°C con 5 $\mu$ M de LY294002 diluido en DMSO.
C30:	Cultivo a 30°C sin LY294002, con DMSO.
LY37:	Cultivo a 37°C con 5 $\mu$ M de LY294002 diluido en DMSO.
C37:	Cultivo a 37°C sin LY294002, con DMSO.
DMSO:	Dimetilsulfóxido.
GAPDH:	Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa.
LY294002:	Inhibidor de la PI3K clase III (Vps34).
ICV:	Integral de células viables.
LC3-II:	Light chain 3, isoformas I y II (marcador de autofagia).
mTOR:	Mammalian Target of Rapamycin (regulador principal de autofagia).
MET:	Microscopia electrónica de transmisión.
Sub-G1:	Población de células diploides con menor contenido de DNA.
Csp:	Proteínas de estrés por frío.
$Y_{Glu/Gln}$ :	Rendimiento de glutamato por glutamina consumida.
$Y_{Lac/Glc}$ :	Rendimiento de lactato por glucosa consumida.
RER:	Retículo endoplasmico rugoso.
PBS:	Solución amortiguadora de fosfatos.
Vps34:	Vacuolar protein sorting 34 (PI3K clase III).
$q_{Glc}$ :	Velocidad específica de consumo de glucosa.
$q_{Gln}$ :	Velocidad específica de consumo de glutamina.
$q_{O_2}$ :	Velocidad específica de consumo de oxígeno.
$\mu$ :	Velocidad específica de crecimiento.
$q_{Glu}$ :	Velocidad específica de producción de glutamato.
$q_{Lac}$ :	Velocidad específica de producción de lactato.
$q_{tPA}$ :	Velocidad específica de producción de tPA.

## RESUMEN.

Las líneas celulares CHO son el sistema de expresión en mamíferos más utilizada para la producción de glicoproteínas. Se ha demostrado que al cultivar estas líneas celulares a baja temperatura (entre 30 y 33°C) se mejora sustancialmente la productividad de proteína recombinante. Aunque algunos de los trabajos reportados intentan explicar por que aumenta la productividad bajo este esquema, aún no se conocen las causas de este fenómeno. Al cultivar las células CHO a baja temperatura se presentan modificaciones en los parámetros del cultivo tales como disminución de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), disminución de las velocidades de consumo de sustratos ( $q_{O_2}$ ,  $q_{Glc}$  y  $q_{Gln}$ ), y disminución de velocidades de excreción de productos de desecho ( $q_{Lac}$  y  $q_{NH_4^+}$ ). También se han reportado cambios en eventos celulares y moleculares como arresto celular en fase G1/G0, producción de proteínas de estrés por frío, aumento del contenido del mRNA y retraso en la muerte celular, aunque en este último no se ha profundizado su estudio. En esta tesis se exploran los efectos que tiene una condición de temperatura subfisiológica (30°C) sobre el metabolismo, el ciclo celular, y especialmente sobre la muerte celular, además la posible relación que estos eventos tienen sobre la productividad de la glicoproteína recombinante (tPA).

Se evaluaron cultivos control (37°C), cultivos a una temperatura subfisiológica (30°C) y cultivos bifásicos (cambio de temperatura de 37 a 30°C). Además, se realizó un barrido de tiempos en los que se cambió la temperatura, en los cuales se observó que el cultivo con cambio a las 48 h fue en el que se obtuvo la mejor productividad volumétrica por lo cual se decidió trabajar con éste en los estudios subsiguientes.

El agotamiento de glutamina en el cultivo control fue el detonante del desencadenamiento de la muerte celular masiva. Las características morfológicas de la muerte celular en el cultivo control no fueron completamente apoptóticas ya que presentaron algunos elementos, tal como el procesamiento de LC3, que sugieren muerte celular autofágica. Además se observó que al inhibir la formación de autofagosomas con inhibidores químicos (LY294002), se retrasó de manera significativa la muerte celular.

Se observó que en los cultivos bifásicos con cambio de temperatura a las 48 h se desencadena la muerte celular como resultado del agotamiento de la glutamina, igual que en el cultivo control. En este caso la morfología que se presentó sugirió de igual manera que la muerte celular predominante fue la muerte celular autofágica. Debido a que el metabolismo celular en este cultivo fue más eficiente (poco derroche de glucosa y glutamina), las velocidades de consumo fueron bajas, de tal manera que se pudo observar el efecto protector que tienen los procesos autofágicos en el desarrollo de estos cultivos.

Los cultivos monofásicos a baja temperatura (30°C) tuvieron el metabolismo más derrochador (poca asimilación de glucosa y glutamina). En estos cultivos se dio la presencia de marcadores autofágicos desde etapas tempranas del cultivo aunque probablemente se trate del proceso autofágico en su faceta de rescate celular. La muerte celular masiva que se presentó en este cultivo no fue resultado del agotamiento de glutamina como en casos anteriores. Se pudo determinar que en cultivos hipotérmicos, al duplicar la concentración celular del inóculo, se mejoró el desempeño del cultivo y se inhibieron los efectos causados probablemente por autofagi

## 1. INTRODUCCIÓN.

Muchos compuestos con importancia terapéutica (hormonas, antibióticos o factores sanguíneos) se han obtenido mediante la extracción directa a partir de plantas, animales y microorganismos. Los bajos rendimientos y la presencia de agentes infecciosos han llevado a la generación de procesos de producción más seguros y menos costosos. Por ello, la llegada de la tecnología del DNA recombinante, fue un hito para la producción de fármacos de origen biológico (esencialmente proteínas), aportando mejores rendimientos e inocuidad ([Walsh, 2003](#)).

En el año de 1982, la insulina humana recombinante fue aprobada como la primera proteína terapéutica de uso humano producida en *E. coli* ([Butler, 2005](#)), pero esta molécula es de estructura relativamente simple. La necesidad de producir biofármacos más complejos propició el uso de células de mamífero, y que en 1986 se aprobara al tPA como la primera proteína terapéutica producida en este sistema ([Wurm, 2004](#)). Los sistemas de expresión de células de mamífero tienen la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales complejas, similares a las que efectúan las células humanas. La glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales que ha recibido mayor interés por su estrecha relación con la actividad biológica *in vivo*, con la estabilidad en el organismo y por lo tanto con la calidad de los bioterapéuticos ([Harcum, 2006](#)).

Las líneas celulares de mamífero más utilizadas para producción de biofármacos son células de mieloma de ratón (NS0 y SP2/0), células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de embrión humano (HEK-293), células humanas provenientes de retina (PERC6) y células de ovario de hamster chino (CHO) ([Chu y Robinson 2001](#); [Butler, 2005](#); [Ozturk, 2006](#)). Pavlou y Reichert ([2004](#)) estimaron que para el año 2010 las ventas provenientes de bioterapéuticos llegaría a sobrepasar los 50 mil millones de dólares. Entre el 60 y 70% de todas las proteínas terapéuticas (aprobadas y en pruebas clínicas) son producidas en células CHO ([Jayapal et al., 2007](#)), lo cual muestra la importancia que tiene este hospedero a nivel industrial.

Entre las características por las que se prefieren a las células CHO como el sistema de expresión de mamífero más utilizado están la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales apropiadas para la correcta actividad de los biofármacos y la existencia de una variedad de sistemas de selección/amplificación para expresión de diferentes proteínas recombinantes las cuales pueden ser adaptadas al crecimiento en suspensión en medios libres de suero (Galbraith, 2006). En la Tabla 1, se resumen algunos de los productos obtenidos a partir de esta línea celular.

**Tabla 1.- Biofármacos producidos en células CHO ( Modificada de Chu y Robinson, 2001).**

Nombre del producto	Fabricante	Tipo de producto	Uso terapéutico
Tenecteplase	Genentech	Glicoproteína recombinante	Ataque al miocardio
ReFacto	Wellcome	Glicoproteína recombinante	Episodios hemorrágicos
Enbrel	Immunex	IgGI fusionado con TNF	Artritis reumatoide
Herceptin	Genentech	Ac.Mo. humanizado	Cáncer
Rituxan	IDEC	Ac.Mo. humanizado	Linfoma
Benefix	Genetics institute	Glicoproteína recombinante	Episodios hemorrágicos
Avonex	Biogen	Glicoproteína recombinante	Esclerosis múltiple

\*Ac. Mo.; anticuerpo monoclonal, TNF; factor de necrosis tumoral.

Si se considerara hipotéticamente al mejor proceso de producción de 1986, las concentraciones de proteína y de células viables más altas llegaban a valores de 50 mg/L y cerca de  $2 \times 10^6$  cel/mL, respectivamente (Wurm, 2004). Debido a la evolución que ha experimentado la tecnología de células animales, hoy en día es posible alcanzar concentraciones de  $100 \times 10^6$  cel/mL y más de 10 g/L de proteína heteróloga (Hof, 2008). Aunque las productividades se han visto considerablemente favorecidas, las características inherentes a sistemas de expresión en células de mamífero tales como medio de cultivo (con propiedades y nutrientes especiales), control de pH, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, temperatura, esterilidad del área de producción, y largos periodos de cultivo, afectan económicamente a estos procesos. Es por eso que la optimización de los procesos de producción de biofármacos por células de mamífero es una necesidad creciente. Para optimizar la producción de proteína en células CHO se han modificado elementos tales como vectores de expresión, procesos celulares, medio de cultivo y variables de proceso (Kaufmann, 1999; Butler, 2005; Weber y Fussengger, 2007; Tan, 2008,). En esta tesis se explora el cambio de

temperatura como una opción, dentro del campo de variables de proceso, con la idea de mejorar las productividades de glicoproteínas producidas en células CHO, tratando de integrar el trabajo desde los enfoques de metabolismo, ciclo y muerte celular.

temperatura como una opción, dentro del campo de variables de proceso, con la idea de mejorar las productividades de glicoproteínas producidas en células CHO, tratando de integrar el trabajo desde los enfoques de metabolismo, ciclo y muerte celular.

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1 LA TEMPERATURA COMO HERRAMIENTA PARA EL AUMENTO DE LA PRODUCTIVIDAD DE PROTEÍNA HETERÓLOGA.

Desde principios de los años 60's se tienen establecidas las condiciones (temperatura, pH, composición de gases y osmolaridad) estándar de cultivo *in vitro* de células de mamífero (An-Ping y Ping-Xiu, 2006). No obstante, en los últimos 20 años una serie de reportes han mostrado que la disminución de la temperatura de cultivo de células CHO (cultivos entre 30 y 33°C denominado hipotermia moderada), origina un aumento en la producción de proteína recombinante en términos de productividad específica ( $\mu\text{g}_{\text{prot}}/10^6\text{cel/h}$ ) y/o productividad volumétrica ( $\mu\text{g}_{\text{prot}}/\text{L/h}$ ) (Tabla 2).

Tabla2.- Efecto de la temperatura subfisiológica en la productividad de proteína recombinante en diferentes líneas celulares de mamífero (Al-Fagee et al., 2005).

Línea celular	Proteína recombinante	Temperatura (°C)	Productividad específica	Productividad volumétrica	Referencia
CHO	Eritropoietina	33	4 veces más	2.5 veces más	Yoon et. al. 2003a
CHO	Eritropoietina	30	5.6 veces más	-----	Yoon et. al. 2003a
CHO	Anticuerpo anti 4-1BB	30	Sin cambio	3.9 veces más	Yoon et. al. 2003b
CHO	Anticuerpo anti 4-1BB	33	1.2 veces más	Sin cambio	Yoon et. al. 2003b
CHO	hGM-CSF	33	2.1 veces más	2.3 veces más	Fogolin et. al. 2004
CHO	SEAP	30	1.7 veces más	3.4 veces más	Kaufmann et al., 1999
CHO	Fab-quimerico	28	-----	14 veces más	Schatz et al., 2003
CHO	Interferón	32	2 veces más	1.9 veces más	Fox et al., 2004
CHO	tPA	32	-----	1.7 veces más	Hendrick et al., 2001
BHK 21	Antitrombina III	Varias	-----	Sin cambio	Weidemann et al., 1994
Hibridomas	Anticuerpo anti IL-2	34	Sin cambio	-----	Bloemkolk et al., 1992
Hibridomas	Anticuerpo monoclonal	33	42% menos	20% menos	Barnabe and Butler, 1994
Hibridomas	Mab citotóxico	29	-----	95% menos	Sureshkumar 1991

\*SEAP ; fosfatasa alcalina humana, hGM-CSF; Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, IL 2; Interleucina 2, tPA; Activador de plasminógeno, anti-4-1BB; anticuerpo contra reacciones autoinmunes. Las productividades (específica y volumétrica están reportadas en veces o % con respecto a 37°C.

El incremento observado en los diferentes reportes es de hasta 5.6 veces y 14 veces para productividades específicas y volumétricas, respectivamente. Este fenómeno no se ha observado en líneas como BHK o hibridomas, donde se ha reportado una disminución de la productividad de hasta 42% en cultivos a baja temperatura en comparación con cultivos a 37°C (Tabla 2).

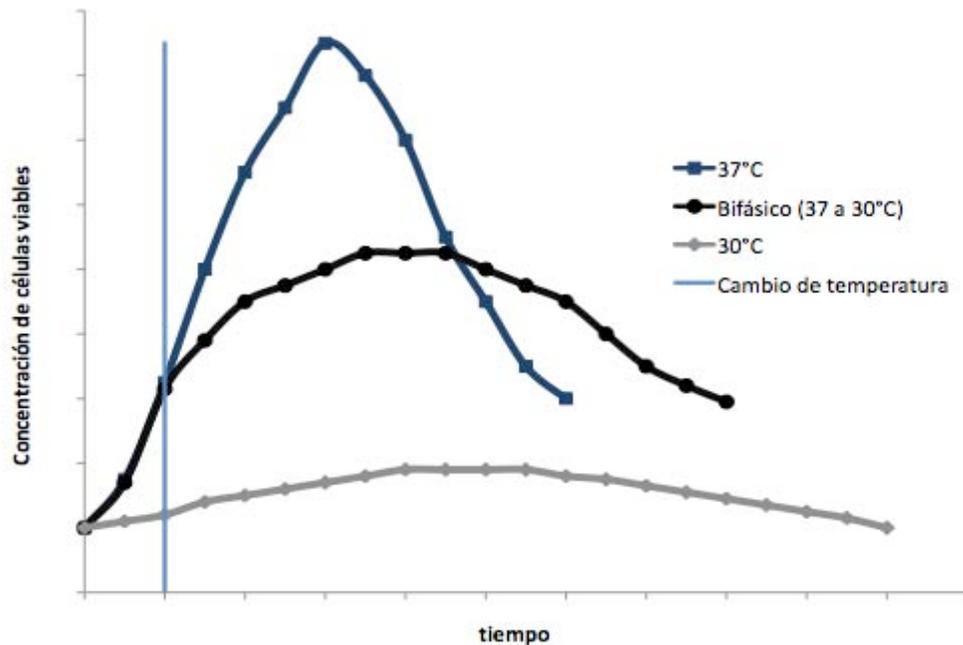


FIGURA1.- Representación esquemática de un proceso bifásico en el cual se baja la temperatura en el momento indicado por la línea vertical.

Las líneas celulares CHO que responden favorablemente a la hipotermia moderada tienen algunas características comunes como la inducción de la proteína heteróloga por medio de un promotor/potenciador de virus SV40 o CMV (Fox et al., 2005a). Estos promotores son altamente utilizados para expresión en sistemas de células de mamífero debido a la fuerte actividad (unión de factores de transcripción) que tienen, especialmente cuando las células están en crecimiento activo (Brightwel et al., 1997, Lee et al., 1998; de Boer et al., 2004).

## 2.2 RESPUESTA A LA HIPOTERMIA MODERADA EN CÉLULAS DE MAMÍFERO.

Cuando un cultivo celular se realiza bajo una condición diferente a la denominada estándar, las células pueden entrar en estrés lo que puede modificar

diversos procesos celulares. Desde un enfoque bioingenieril, los efectos más notorios de la hipotermia moderada son: La disminución de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), el aumento de la vida media del cultivo, la disminución de la velocidad de consumo de glucosa y glutamina ( $q_{Glc}$  y  $q_{Gln}$ ), la reducción de las velocidades de producción de lactato y amonio ( $q_{Lac}$  y  $q_{Amn}$ ), y por supuesto, el aumento de la velocidad específica de producción de proteína recombinante ( $q_p$ ) (Bernabe and Butler 1994; Weidemann et al., 1994; Yoon et al., 2003a). Por otro lado existen eventos fisiológicos y moleculares que se presentan a baja temperatura, como lo son el arresto del ciclo celular en G1/G0, el retraso de la muerte celular, la expresión de proteínas de choque frío, y la regulación de expresión génica, entre otros (Fox et al., 2005a; Moore et al., 1997; Nishiyama et al., 1997b).

### 2.2.1 CICLO CELULAR.

El ciclo celular comprende una serie de eventos moleculares mediante los cuales una célula crece, se divide y se producen dos células. En eucariontes, este proceso está dividido en cuatro fases denominadas G1/G0, S, G2 y M, que a continuación se describen brevemente.

En la primera fase (G1/G0) son sintetizados RNA y proteínas que pueden tener dos propósitos; ser utilizados para proseguir con el ciclo celular o ser utilizados en el mantenimiento cuando la célula se arresta indefinidamente en esta etapa del ciclo. La fase G1/G0 generalmente es la más larga de todas. La segunda etapa del ciclo (fase S), es el periodo donde se replican los cromosomas. En la tercera fase (G2), se da nuevamente la síntesis de RNA y proteínas, que se utilizan para la generación de microtúbulos y otras proteínas necesarios en la última etapa. La última fase del ciclo celular (M), es un evento complejo que así mismo se divide en varias etapas. Como resultado de esta fase, se segregan los cromosomas producidos y ocurre la división celular. (Alberts et al., 1994; Murray y Hunt, 1993). El ciclo celular en mamíferos se lleva a cabo en aproximadamente 24 h, de las cuales G1/G0, S y G2 se realizan en 10, 9 y 4.5 h respectivamente, por su parte M se efectúa en tan sólo 30 min (Lodish et al., 2004).

En organismos completos las células diferenciadas detienen el ciclo celular y sobreviven por días, semanas o por toda la vida del organismo, a este proceso se le

llama arresto celular y generalmente se da en la fase G1/G0 (Lodish et al., 2004). Algunos trabajos indican que la hipotermia moderada, produce una rápida y efectiva reducción en el porcentaje de células en fase S y un arresto de células en fase G1/G0 (Moore, 1997; Fox , 2005b). Arrestar las células (especialmente en fase G1/G0) es una práctica común para aumentar la producción de la proteína recombinante. El gasto energético (ATP) que tienen las células animales en cultivo se debe principalmente a dos necesidades: crecimiento celular (progresión del ciclo celular) y mantenimiento celular. Este último es un proceso que consume aproximadamente el 60% de la energía producida, de esta forma el 40% restante está destinado al crecimiento y la síntesis del producto. Por lo tanto, se tiene la hipótesis que al arrestar las células en fase G1/G0 la energía normalmente utilizada en el crecimiento celular será utilizada en la producción de proteína recombinante (Abu-absi y Srienc, 1998).

### 2.2.2 MUERTE CELULAR .

La homeostasis celular en organismos adultos está considerablemente influenciada por la muerte celular de tal manera que la división de una célula puede ser compensada con la muerte de otra. Bajo este principio se da la generación de órganos, tejidos, selección del sistema inmune, etc, por lo cual, la muerte celular es un proceso altamente regulado (Fussenegger y Bailey, 1998; Galluzzi et al., 2007). La temperatura subfisiológica en cultivos de células CHO recombinantes mantiene altas viabilidades por periodos prolongados de tiempo, es decir, la muerte celular tiene una incidencia menor en estos cultivos. Aunque en los últimos años se han caracterizado diversos tipos de muerte celular, sólo tres han sido caracterizados en cultivos de células animales productoras de biofármacos (Singh et al., 1994; Mercille y Massie 1994b; Hwang y Lee 2008 ). La muerte celular programada tipo I (muerte apoptótica), la muerte celular programada tipo II (muerte autofágica) y la muerte accidental por necrosis. Diversos factores desencadenan los diversos tipos de muerte celular en cultivo. Éstos pueden ser agotamiento de nutrientes y factores de crecimiento, hipoxia, anoxia, modificaciones en el pH y acumulación de productos de desecho entre otros (Mercille y Massie 1994a, b; Singh et al., 1994; Moore et al., 1997; Goswami et al., 1999; Zanghi et al., 1999; Osman et al., 2001; Sauerwald et al., 2003).

### 2.2.2.1 APOPTOSIS.

Después de observar que las células morían con un mismo patrón morfológico y bioquímico, se introdujo el concepto de apoptosis para definir este tipo de muerte (Wang, 2001). Existen características morfológicas que identifican a las células apoptóticas, entre ellas se encuentran la disminución del tamaño celular, la condensación de la cromatina, fragmentación del material genético, la formación de burbujas en la membrana plasmática entre otros (Fig. 2).

La apoptosis es un proceso molecular que es controlado genéticamente. *C. elegans* fue el primer modelo donde este proceso se caracterizó molecularmente, y en el cual se observó la participación de varios genes y proteínas (Driscoll, 1992). Posteriormente, estudios realizados en células de mamífero, presentaron un panorama más complejo que los procesos apoptóticos de *C. elegans* (Degterev y Yuan, 2008).

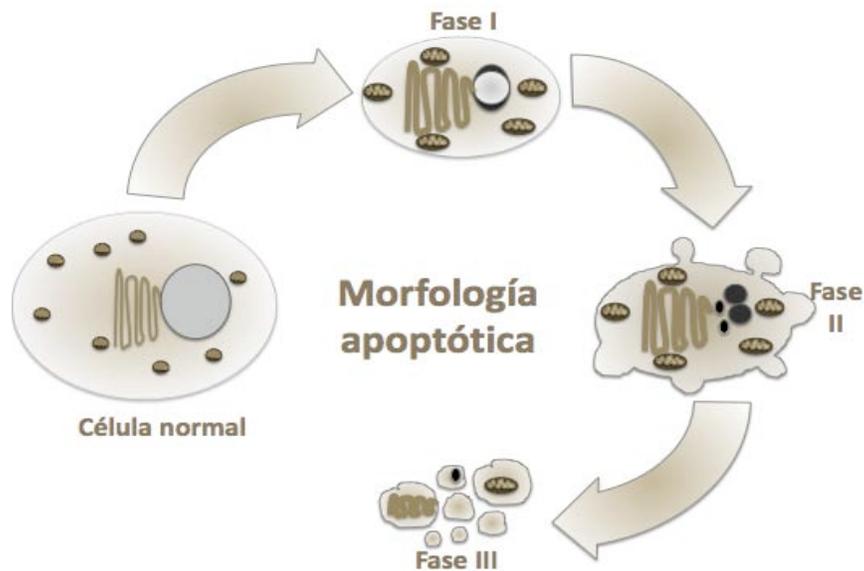


Figura 2.- Características morfológicas de muerte celular por apoptosis; Fase I: Disminución del tamaño celular, hinchamiento de retículo endoplasmico y mitocondrias y condensación de la cromatina. Fase II: Aparición de burbujas en la membrana plasmática y rompimiento del núcleo. Fase III: Formación de desechos celulares o cuerpos apoptóticos.

Los procesos apoptóticos son el resultado de estímulos intracelulares y extracelulares que están divididos en tres vías principales; la vía mediada por receptores, la vía mitocondrial y la vía de retículo endoplasmático (Adams 2003; Arden y Betenbaugh 2004). Existen reacciones cruzadas que pueden llevar a la activación simultánea de cualquiera de las vías antes mencionadas. La activación de la vías apoptóticas culmina con ejecutores comunes llamados caspasas, éstas son un grupo de cisteín-proteasas altamente conservadas que realizan un corte en el motivo aminoacídico Asp-X-X-Asp. Las caspasas pueden desarrollar dos acciones principales; promueven la pérdida de actividad biológica mediante proteólisis de aquéllas proteínas con actividad regulatoria o de componentes celulares, y la activación de otras proteínas como otras caspasas, lipasas o nucleasas que a su vez tienen actividad degradativa (Hengartner, 2000). Cada una de las rutas apoptóticas tienen su caspasa iniciadora como por ejemplo la caspasa-8 de la vía mediada por receptores, la caspasa-9 de la vía mitocondrial y posiblemente la caspasa-12 de la vía reticular (Hengartner, 2000). Éstas a su vez activan otras caspasas efectoras que incluyen a las caspasas-3, -6 y -7 (Arden y Betenbaugh, 2006).

#### 2.2.2.2 VÍAS APOPTÓTICAS.

VIA INTRINSECA. La mitocondria no es sólo el organelo donde se genera la energía que consume la célula, también es un secuestrador de proteínas pro-apoptóticas. En este organelo se integran y propagan una serie de señales de muerte originadas por estímulos intra y extracelulares como: daño al DNA, estrés oxidativo y limitación de nutrientes ( Kaufmann y Earnshaw, 2000, Wang, 2001). Probablemente la familia de proteínas Bcl-2 es la más característica de los procesos apoptóticos. La familia Bcl-2 está integrada por tres grupos principales de proteínas: el grupo anti-apoptótico compuesto por Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> y MCL-1; el grupo pro-apoptótico integrado por BAX y BAK y el grupo integrado por proteínas con homologías en el dominio BH3 (BID, BIM y BAD) (Danial y Korsmeyer, 2004). Una vez que se presenta el estímulo apoptótico, BAX y BAK forman un poro en la membrana mitocondrial que permite la expulsión de moléculas tales como Citocromo C, Smac/DIABLO, endoG ó AIF ( Castro-Obregón y Covarrubias, 2007), todas estas son consideradas proteínas pro-apoptóticas. Por otro lado, las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> y MCL-1 interactúan con BAX y BAK, inhibiendo la formación del poro y

evitando la expulsión de los mensajeros pro-apoptóticos. El grupo integrado por las proteínas BID, BIM y BAD, interactúan con los elementos anti-apoptóticos evitando su función y así promueven la apoptosis. La salida del citocromo C de la mitocondria origina un cambio conformacional de la molécula adaptadora Apaf-1 ubicada en el citoplasma, que a su vez procesa la caspasa 9 y activa el programa de apoptosis ([Hengartner, 2000](#)).

VÍA EXTRÍNSECA (vía mediada por receptores), se activa como resultado de la unión de los ligandos con sus respectivos receptores constituidos por un grupo de proteínas transmembranales pertenecientes a la familia de los TNF-R y que incluyen a TNFR1, Fas/CD95 y los receptores TRAIL ([Van Cruchten y Van Den Broeck, 2002](#)). Una vez unidos ligando y receptor, se da la transducción de la señal apoptótica por medio de un dominio intracelular del receptor llamado DD (dominio de muerte por sus iniciales en Inglés). El DD a su vez interactúa de manera homotípica con una molécula adaptadora con dos dominios; uno DD y otro DED (death effector domain). Todo este conjunto de moléculas es llamado DISC (death inducing signaling complex), el cual por medio de cambios conformacionales activa la caspasa 8, que a su vez activa la señal apoptótica ([Castro-Obregón y Covarrubias, 2007](#))(Fig. 3).

VÍA RETICULAR. A la fecha, esta vía de muerte celular apoptótica es la menos caracterizada. El retículo Endoplasmático (RE) es el responsable del procesamiento de proteínas de membrana y extracelulares, además, de ser el principal resguardo de calcio intracelular ([Alberts et al, 1994](#)). El RE es a menudo blanco de diversos tipos de estreses inducidos por una mala glicosilación, proteínas mal plegadas, agregados de proteínas, falta de nutrientes o fluctuaciones en el equilibrio de calcio. Los diferentes eventos de estrés que se presentan en el RE desencadenan una serie de señales intracelulares llamadas UPR ( de sus iniciales en ingles unfolding protein response) ([Cudna y Dickson, 2003](#); [Kaufman et al, 2002](#); [Patil y Walter, 2001](#); [Ron, 2002](#)). La activación de la UPR ayuda a la supervivencia de la célula disparando la expresión de chaperonas como GRP78 ó PDI con actividades antiapoptóticas. La activación de la UPR también puede llevar al colapso celular, ya que bajo este estímulo se expresan proteínas proapoptóticas como caspasa-12, p28Bap31 y GADD153. Se tiene identificada la presencia en RE de las proteínas de la familia Bcl-2 como Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Bak y Bik, lo cual sugiere que éstas operan en RE regulando la homeostasis de calcio, que al alterarse activa a los miembros de la familia pro-

apoptótica BH3 y subsecuentemente la apoptosis ([Rao et al., 2004](#)). Otra forma de activar los procesos apoptóticos en el RE es por medio de proteínas que censan el estrés que están presentes en este organelo, las cuales a su vez activan la caspasa-12 que es la iniciadora de la vía apoptótica reticular ([Arden y Betenbaugh 2006](#)).

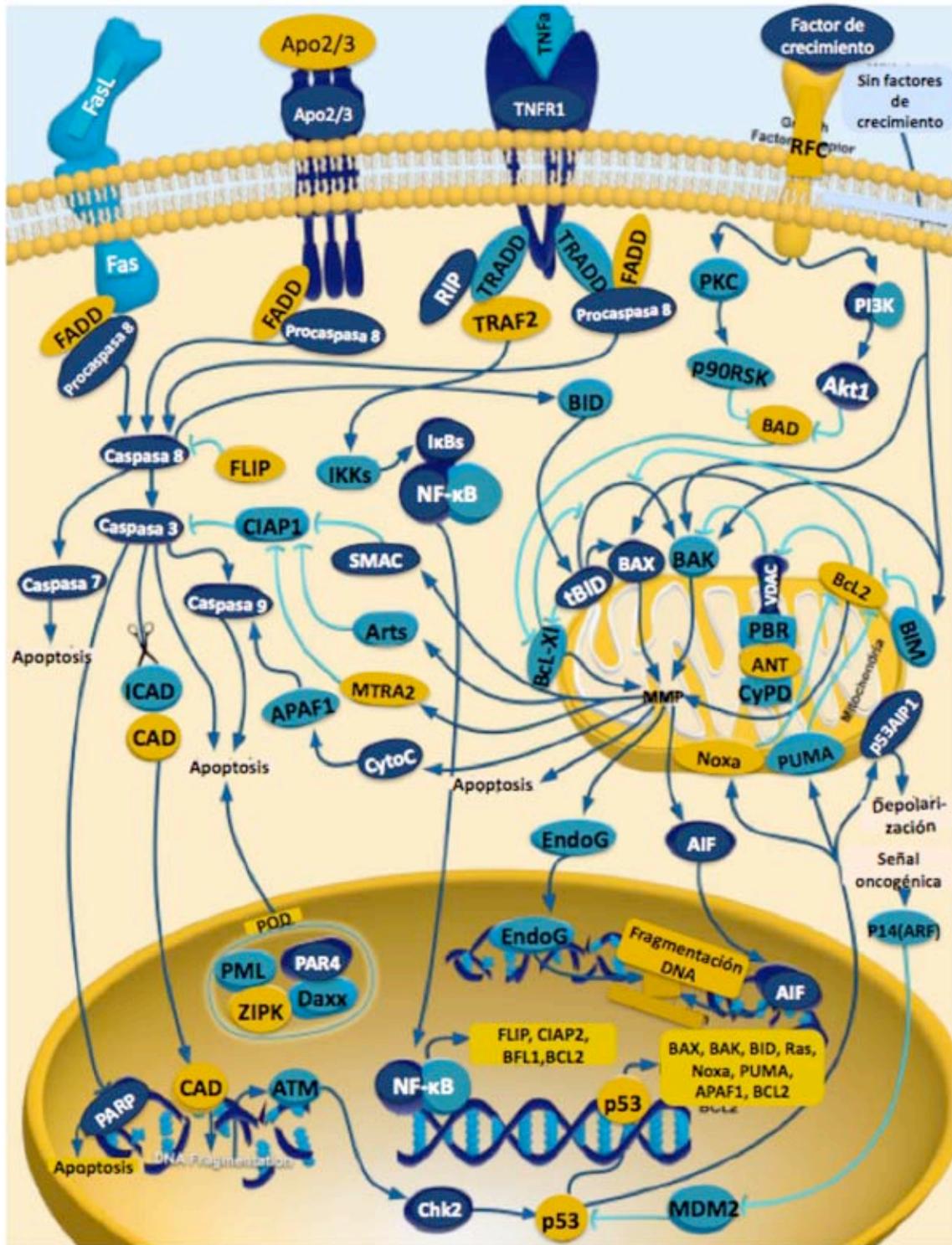


Figura 3.- Vías principales de muerte celular por apoptosis; por receptores, mitocondrial y reticular (modificado de [www.abcam.com/cancer](http://www.abcam.com/cancer)).

### 2.2.2.3 MACROAUTOFAGIA.

La macroautofagia (referida comúnmente sólo como autofagia) es un mecanismo evolucionadamente conservado, el cual regula la degradación de organelos en mal estado y proteínas de vida larga. La morfología más importante de la autofagia es la aparición de vacuolas de doble ó múltiple membrana, llamadas autofagosomas (Fig. 4). Estas estructuras secuestran parte del citoplasma y organelos de la célula, posteriormente se fusionan con lisosomas y su interior es liberado para su degradación. El resultado de este proceso es la liberación de aminoácidos, lípidos y nucleótidos que la célula puede reutilizar (Baehrecke, 2005; Mizushima, 2007; Pattingre et al, 2008). La autofagia es una adaptación metabólica a la ausencia de nutrientes extracelulares, factores de crecimiento o infecciones virales (Baehrecke, 2005, Mizushima, 2007). Por medio de este acontecimiento catabólico se obtiene energía necesaria para la subsistencia de la célula, así como materia prima para la síntesis de otras macromoléculas (Maiuri et., al 2007).

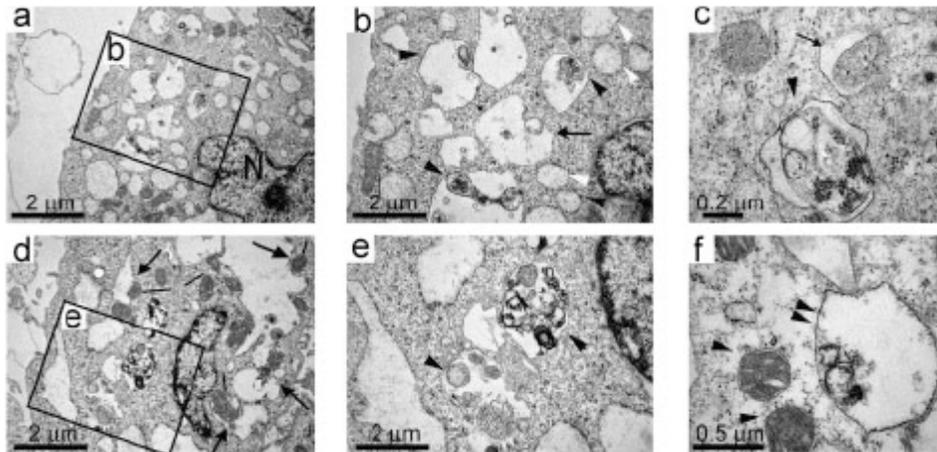


Figura 4.- Microscopia electrónica de las características morfológicas de la autofagia en células CHO. Nótese la presencia de un gran número de autofagosomas( Hwang y Lee 2008).

Aunque la autofagia se ha descrito como un proceso que permite la sobrevivencia de la célula bajo condiciones adversas, en los últimos años se ha propuesto como un mecanismo de muerte celular no apoptótica, llamada muerte celular autofágica. Se presume que la muerte celular por éste medio llega cuando existe un nivel masivo de autofagia, degradando una gran porción de citoplasma y organelos, causando una atrofia celular con el consecuente colapso de las funciones vitales. En contraste con la apoptosis, la autofagia presenta degradación

temprana de organelos, y se mantienen las estructuras del citoesqueleto. Pero en común con la apoptosis, se ha reportado activación de caspasas y degradación de DNA en etapas tardías ([Levine y Yuan, 2005](#)).

#### 2.2.2.4 MAQUINARIA DE AUTOFAGIA.

Aunque la autofagia es un proceso dinámico, puede ser analizado en diversas etapas; Inducción, nucleación, expansión, fusión y rompimiento. En la figura 5 se muestra un esquema general de este proceso y a continuación se detalla un poco cada una de las etapas.

**INDUCCIÓN:** Los principales sensores de nutrientes y reguladores de los procesos de autofagia están evolutivamente conservados entre ellos. El principal regulador de autofagia es la proteína mTOR (de "mammalian target of rapamycin"). Esta molécula tiene actividad de cinasa la cual hiperfosforila a la molécula atg13 (atg proveniente de "autophagy genes"), atg13 hiperfosforilada tiene poca afinidad por atg1 lo cual atenúa su actividad e inhibe las vías autofágicas. La regulación de autofagia en mamíferos también involucra componentes adicionales tales como eIF2 $\alpha$ , Ras y proteínas G ([Klionsky, 2005](#))

**NUCLEACIÓN:** Las estructuras preautofagosomales (PAS de sus siglas en ingles), son estructuras de doble membrana lipídica que están presumiblemente formadas *de novo* y no de un organelo ya existente. Sin embargo, el aporte de lípidos para su formación proviene del sistema Golgi/RE. Aunque el mecanismo por el cual la formación de PAS no ha sido dilucidado, se sabe que el primer paso es la activación de la proteína de mamífero Vps34 (una PI3K) que genera fosfatidil inositol-3-fosfato. La activación de Vps34 está dada por la formación de un complejo multiprotéico formado por proteínas como beclin-1, UVRAG, p150, Vps15, atg14, entre otras ([Maiuri et al 2007](#)).

**EXPANSIÓN:** La expansión de las vesículas o autofagosomas requiere de dos vías. La primera es la conjugación de atg5 y atg12 con ayuda de atg7 y atg10, la segunda vía incluye la conjugación de la fosfatidil etanolamina con LC3 por la acción secuencial de atg4, atg7 y atg3

Las estructuras preautofagosomales (PAS de sus siglas en ingles), son estructuras de doble membrana lipídica que están presumiblemente formadas de novo y no de un organelo ya existente. Sin embargo, el aporte de lípidos para su formación proviene del sistema Golgi/RE. Aunque el mecanismo por el cual la formación de PAS no ha sido dilucidado, se sabe que el primer paso es la activación de la proteína de mamífero Vps34 (una PI3K) que genera fosfatidil inositol-3-fosfato. La activación de Vps34 está dada por la formación de un complejo multiproteico formado por proteínas como beclin-1, UVRAG, p150, Vps15, atg14, entre otras (Maiuri et al 2007).

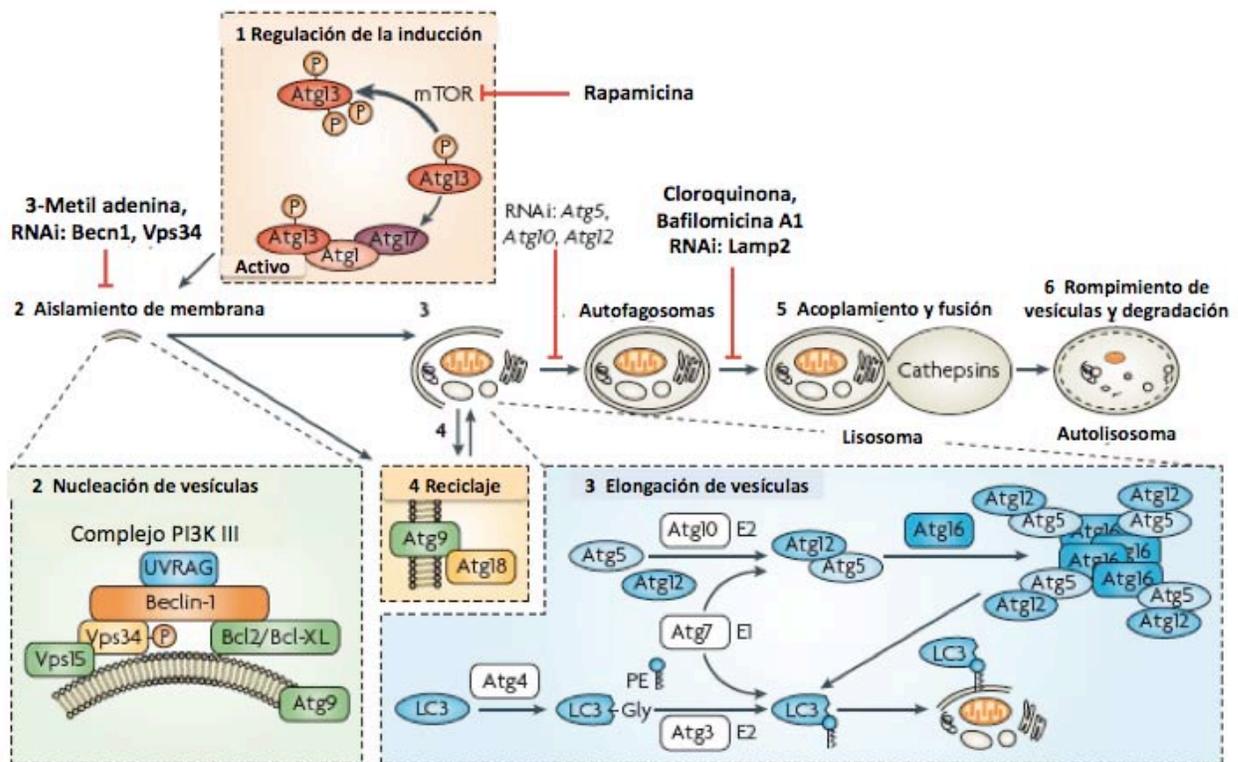


Figura 5.-Esquema general del proceso autofágico; El proceso de autofagia es altamente conservado desde levadura hasta plantas y animales (modificado de Maiuri et al., 2007)

### 2.2.3 PROTEÍNAS DE CHOQUE FRÍO (CSP).

Existen pocos reportes acerca de la respuesta molecular inducida bajo hipotermia moderada en células de mamífero; las proteínas cirp y rbm3 son las más caracterizadas de este fenómeno. La proteína de unión a RNA inducible por frío, cirp (de sus siglas en ingles cold inducible RNA binding protein), es una proteína de 172

aminoácidos que contiene un dominio de unión a RNA (Nishiyama et al, 1997b), y que está altamente conservada en células de rata, ratón y humanos(Fig. 6).

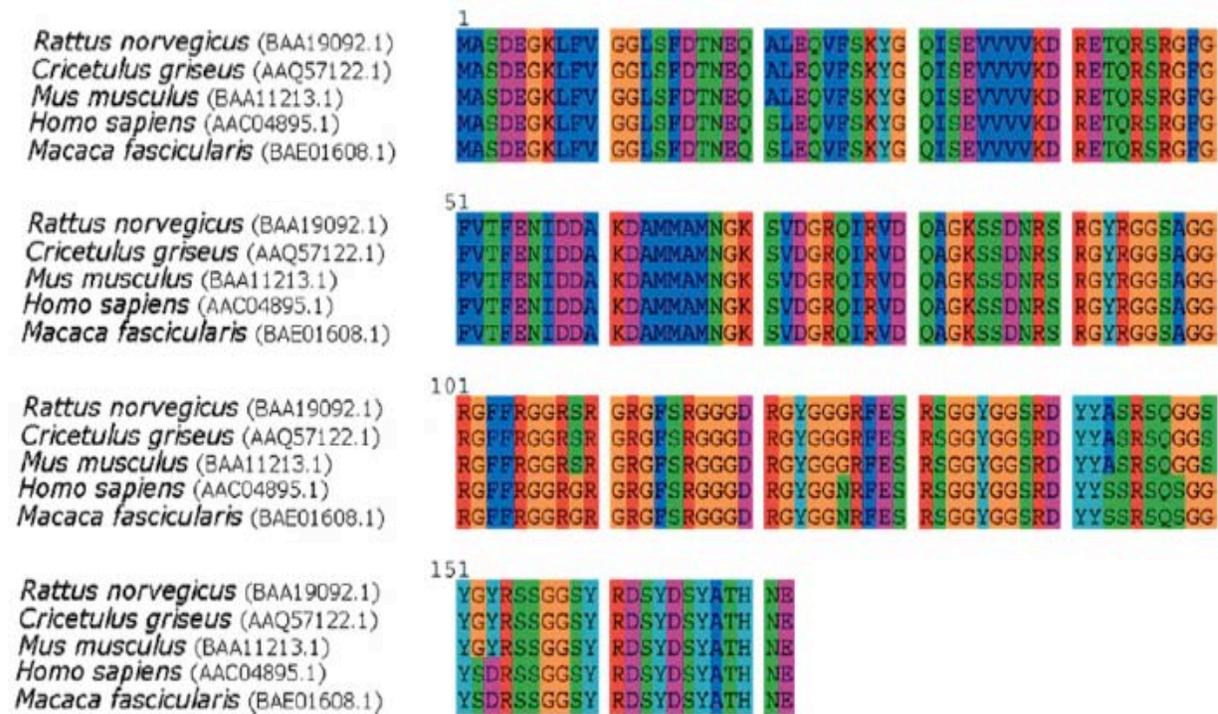


Figura 6.- Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la proteína cirp; las secuencias muestran que es altamente conservada en mamíferos ( Al-Faghee y Smalesc 2006)

Debido a la similitud estructural con otras proteínas de unión a RNA, se especula que la función de cirp es la de unirse al mRNA, resguardando su conformación y proveyéndole estabilidad bajo condiciones de estrés, protegiendo al mensajero de la degradación y aumentando su traducción. Aunque no se ha demostrado completamente, se piensa que cirp puede tener implicaciones en el ciclo celular. Nishiyama et al. (1997b) encontraron que la sobreexpresión de cirp en cultivos realizados a 37°C arresta a las células en la fase G1 del ciclo celular. Por otro lado, Sakurai et al. (2006) demostraron que cirp tiene un efecto protector en células BALB/3T3, al inhibir la activación de apoptosis inducida por receptores. El mRNA de cirp es expresado constitutivamente en muchos tejidos de ratón, aunque en muy bajos niveles. Además de la inducción por temperatura, la expresión de cirp puede

verse aumentada por otros tipos de estrés como hipoxia y radiaciones ultravioletas (Sonna et al, 2002).

La otra proteína inducida por frío es *rbm3*. Se ha observado que esta proteína tiene un peso aproximado de 18 kDa (dependiendo de la especie) y es estructuralmente muy parecida a *cirp*; ambas contienen una región rica en glicina en el amino terminal y una región de unión a RNA en el carboxilo terminal, por lo que se les han propuesto funciones parecidas (Sonna et al, 2002). Una peculiaridad de *rbm3* es que en la región 5' de su mRNA contiene una secuencia IRES (Internal Ribosome Entry Sequence) que permite el reconocimiento del mRNA por el ribosoma independientemente de la estructura CAP, esto facilita la transcripción a temperaturas subfisiológicas (Sonna et al., 2002). La función de *rbm3* no ha sido completamente explicada, sin embargo, se ha reportado que suprime significativamente la muerte celular inducida por poliglutamina (Kita et al., 2002); este último es un péptido constituido por monómeros de más de 20 glutaminas producido por la célula debido a defectos genéticos. En estudios recientes se ha demostrado que *rbm3* altera los niveles de los micro-RNA, evitando la degradación de mRNA, lo que potencializa la traducción global (Dresios et al, 2005).

#### 2.2.4 RESPUESTA GLOBAL DE CHOQUE FRÍO.

Para entender la respuesta intracelular que se da en células CHO bajo condiciones de hipotermia moderada, Baik et al. (2005) realizaron un estudio transcriptómico y proteómico, y encontraron la sobreexpresión y sub-expresión de varias proteínas en comparación con cultivos hechos a 37°C. Entre la proteínas expresadas al doble se encontraron algunas relacionadas al plegamiento adecuado de glicoproteínas (PDI, ERp57 y Hscp70), proteínas relacionadas a la generación de energía (fosfoglicerato cinasa) y un factor de transcripción relacionado al ciclo celular (NDK B). También se encontraron proteínas que disminuyen su expresión a la mitad como el factor de elongación de la transcripción EF2 y la chaperonina Hsp90-beta, que funciona en respuesta a condiciones extremas. Estos eventos podrían representar la necesidad de la célula a sobreexpresar proteínas de procesos celulares fundamentales para su supervivencia cuando está bajo estrés por frío.

### 2.3. ¿POR QUÉ AUMENTA LA PRODUCTIVIDAD DE PROTEÍNA RECOMBINANTE?

La mayoría de los reportes que muestran beneficios al cultivar las células CHO a baja temperatura son cuantitativos y existen sólo algunos reportes que intentan dar una explicación del fenómeno. Comprender el mecanismo de este evento, permitirá determinar los elementos que producen el aumento de la productividad y consecuentemente, implementar nuevos procesos con estas características para mejorar la producción. Como ya se ha indicado, arrestar las células en fase G1/G0 es una práctica común para tratar de direccionar el metabolismo hacia la producción de la proteína de interés. Ésta fue la primera explicación que se le dio al aumento de la productividad en condiciones hipotérmicas. Sin embargo, se han generado dos hipótesis alternas que ofrecen otro enfoque del fenómeno, una relacionada a la actividad proteolítica del cultivo y otra relacionada con procesos celulares a nivel molecular.

#### 2.3.1 LIBERACIÓN DE ENZIMAS LÍTICAS AL MEDIO DE CULTIVO.

Debido a los cambios morfológicos que se presentan con la muerte celular programada, se forman cuerpos subcelulares que expulsan su interior, con proteasas y glicosidasas, al medio de cultivo (Singh et al, 1994). Estas proteínas, que participan en la muerte celular, provocan la degradación de la proteína heteróloga o la alteración de su calidad referida como el patrón de glicosilación (Clark et al., 2004). Moore et al. (1997) demostraron que disminuyendo la temperatura a 32°C en cultivos de células CHO, las cinéticas de muerte celular tuvieron comportamientos similares a los cultivos a 37°C, sólo que con un retraso de tiempo (Fig. 7). En otras palabras en el esquema de hipotermia moderada, el tiempo de producción fue mayor y la degradación del producto debió disminuir.

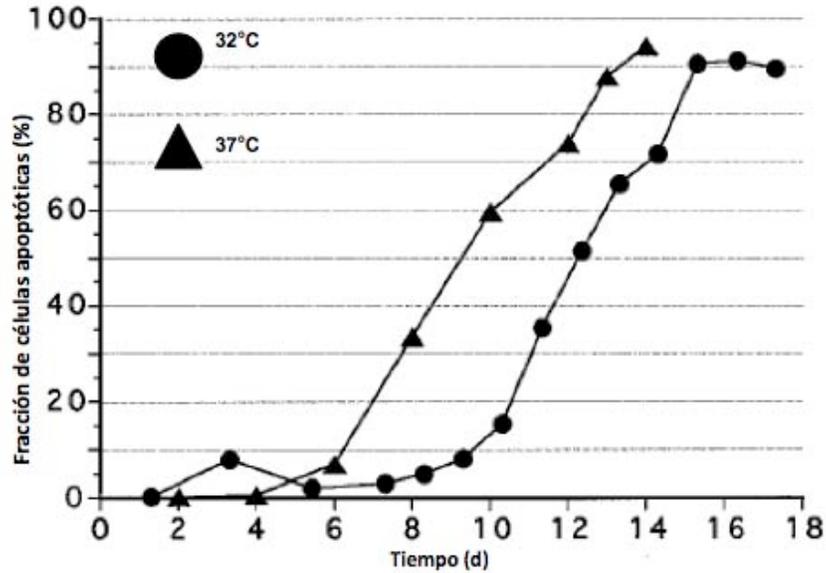


Figura 7.- Cinéticas de apoptosis en cultivos de células CHO a dos temperaturas; las cinéticas muestran la misma tendencia, pero con un retraso en la aparición de la apoptosis en los cultivos realizados a 30°C (Moore et al, 1997).

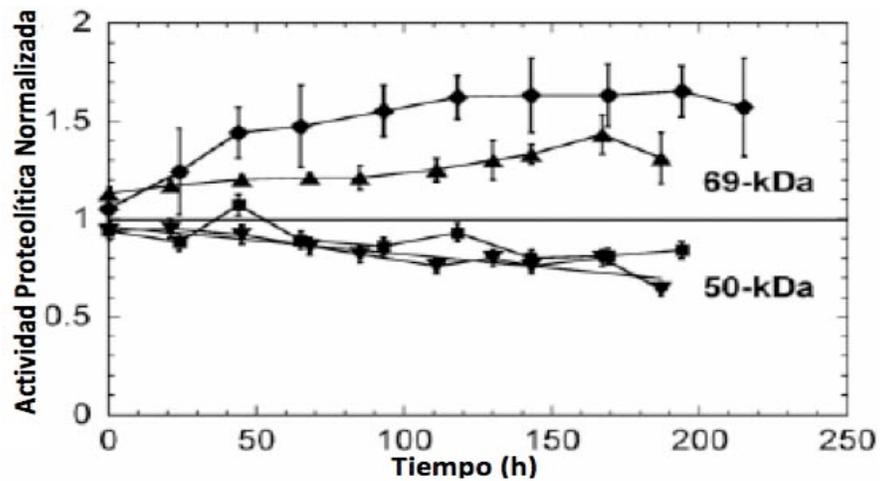


FIGURA 8.- Actividad de dos proteasas identificadas en sobrenadante de cultivos de células CHO a 37°C (▲ ;69 kDa y ▼ ;50 kDa) y cultivos a baja temperatura (◆ ;69 kDa y ■ ;50 kDa). Los ensayos fueron hechos en zimogramas (modificado de Clark et al, 2004).

Clark et al. (2004) reportaron, que en cultivos de células CHO productoras de tPA la actividad proteolítica normalizada en el medio de cultivo se ve afectada por la temperatura. En este estudio se identificaron dos proteasas principales. Una con peso molecular de 69 y otra de 50 kDa (Fig. 8). Al comparar la actividad proteolítica entre cultivos hipotérmicos y a 37°C, se observó que la actividad de la proteasa de 50 kDa disminuía en ambos cultivos con la misma proporción. Por el contrario, la

actividad de la proteasa de 69 kDa aumentó más en cultivos a baja temperatura que en cultivos a 37°C. Esto va en contra de la hipótesis que relaciona a la productividad, la actividad proteolítica y la hipotermia moderada, sin embargo, éste es el único reporte que profundiza en el tema, por lo que son necesarios más estudios para aclarar esta hipótesis.

### 2.3.2 AUMENTO DEL mRNA DE LA PROTEÍNA HETERÓLOGA.

La segunda hipótesis propuesta para explicar el fenómeno del incremento de la productividad a baja temperatura es de carácter molecular. Fox et al. (2005a) reportaron cuatro características de cultivos de células CHO en hipotermia moderada. La primera fue que los cultivos hipotérmicos contenían más mRNA de la proteína recombinante que los cultivos a 37°C; la segunda, la relación de mRNA entre 32 y 37°C fue proporcional a la relación de las productividades específicas entre 32 y 37°C (Fig. 9A); la tercera, la productividad fue directamente proporcional al porcentaje de células en fase S que contenía el cultivo (Fig. 9B), y descartaron el efecto del arresto en G1/G0. Esto también coincide con que los promotores comúnmente empleados para la transcripción de la proteína heteróloga (CMV y SV40) son activos preferencialmente en fase S (de Boer et al, 2004). Por último ellos demostraron que el tiempo de vida media del mRNA fue mayor a bajas temperaturas (Fig. 9C).

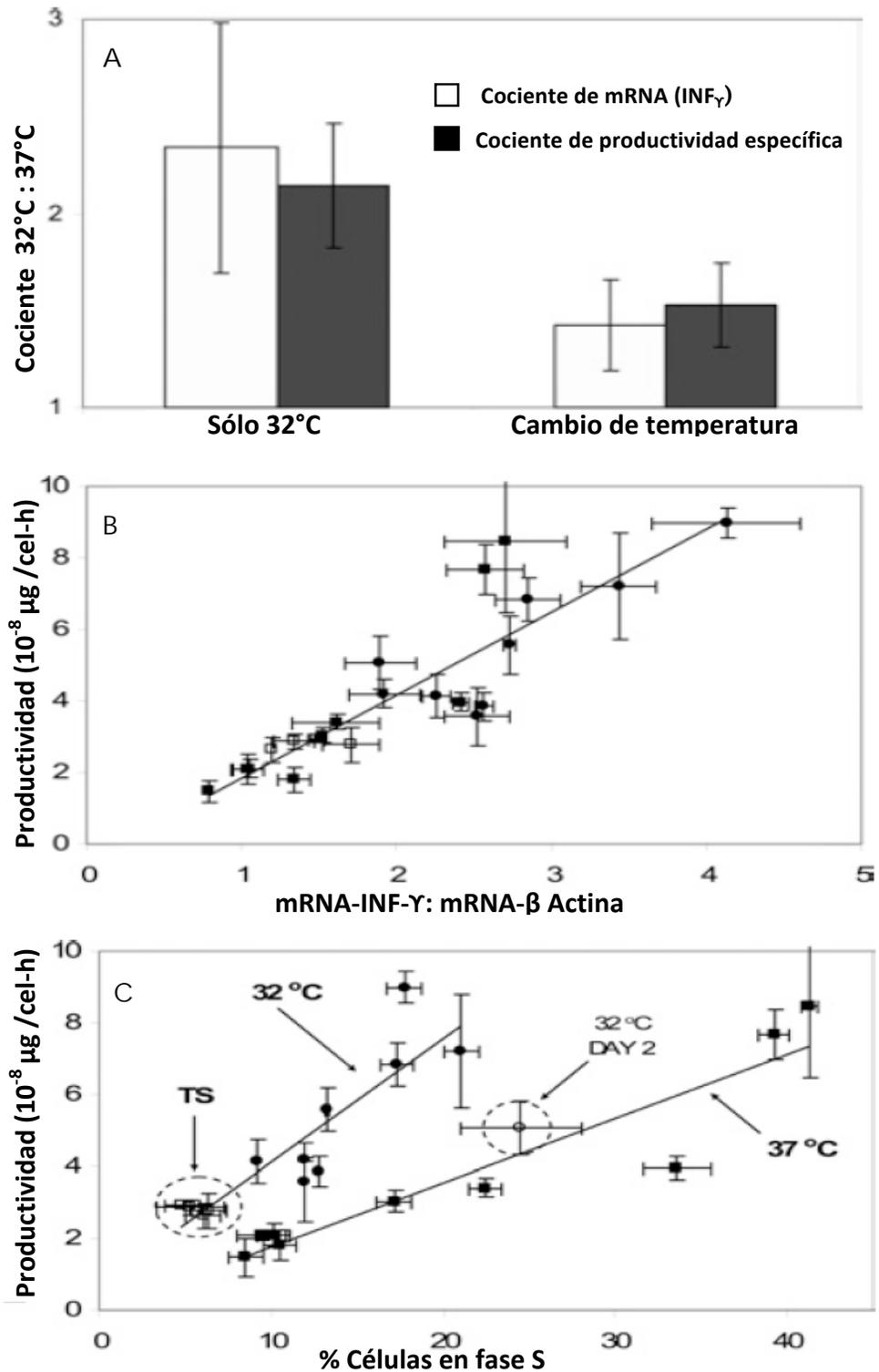


FIGURA 9.- El aumento de la productividad se debe al nivel de mRNA y éste a su vez a la fase del ciclo celular. A y B; proporcionalidad del nivel de transcrito y productividad de proteína recombinante. C; productividad de proteína recombinante con respecto del porcentaje de células en fase S (TS: cultivo con cambio de temperatura) (modificado de Fox et al. 2005a).

### 2.3.3 MODELO DE LA RESPUESTA AL CHOQUE FRÍO EN CÉLULAS DE MAMIFERO.

Con la mayoría de los reportes publicados, *Al-Fagee et al. (2006)* plantearon un modelo que explica el comportamiento molecular que se desencadena en células de mamífero bajo hipotermia moderada (entre 25 y 35°C) (Fig. 10). En este modelo se considera de gran importancia a las CSP que actúan en diferentes procesos celulares. Bajo condiciones de mediana hipotermia la traducción global disminuye, sin embargo, las CSP junto con otras proteínas no identificadas pueden actuar y unirse con los elementos *cis* en los promotores de los genes blanco, aumentando la transcripción. Cabe la posibilidad de que existan promotores alternos que sean activados o desactivados cuando disminuye la temperatura, propiciando la generación de hnRNA (RNA heterogéneo nuclear) alternos. Asimismo, ellos proponen procesamientos alternativos para estos hnRNA, que generan mRNA específicos de frío, y pueden tener un único 5' y/o 3'UTR (región 3' o 5' no traducida) y/o cambios en las regiones codificantes. La interacción de las CSP y el mRNA puede o no darse en el núcleo antes de ser transportado al citoplasma.

Uno de los factores principales que disminuyen la traducción CAP dependiente, se da por la fosforilación de los factores iniciadores de la traducción (como eIF2 $\alpha$ ). Esto a su vez promueve otro tipo de traducción vía IRES. También se dispara la formación de gránulos de estrés, los cuales son agregados de mRNA específicos o claves, que son secuestrados para que una vez que se haya adaptado la célula a las nuevas condiciones exista un reservorio de estos mRNA fundamentales.

El control central de la traducción, bajo condiciones de mediana hipotermia está dirigido principalmente por las CSP, el citoesqueleto y los mRNA específicos de frío. En el modelo se propone que las CSP toman los mRNA emergentes del núcleo ó en el núcleo mismo y son transportados al citoplasma, específicamente en el citoesqueleto, que servirá de base donde se reclutan los ribosomas y se inicia la traducción. Además en este modelo, se supone que muchos de los mRNA que son fundamentales para la sobrevivencia contienen secuencias IRES, por lo que pueden ser reclutados directamente por el ribosoma. Puede haber la participación de un grupo de proteínas que apoyan a las CSP en la estabilización del mRNA en las regiones 5'/3'-UTR. Por otra parte, existe también la propuesta de la inhibición de la

degradación de los mRNA vía miRNA (micro RNA) por interacción directa con las CSP con estos últimos.

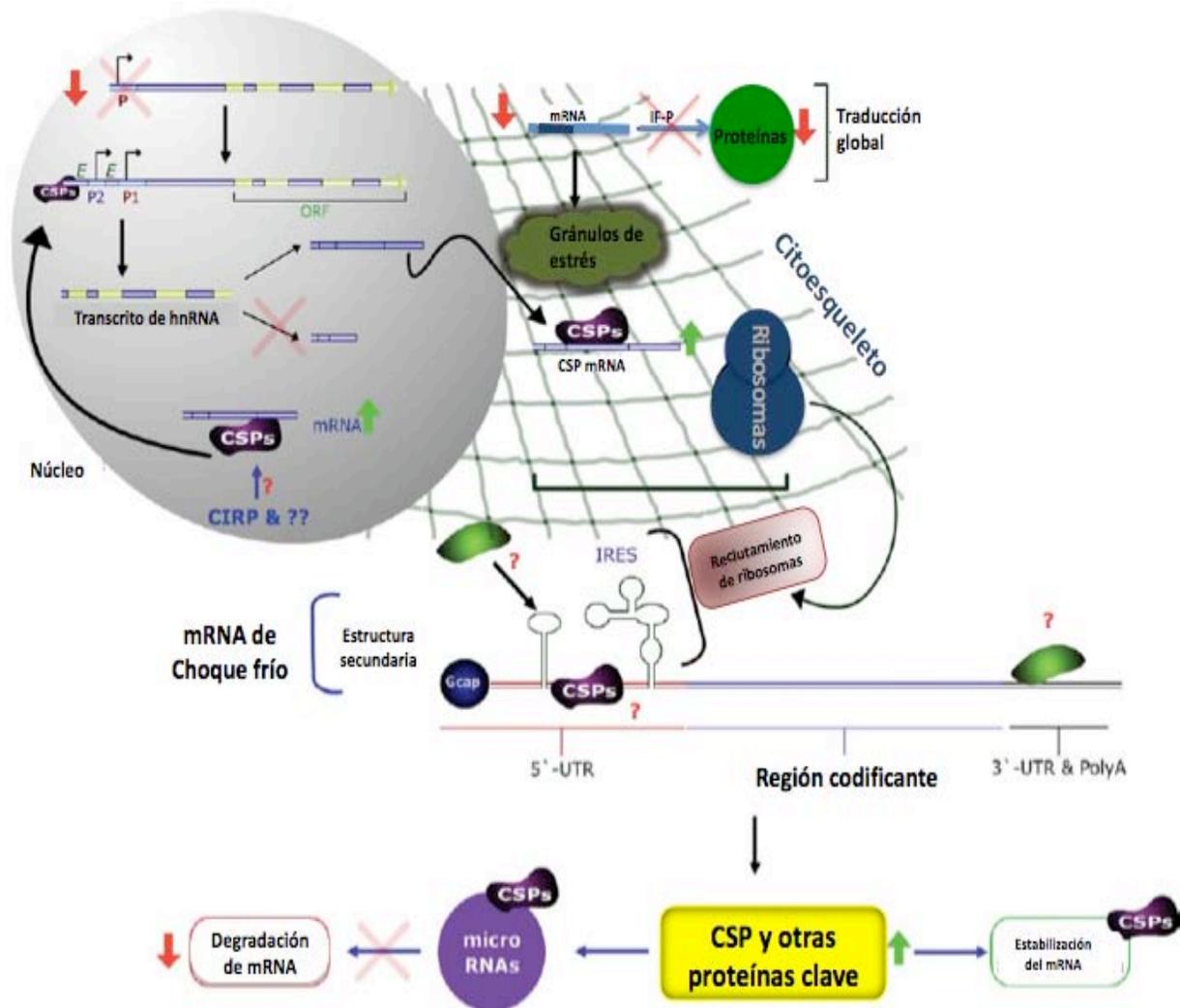


FIGURA 10.- Modelo hipotético de la respuesta global a la hipotermia moderada en células de mamífero. En el esquema se representan los elementos participantes en el modelo. Las CSP's así como el citoesqueleto juegan un papel importante. Los elementos cis pueden ser secuencias (están representados como P2,P1) de los promotores de los mRNAs de frío, los cuales dan la posibilidad de transcribir mRNAs alternos importantes para la supervivencia celular o la adaptación a los cambios de temperatura (Al-Faghee, 2006)

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La implementación de temperaturas subfisiológicas a cultivos de células CHO recombinantes mejora la productividad volumétrica y/o específica de proteína recombinante. Sin embargo, no se conocen los mecanismos por los cuales sucede este fenómeno, de tal manera que son necesarios estudios celulares y moleculares permitan entender los mecanismos y proporcionen herramientas para mejorar los procesos de producción de biofármacos en estas células.

#### **4.HIPÓTESIS.**

La disminución en la temperatura de cultivo de células CHO productoras de una glicoproteína recombinante modelo, afectará algunos procesos celulares como metabolismo, ciclo y muerte celular, lo que podrá explicar la relación que existe entre la temperatura del cultivo y el aumento en la productividad de proteína recombinante.

## **5.OBJETIVOS.**

### **5.1.GENERAL.**

- Estudiar el efecto de la temperatura subfisiológica sobre la productividad de proteína recombinante, metabolismo, ciclo y muerte celular en cultivos de células CHO recombinantes.

### **5.2 ESPECÍFICOS.**

- Realizar una serie de cultivos bifásicos (con cambios de temperatura de 37 a 30°C) de células CHO recombinantes y determinar el tiempo óptimo de cambio de temperatura con base en la productividad volumétrica.
- Obtener y comparar los comportamientos cinéticos y parámetros de consumo/producción de glucosa, lactato, glutamina y glutamato, entre los cultivos a 37°C, 30°C y el cultivo bifásico seleccionado.
- Determinar las cinéticas de ciclo celular entre los cultivos a 37°C, 30°C y el cultivo bifásico seleccionado, y relacionarlas con la productividad de proteína heteróloga.
- Determinar el tipo de muerte celular programada presente en los cultivos a 37°C, 30°C y el cultivo bifásico seleccionado.

## **6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.**

Como se mencionó en la sección de objetivos, la meta principal de este trabajo fue determinar la relación existente entre la temperatura subfisiológica, metabolismo, ciclo, muerte celular y la productividad de una glicoproteína recombinante modelo. Para comprender mejor esta relación, se decidió evaluar tres condiciones; cultivos control, cultivos a temperatura subfisiológica constante y cultivos bifásicos (con cambio escalonado de temperatura). Con base en esto, se decidió separar el proyecto en dos rubros principales. El primero, con un carácter más cuantitativo, fue la selección del mejor cultivo bifásico a trabajar, comparando el desempeño de cultivos bifásicos con cambio de temperatura a diversos tiempos. En este caso se tomó como criterio de selección la productividad volumétrica. La finalidad de esta sección del proyecto, fue demostrar que el sistema con que se trabajó responde favorablemente a la hipotermia moderada. Una vez demostrado esto, la segunda parte del proyecto, con un carácter más cualitativo, tuvo la finalidad de identificar características de la muerte celular en cultivos hipotérmicos que podrían ser relevantes para la productividad. En este sentido, el metabolismo, el ciclo celular y la muerte celular juegan un papel integral.

Una vez conocido el comportamiento de la muerte celular en los cultivos a temperatura subfisiológica, es posible manipular el cultivo (por ejemplo en relación a la muerte celular) como una estrategia para mejorar la productividad de cultivos control y cultivos hipotérmicos. En la figura 11 se muestra un esbozo general de la estrategia experimental del proyecto.

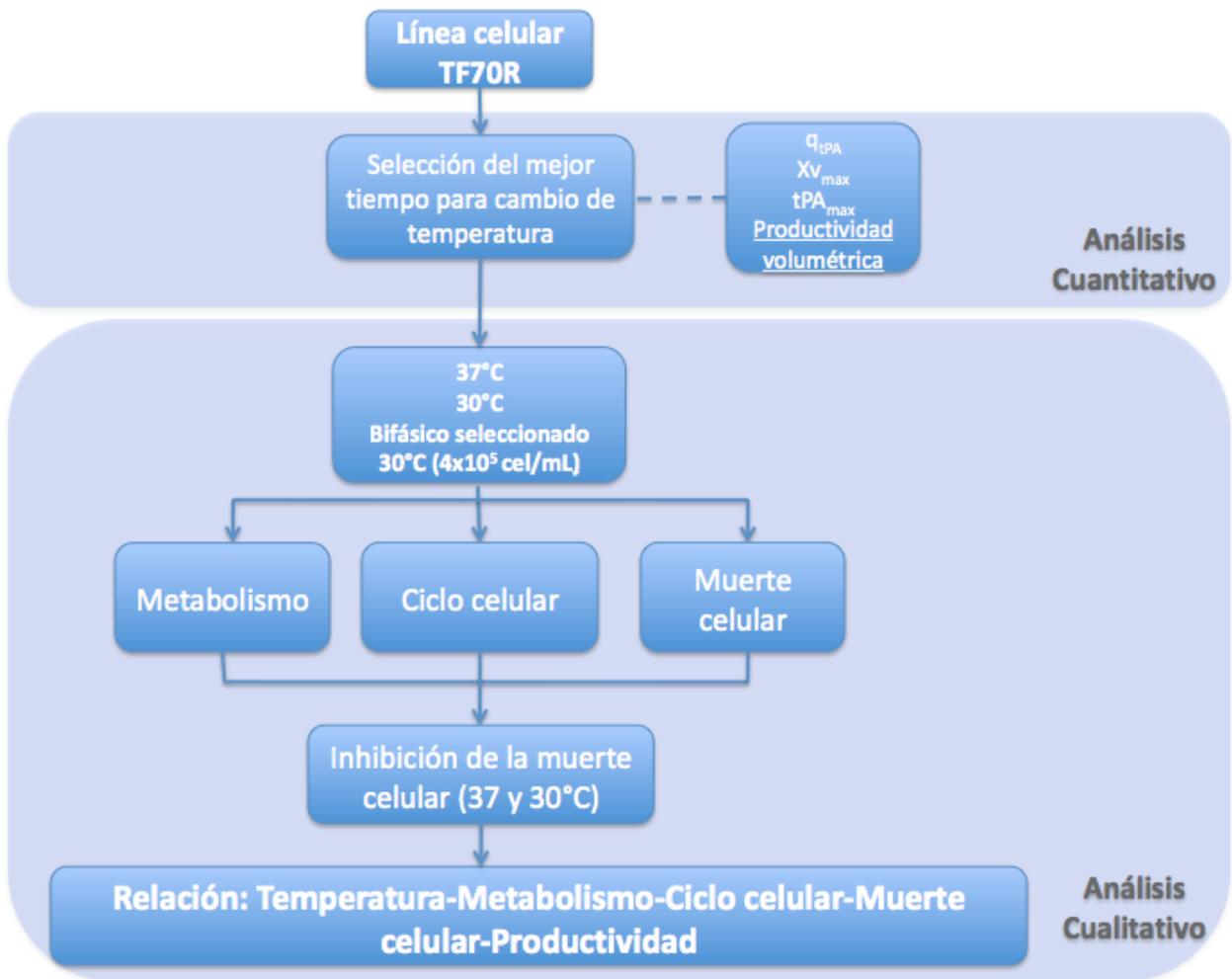


FIGURA 11-Estrategia experimente seguida para el desarrollo del proyecto

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **7.1. CULTIVOS CELULARES.**

La línea celular CHO TF70R (proporcionada por la Dra. Claudia Altamirano de la Universidad Católica de Valparaíso, Chile) fue establecida por medio de la cotransfección de los genes de tPA y dhfr a una línea celular CHO-dhfr<sup>(-)</sup>. Los genes están dirigidos por el sistema promotor/potenciador de SV40 (Lloyd et al., 1998). El medio de cultivo utilizado para esta línea celular fue CDM4CHO (HyClone) químicamente definido y suplementado con 4mM de glutamina (Sigma), lípidos 1X (Gibco) y antibióticos 1X (Sigma). Los cultivos fueron establecidos en frascos agitados de 250 mL con un volumen de trabajo de 120 mL, en una incubadora de atmósfera controlada a 95% de humedad, 5% CO<sub>2</sub> y con una velocidad de agitación de 60 rpm. La concentración celular inicial fue entre 0.15x10<sup>6</sup> y 0.2x10<sup>6</sup> células viables/mL con una viabilidad superior a 90%. Las temperaturas utilizadas en este estudio fueron 37 y 30°C. Los cultivos bifásicos, se realizaron con cambios súbitos (escalonados) de temperatura, pasando de 37 a 30°C.

Para los ensayos de inhibición de autofagia, los cultivos fueron realizados en frasco T75, con un inóculo de entre 0.15x10<sup>6</sup> y 0.2x10<sup>6</sup> cel/mL y con una viabilidad superior al 90%. Al inicio de los cultivos se agregó el inhibidor de autofagia LY294002 (Sigma) disuelto en DMSO a una concentración final de 5µM. El LY294002 es un inhibidor de la PI3K clase III (Vps34) la cual forma parte del complejo formador de autofagosomas. Este experimento estuvo constituido por cuatro cultivos; dos de ellos a 30°C y dos a 37°C. A uno de los dos cultivos de cada condición de temperatura se le agregó el inhibidor desde el inicio, y a los cultivos restantes se les agregó solamente el disolvente del inhibidor (DMSO).

### **7.2. CONCENTRACIÓN , VIABILIDAD Y DIÁMETRO CELULAR.**

La concentración celular y diámetro promedio, se determinaron con un contador de partículas Coulter Counter Multisizer II (Coulter Electronics, Hialeah, FL). La viabilidad celular se cuantificó con hematocitómetro mediante el método de exclusión de azul de tripano (Sigma) al 0.08% en solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

### **7.3. CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA, LACTATO , GLUTAMINA Y GLUTAMATO.**

La concentración de glucosa, lactato, glutamina y glutamato se determinó por métodos enzimáticos en un YSI Biochemical Analyzer 2700 (YSI Instruments, Yellow Springs, OH), utilizando soluciones de referencia de 2.5 g/L, 0.5 g/L, 4mM y 5mM respectivamente para cada uno de los metabolitos.

### **7.4. DETERMINACIÓN DE tPA.**

La concentración tPA fue determinada por cuantificación en ensayos de ELISA como se describe a continuación.

Se realizaron las diluciones correspondientes de la muestra en PBS(1:10) y se colocaron en una placa para ELISA de 96 pozos. Se dejó incubar por 12 h a 4°C, posteriormente se lavó una vez con PBS-Tween (0.5 mL/L de Tween-20 en PBS) y se bloqueó la superficie vacía con solución de albumina de suero bovino (BSA) libre de proteasas a una concentración de 10 mg/mL. Se hicieron 2 lavados con PBS-Tween. Después se agregó el anticuerpo anti-htPA (Abcam plc, Cambridge, U.K.) a una dilución de 1:2500 y se incubó por 2 h a temperatura ambiente. En seguida se realizaron 2 lavados más con PBS-Tween y se agregó el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina a una dilución de 1:1000, el cual se incubó por 2 h más. Finalmente se hicieron tres últimos lavados y la placa se reveló con 120 µg/mL de p-nitrofenil fosfato(sustrato de fosfatasa alcalina-SIGMA) en solución de DEA (Dietanolamina 10mL/L, NaN<sub>3</sub> y MgCl<sub>2</sub>), con un tiempo de reacción de 10 min. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

### **7.5. DETERMINACIÓN DE CICLO CELULAR Y POBLACIÓN SUB-G1.**

La cuantificación del ciclo celular y el porcentaje de la población sub-G1 como posible apoptosis, se realizó por citometría de flujo mediante el método descrito por Meneses-Acosta et al. (2001). Brevemente, se centrifugaron 1x10<sup>6</sup> células a 1500 rpm por 5 min en una centrifuga Eppendorf 5810R con rotor A-4-62, y se fijaron con etanol frío al 70%, y se guardaron a -20°C (por mínimo 2 h y un máximo de 3 semanas). Posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min y se desechó el etanol. Enseguida se incubó con amortiguador A (30mg/L de tripsina pancreática

porcina en solución base\* a pH 7.6) durante 10 min mezclando cada 2 min. Después, se agregó amortiguador B (30 mg/L de inhibidor de tripsina, 100 mg/L de ribonucleasa A en solución base\* a pH 7.6) seguido de un periodo de incubación de 10 min mezclando cada 2 min. Finalmente se dejaron incubar por 10 min en amortiguador C (500mg/L de yoduro de propidio y 1.16g/L de tetrahidrocloruro de espermina a pH 7.6 en solución base\*). Esta preparación celular fue procesada en un FACScalibur Becton-Dickinson (Franklin Lakes, NJ ) a una longitud de onda de excitación y emisión 488 y 620 nm, respectivamente.

Este método se basa en la cuantificación de DNA por lo que la población que ha fragmentado su DNA por causa de la muerte celular, es llamada población sub-G1. Ésta puede ser confundida con los restos de otras células muertas. Para evitar tal confusión, en este trabajo se realizó la cuantificación de la población sub-G1 con un arreglo de escala logarítmica en la señal de fluorescencia, así mismo, se descartaron los desechos celulares que tienen menor tamaño que las células completas (Fig. 17)([Mercille y Massie ,1999](#)).

\*Solución base (1g/L ácido cítrico, 1ml/L de Igepal CA-630, 522 mg/L tetrahidrocloruro de espermina y 60.5mg/L de trizma hidrocloreuro).

## **7.6 ENSAYO DE FRAGMENTACION DE DNA CROMOSOMAL POR ELECTROFORESIS.**

Para determinar el perfil de degradación de DNA y asu vez el tipo de muerte celular,  $1 \times 10^6$  fueron centrifugadas y lavadas, posteriormente se lisaron en 400  $\mu$ L bufer de lisis conteniendo 50 mM Tris (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 1% SDS, and 400 mg/mL proteinasa K (Sigma) a 37°C durante 14 h. Los lisados fueron extraidos con solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El DNA cromosomal fue precipitado con etanol al 100% frío, seguido de un lavado con isopropanol al 100% frío. Después las muestras fueron incubadas con RNasa A (1 mg/mL a 37°C por 30 min). Las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% conteniendo 1  $\mu$ g/mL de bromuro de etidio a 50 V por 40 min.

## **7.7 DETERMINACIÓN DE LC3II POR WESTERN BLOT.**

Para observar la aparición de la isoforma LC3 II, se obtuvieron extractos de proteína total de  $1 \times 10^6$  células centrifugadas a las que se agregó 40  $\mu$ L de buffer de lisis (0,1% tritón X-100, 1M de NaCl, 0,25M de EDTA, 0,25% de ácido peryodico y solución de inhibidores de proteasas), seguido de un periodo de incubación de 15min en hielo. Después se agregó 50  $\mu$ L de agua a las muestras y se sonicaron con un equipo vibracel VC505 (Sonics & materials, Connecticut, USA) con un pulso de 10 s a 30% de amplitud. Las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm y se separó el sobrenadante. Aproximadamente 20  $\mu$ g de proteína (cuantificados en ensayo de Bradford en placa de acuerdo al fabricante (Bio-rad)), fueron cargados por carril en un gel de acrilamida al 16%, para posteriormente ser corridos a 30 mA por 1h. Posterior a ello, la separación se transfirió de forma húmeda a una membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia (192mM de Glicina, 25mM de tris y 20% de metanol) por 2 h. Después de la transferencia se realizó el bloqueo de las membranas con leche descremada al 5% en buffer PBS-Tween 20 al 0.1% durante 2 h, seguido por 3 procesos de lavados de 15 min con PBS-Tween 20 al 0.1%. En seguida se realizó la incubación del anticuerpo primario (policlonal conejo anti-LC3 (Sigma)) diluido en PBS en relación 1:1000 por 45 min, seguido de 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0.1% de 15 min. El último proceso de incubación fue del anticuerpo secundario cabra anti conejo (Jackson immunoresearch ) acoplado a peroxidasa por otros 45 min a una dilución de 1:2500 en PBS con un lavado de 20 min y 2 de 15 min con PBS-Tween 20 al 0.1%. El revelado se llevó a cabo con 5mL de carbazol al 0.5% en 12 mL de buffer de acetatos 0.5M (pH 5.5) con 30  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno al 30%. Después de ser reveladas, las membranas fueron escaneadas para analizar el patrón de bandas.

## **7.8 MICROSCOPIAS ELECTRONICAS DE TRANSMISIÓN.**

Para la obtención de las imágenes de microscopía electrónica de transmisión, se colectaron  $1 \times 10^6$  cel y se centrifugaron a 500 rpm, al pellet se le agregó fijador de Karnousky y fue guardado a 4°C por una hora. Posteriormente se removió el fijador y se agregó una solución al 0.1 M de cacodilatos y se guardó a 4°C por no más de 1 mes. Las muestras fueron fijadas con tetraóxido de osmio al 1% por 1 h. Se lavaron 2

veces con agua destilada. Después, se realizaron deshidrataciones graduales con soluciones de etanol del 70-100% y se resuspendieron en óxido de propileno al 100%. Paso seguido las muestras se fijaron con resina epoxica por incubaciones sucesivas de 1 h de 1:1 y 2:1 de resina:óxido de propileno. Se dejó polimerizar en 100% de resina epóxica por 48h a 60°C. Posteriormente se tiñeron las muestras con acetato de uranilo al 2.5 % y rojo plomo a 0.3% (secciones aproximadas de 0.05 a 0.1 mm). Las observaciones fueron hechas en un microscopio electrónico M-Jeol 1010 (Instituto de Investigaciones Biomedicas-UNAM).

## 7.9 CÁLCULOS.

De acuerdo con el modelo de crecimiento exponencial, descrito por:

$$\frac{dX_v}{dt} = \mu X_v \dots\dots\dots(1)$$

que al integrar y graficar  $\ln X_v$  contra  $t$  se obtuvieron los valores de las pendientes en la fase de crecimiento exponencial que representan las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ). Los rendimientos ( $Y_{X_v/b}$ ) se obtuvieron en la fase de crecimiento exponencial mediante la siguiente ecuación:

$$Y_{X_v/b} = \frac{\Delta X_v}{\Delta b} \dots\dots\dots(2)$$

donde b representa cualquier metabolito o sustrato. La velocidad de producción de tPA se obtuvo de los valores de la pendiente al graficar la integral de células vivas (ICV) contra la concentración de tPA ( $tPA$ ), en donde:

$$ICV = \sum_{i=1}^n \left( \frac{X_{v_{i+1}} - X_{v_i}}{\ln(X_{v_{i+1}}) - \ln(X_{v_i})} \times (t_{i+1} - t_i) \right) \dots\dots\dots(3)$$

La ecuación 3 es una aproximación de integración numérica de células viables, donde  $X_{v_i}$  es el valor de células viables a un tiempo determinado  $t_i$ , y  $X_{v_{i+1}}$  es el número de células viables al tiempo  $t_{i+1}$ . Las velocidades específicas de consumo o producción de sustratos o metabolitos se obtuvieron mediante la siguiente ecuación:

$$q_b = \frac{\mu}{Y_{xv/b}} \dots\dots\dots(4)$$

donde b es cualquier metabolito o substrato

## 8. RESULTADOS .

Los reportes publicados hasta el momento indican que la hipotermia moderada en células CHO resulta en un aumento de la productividad específica, pero no siempre en un aumento de la productividad volumétrica debido a la baja densidad celular alcanzada (Kaufmann et al,1999; Hendrich et al, 2001; Yoon et al, 2003a; Schatz et al., 2003; Fox et al, 2004; Fogolin et al, 2005 Yoon et al, 2006b). Por ello, la implementación de cultivos con cambio de temperatura, ha sido una buena estrategia para mejorar el desempeño de cultivos hipodérmicos, ya que inicialmente se promueve el crecimiento y posteriormente se disminuye la temperatura (Yoon et al 2006b). El tiempo óptimo para el cambio temperatura depende de la línea celular (Fox et al. 2004; Yoon et al. 2006b), por lo que se decidió evaluar varios tiempos de cambio de temperatura con el objetivo de seleccionar de forma racional el cultivo bifásico con mejor productividad volumétrica.

### 8.1. DETERMINACIÓN DEL MEJOR TIEMPO PARA CAMBIO DE TEMPERATURA: 37 A 30°C.

En esta serie de experimentos se realizaron los cultivos bifásicos con cambios de temperatura entre las primeras 24 y 120 h de cultivo con intervalos de 24 h. En la Figura 12 se muestran las gráficas de crecimiento celular, viabilidad y producción de proteína recombinante. La concentración celular máxima fue un parámetro que tuvo grandes diferencias en este experimento. Claramente la exposición a 30°C mermó el crecimiento celular (Figura 12A), ya que en el cultivo control a 37°C se obtuvo la concentración celular más alta ( $1.81 \times 10^6$  cel/mL) seguido del cultivo bifásico con cambio a las 120 h y disminuyendo en el siguiente orden: cambios a 96, 72, 48, 24 h y control a 30°C, este último logró la concentración celular más baja (20% del máximo obtenido a 37°C) ya que fue el que se expuso mayor tiempo a 30°C. En la Tabla 3 se puede observar que la línea celular TF70R cultivada a 30°C disminuye un 87% su velocidad específica de crecimiento con respecto a 37°C.

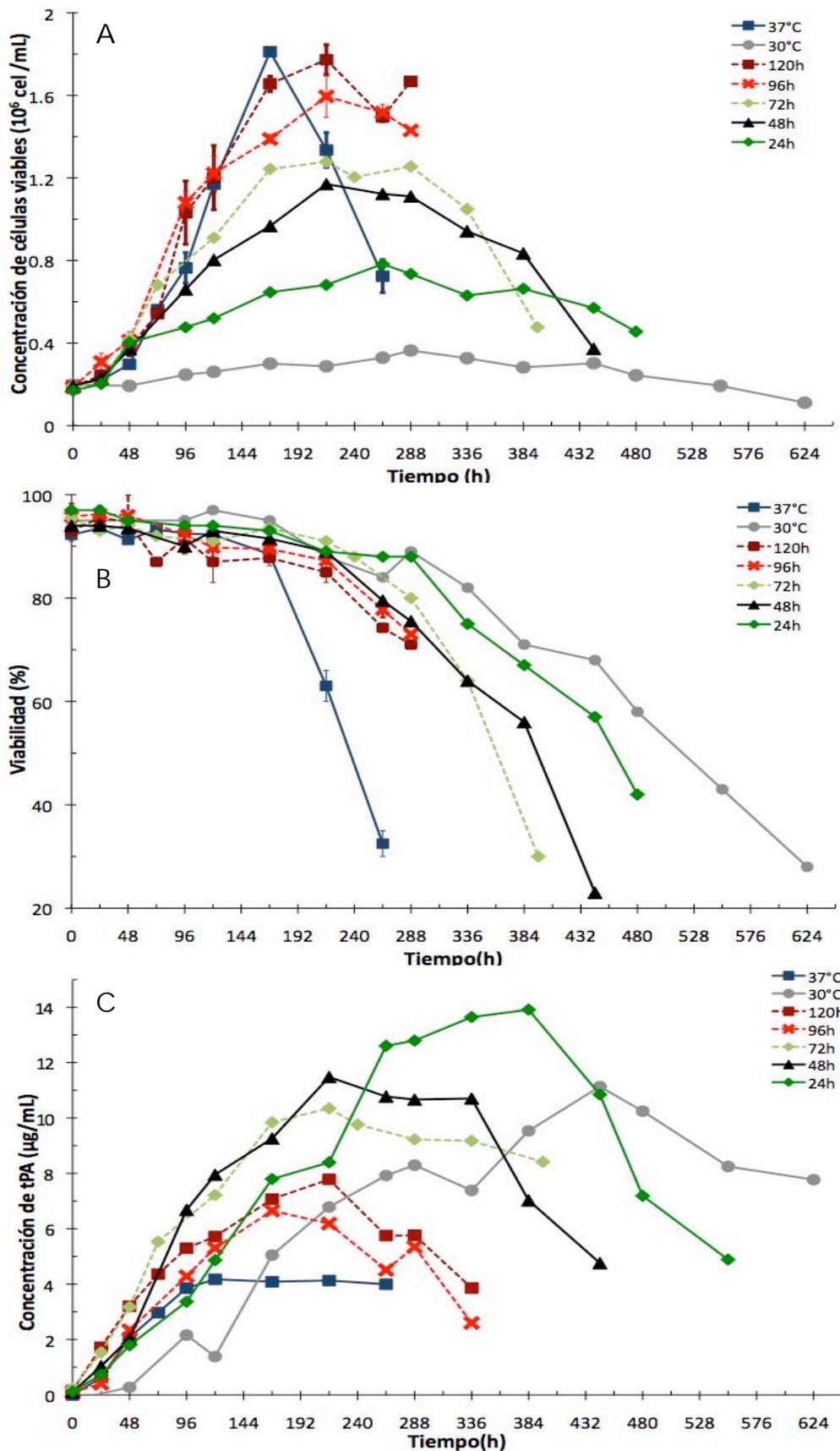


FIGURA 12.- Cultivos bifásicos con cambio de temperatura de 37°C a 30°C en diferentes tiempos del cultivo; A) cinética de crecimiento celular. B) evolución de viabilidad. C) producción de tPA.

Contrario a los efectos negativos en la concentración celular máxima y velocidad específica de crecimiento, la viabilidad celular se vio favorecida por la disminución de la temperatura, ya que en este caso, mientras más tiempo se expusieron los cultivos a 30°C, permanecieron más tiempo con viabilidad alta (Figura 11B). De esta manera, la viabilidad del cultivo a 37°C disminuyó primero que todas, seguido de 120, 96, 72, 48, 24 h y por último el control a 30°C. Una característica que se pudo notar en el comportamiento de viabilidad del cultivo a 37°C (Figura 12B), fue la caída súbita de este parámetro después de las 144 h, punto donde inicia el proceso de muerte celular masiva. En contraste, en los cultivos expuestos a 30°C la disminución en la viabilidad fue más lenta.

Tabla3.- Efecto del tiempo de cambio de temperatura en el desempeño de cultivos bifásicos.

Cultivo	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	X <sub>v max</sub> (10 <sup>6</sup> cel/mL)	tPA <sub>max</sub> ( mg/L)	q <sup>IPA</sup> ( pg/cel-d)	Productividad Volumétrica ( mg/L-h)
Control a 37°C	0.37	1.81	4.17	2.49	0.034
Control a 30°C	0.051	0.363	11.13	3.12	0.025
24h	0.074*	0.782	13.9	1.99*	0.036
48h	0.156*	1.17	11.4	1.44*	0.053
72h	0.151*	1.27	10.3	1.152*	0.047
96h	0.074*	1.59	7.7	0.36*	0.036
120h	0.098*	1.77	6.6	0.12*	0.039

\*Cálculos realizados a después del cambio de temperatura.

La producción de proteína recombinante reveló que el sistema con el cual se trabajó responde favorablemente a la hipotermia moderada. La concentración más alta de tPA (13.9 µg/mL), se alcanzó en el cultivo bifásico con cambio de temperatura a las 24 h, mientras que la concentración más baja (4.17 µg/mL) se obtuvo en el cultivo control a 37°C. En la Tabla 3 se muestra que la productividad específica en el cultivo a 30°C fue la más alta (3.12 pg/cel-d), alrededor de un 30% más que a 37°C, sin embargo, el cultivo con cambio a las 48 h alcanzó la productividad volumétrica más alta (0.053 mg/L-h).

En la Figura 13 se muestra una gráfica característica para el cálculo de productividad específica. Aquí, se puede apreciar que la producción de proteína recombinante a 37°C es asociada al crecimiento (Dutton et al., 1998), ya que en el

momento en que las células dejaron de crecer (flecha) el tPA se dejó de producir. No obstante, en el cultivo a 30°C aunque las células dejaron de crecer (flecha) el tPA continuó produciéndose, por lo que bajo esta condición se trata de un proceso de producción parcialmente asociado al crecimiento (Dutton et al., 1998).

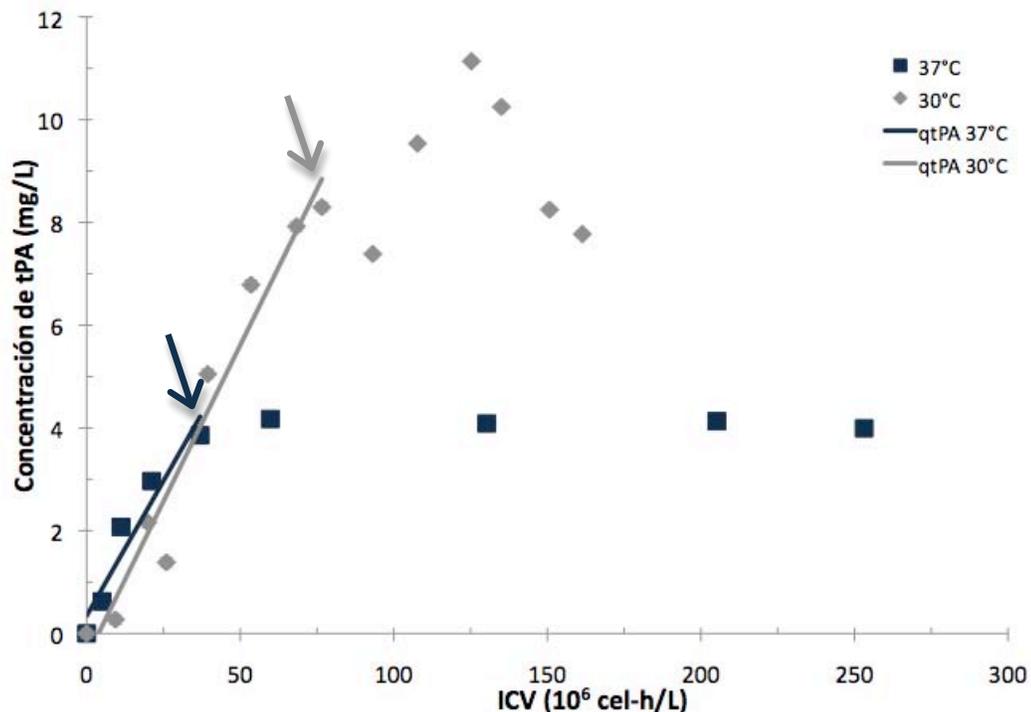


FIGURA 13- Concentración de tPA como función de ICV (integral de células viables); en esta gráfica las pendientes de las regresiones lineales representan la qtPA y la flecha representa el punto donde las células dejaron de crecer.

En el experimento para determinar el mejor tiempo para el cambio de temperatura, se obtuvieron los parámetros cinéticos de los cultivos bifásicos después del cambio de temperatura. En la Tabla 3 se puede observar que la  $\mu$ , y la  $q_{tPA}$  de los cultivos bifásicos no se comportaron igual que los parámetros del cultivo monofásico a 30°C. Si se toma como referencia el cultivo control a 30°C, la velocidad de crecimiento aumentó de 0.051 d<sup>-1</sup> a 0.074, 0.156, 0.15, 0.074 y 0.09 d<sup>-1</sup> en los cultivos bifásicos con cambios a las 24, 48, 72, 96 y 120 h, respectivamente. La productividad específica disminuyó a medida que el cambio de temperatura se difirió más tiempo, ya que en el cultivo control a 30°C se obtuvo la mayor  $q_{tPA}$  (3.12 pg/cel-d), pero disminuyó a 1.99, 1.44, 1.15, 0.36 y 0.12 pg/cel-d para los cambios de temperatura a las 24, 48, 72, 96 y 120 h.

## 8.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA SUBFISIOLÓGICA SOBRE EL METABOLISMO, CICLO Y MUERTE CELULAR.

Como se mencionó anteriormente, se decidió estudiar tres condiciones de cultivo: cultivo a 37°C, cultivo bifásico y cultivo a 30°C. En la Tabla 3, se observa que el cultivo con cambio de temperatura a las 48 h presentó la mejor productividad volumétrica (0.053 mg/L-h). Por dicha razón esta condición de cultivo bifásico fue utilizada para los siguientes experimentos. Las diferencias en los parámetros cinéticos de los cultivos bifásicos evaluados en el experimento de la sección 7.1, sugieren que la concentración celular y/o la concentración de factores de crecimiento son determinantes en el desempeño de cultivos hipotérmicos. Con base en esto se decidió incluir una condición adicional consistente en un cultivo a 30°C con inóculo de  $0.4 \times 10^6$  cel/mL. A este cultivo se le denominará cultivo 30°C/4 de ahora en adelante.

### 8.2.2 CRECIMIENTO, VIABILIDAD Y DIAMETRO CELULAR.

En esta serie de experimentos, el comportamiento del crecimiento celular y la viabilidad de los cultivos a 37, 30°C y bifásico fue similar al que se observó en el experimento de evaluación de cultivos bifásicos (Sección 7.1). La nueva condición ensayada en esta etapa (30°C/4) mostró una concentración celular máxima de  $0.7 \times 10^6$  cel/mL, una viabilidad similar al cultivo bifásico y una velocidad específica de crecimiento de  $0.055 \text{ d}^{-1}$ , aproximadamente la misma velocidad que el cultivo a 30°C con  $0.2 \times 10^6$  cel/mL de inóculo. En la Figura 14 se muestran los perfiles de crecimiento celular y viabilidad de los cultivos control (37 y 30°C), cultivo bifásico y cultivo 30°C/4.

Una característica que se identificó en los cultivos a baja temperatura fue el aumento del tamaño celular (Fig. 15), por lo que tal parámetro se cuantificó en esta parte del estudio (Figura 14C). El comportamiento del diámetro celular del cultivo a 37°C, no tuvo cambios significativos en las primeras 72 h (permaneciendo entre los 13.5 y 14  $\mu\text{m}$ ). Sin embargo, después de tal periodo comenzó a disminuir hasta llegar a un promedio de 11.6  $\mu\text{m}$ .

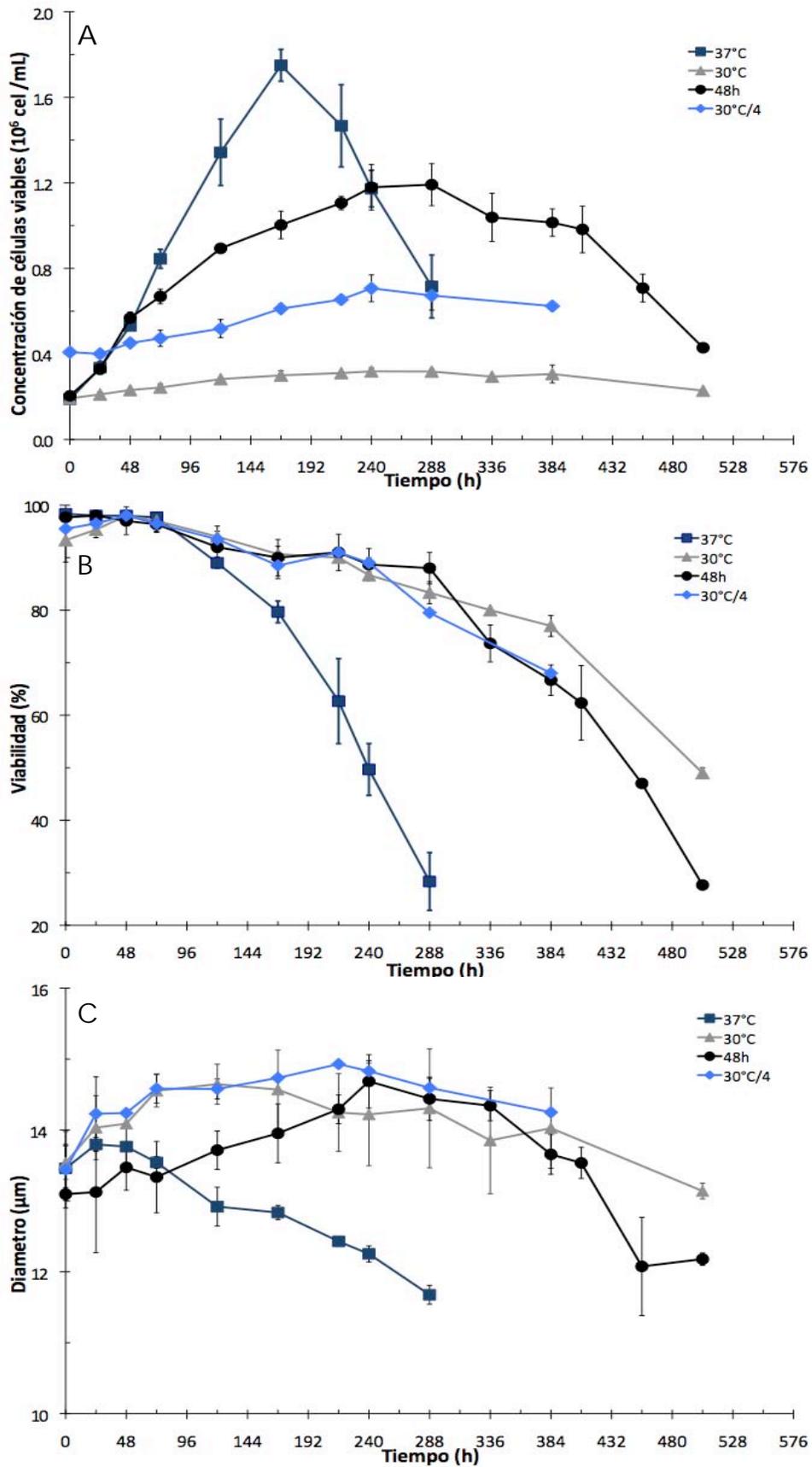


FIGURA 14- Efecto de la temperatura subfisiológica en diferentes esquemas de cultivo; A) cinética de crecimiento celular. B) evolución de viabilidad. C) Diámetro promedio. Las barras de error representan la desviación estándar (n=3).

Por otro lado, el diámetro promedio de los cultivos a 30°C y 30°C/4 mostró una tendencia ascendente desde las 0 h, hasta llegar aproximadamente a 15  $\mu\text{m}$ , pero después disminuyó a partir de 168 y 216 h, respectivamente. El comportamiento del diámetro celular en el cultivo bifásico fue similar al cultivo a 37°C hasta las 72 h. Sin embargo, después de este tiempo se observó un claro aumento del diámetro promedio que llegó a un valor máximo de 14.6  $\mu\text{m}$  a las 240 h, para finalmente disminuir alrededor de 12  $\mu\text{m}$  al término del cultivo.

Otra peculiaridad del cultivo a 30°C fue que a partir del quinto día se presentó un aumento de la degradación celular. Este parámetro se identificó únicamente de forma cualitativa, y se realizó con base en el aumento de la población menor a 6 $\mu\text{m}$  (Fig. 15), medidos por el contador de partículas. De acuerdo con las observaciones en la cámara de Neubauer, en este tiempo la viabilidad de este cultivo aún permanecía por encima del 90%, pero existía un gran número de detritos celulares. Por otro lado, en el cultivo control así como en el cultivo bifásico, se pudo observar que la degradación celular (detritos celulares), producto de la muerte celular, se presentó sólo en etapas tardías del cultivo cuando inició la muerte celular masiva.

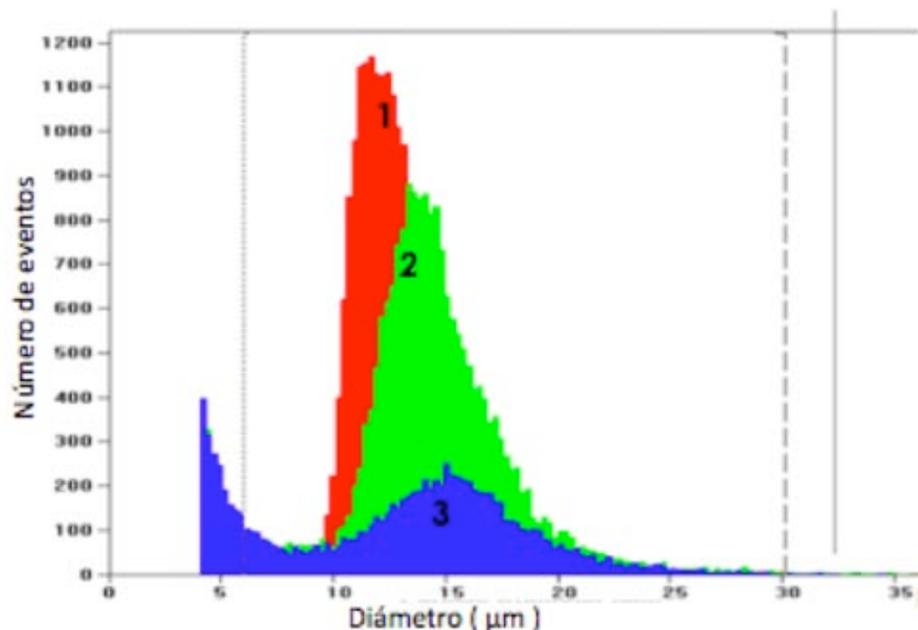


FIGURA 15.-Histogramas de diámetros promedio medidos en contador de partículas tomados a las 120 h de cultivo; 1)37°C, 2)bifásico y 3)30°C,

### 8.2.3 METABOLISMO DE GLUCOSA, LACTATO, GLUTAMINA Y GLUTAMATO.

La muerte celular y el comportamiento metabólico son dos características importantes que están estrechamente relacionadas. Se ha reportado ampliamente el desencadenamiento de la muerte celular debido a la falta de nutrientes (principalmente glucosa y glutamina)([Mercille y Massie 1994a, b](#)). Por otro lado, en estudios de hipotermia moderada se ha observado que las velocidades de consumo de sustratos y de producción de desechos disminuyen comparadas con las mismas velocidades de cultivos a temperatura fisiológica ([Yoon et al, 2003a](#), [Yoon et al, 2006b](#)). Con base en lo anterior, se decidió medir las dos fuentes principales de energía en estas células (glucosa y glutamina), así como dos compuestos importantes del metabolismo (lactato y glutamato).

#### 8.2.3.1 GLUCOSA Y LACTATO.

Todos los cultivos comparados en esta parte del proyecto comenzaron con una concentración inicial de glucosa de  $38 \pm 0.93$  mM. Los perfiles de concentración de glucosa mostraron que el cultivo a 37°C tuvo la disminución de concentración más pronunciada, quedando una concentración residual de 18m M a las 288 h (Fig. 16). El cultivo bifásico y el cultivo 30°C/4 mostraron patrones de concentración de glucosa similares entre ellos, pero la disminución de la concentración de glucosa fue más lenta en estos cultivos que a 37°C. Las concentraciones residuales de los cultivos bifásico y 30°C/4 fueron de 19 y 22 mM a las 576 y 384 h, respectivamente. El perfil de concentración de glucosa del cultivo a 30°C presentó la caída de concentración menos pronunciada y la concentración residual más alta (25mM a las 504 h de cultivo). De esta manera, se puede resumir que la caída de la concentración de glucosa se da en el siguiente orden descendente: 37°C, bifásico, 30°C/4 y 30°C.

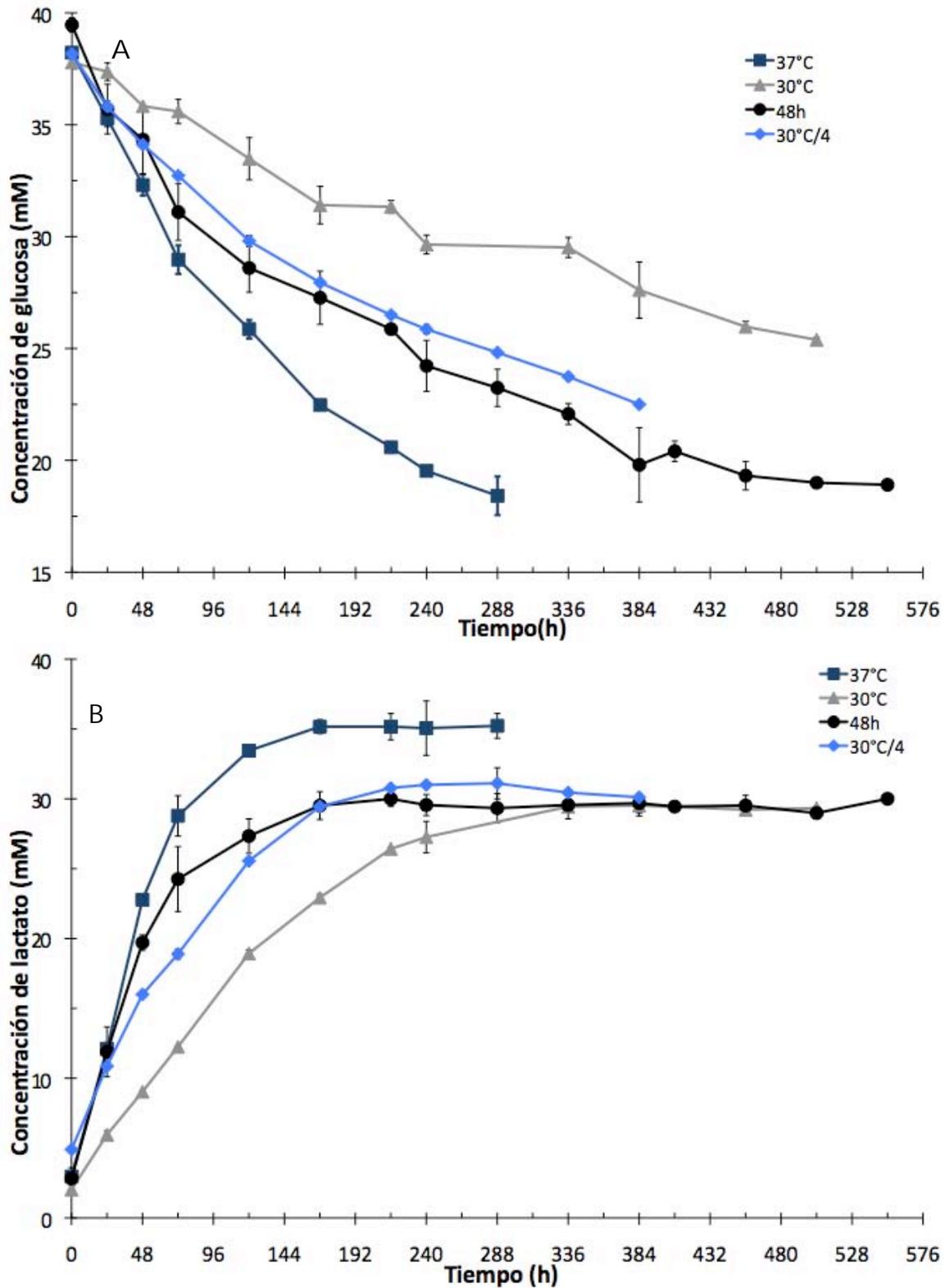


FIGURA 16.-Evolución de la concentración de glucosa y lactato en cultivos a 37°C, 30°C, 30°C/4(cultivo a 30°C con  $4 \times 10^5$  cel/mL de inóculo) y bifásico; A)Concentración de glucosa. B)Concentración de lactato. Las barras de error representan la desviación estándar (n=3).

El consumo específico de este sustrato ( $q_{Glc}$ ) reveló datos directos del metabolismo celular. Las  $q_{Glc}$  de este trabajo concuerdan con lo ya publicado, es decir, todos los cultivos que se expusieron a 30°C exhibieron una  $q_{Glc}$  menor que a 37°C (Tabla 4). Tomando como el 100% a la  $q_{Glc}$  del cultivo a 37°C, los porcentajes correspondientes a los cultivos a 30°C, 30°C/4 y bifásico fueron de 71, 55 y 34%, respectivamente.

Existe una muy cercana dependencia entre el metabolismo de glucosa y lactato. En condiciones estándar (37°C), la disminución de  $q_{Glc}$  ocasiona una disminución en la  $q_{Lac}$  debido a la reducción del sobre flujo metabólico. Como se puede ver en la Tabla 4, la velocidad de producción de lactato en los cultivos a 37°C es de 430 nMol/10<sup>6</sup>cel-h, mientras que los cultivos bifásico y 30°C/4 mostraron una  $q_{Lac}$  menor; 73.3 y 205 nMol/10<sup>6</sup>cel-h, respectivamente. Llama la atención que la  $q_{Lac}$  del cultivo a 30°C fue la mayor (472 nMol/10<sup>6</sup>cel-h). Un efecto importante que tiene el lactato sobre los cultivos celulares es la inhibición del crecimiento. Sin embargo, ninguna de las concentraciones de lactato alcanzadas en este ensayo sobrepasaron los 40mM (Fig. 16); concentración que puede llegar a ser inhibitoria para el crecimiento celular (Gódia y Cairó, 2006).

Tabla 4.- Parámetros metabólicos de los diferentes esquemas de cultivo a hipotermia moderada

Parámetro	37°C	30°C	Bifásico*	30°C/4
$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	0.391	0.053	0.086	0.055
$q_{Glc}$ (nMol/10 <sup>6</sup> cel-h)	174	125	60.3	97
$q_{Lac}$ (nMol/10 <sup>6</sup> cel-h)	430	472.5	73.36	205
$Y_{Lac/Glc}$ (mol/mol)	2.4	3.7	1.21	2.12
$Y_{Glu/Gln}$ (mol/mol)	0.16	0.38	0.17	0.17
$q_{Gln}$ (nMol/10 <sup>6</sup> cel-h)	36.7	28.6	9.68	20.5
$q_{Glu}$ (nMol/10 <sup>6</sup> cel-h)	6.96	11	1.67	3.57

\*Cálculos realizados después del cambio de temperatura a 30°C ; 30°C/4 (cultivo a 30°C con inóculo de 0.4x10<sup>6</sup> cel/mL)

El rendimiento de lactato producido por glucosa consumida ( $Y_{Lac/Glc}$ ) es un parámetro que representa la eficiencia de aprovechamiento de glucosa; mientras menor sea el  $Y_{Lac/Glc}$ , menor será el derroche aparente de glucosa hacia lactato. De los resultados obtenidos, se puede observar que el cultivo bifásico tiene el metabolismo más eficiente en lo que a glucosa se refiere (con un  $Y_{Lac/Glc}$  de

1.21mol/mol). Por otro lado, el cultivo a 30°C mostró ser el menos eficiente con un  $Y_{\text{Lac/Glc}}$  de 3.7 mol/mol (Tabla 4).

Los valores de  $Y_{\text{Lac/Glc}}$  comunes para células CHO pueden llegar a ser de más de 2 mol/mol (Gódia y Cairó, 2006), y esto se debe a la aportación de la glutamina para la formación de lactato. No obstante, el valor encontrado para el cultivo a 30°C es muy alto, lo que podría significar que toda la glucosa y glutamina consumida se convirtieron en lactato.

### 8.2.3.2 GLUTAMINA Y GLUTAMATO.

La glutamina y el glutamato juegan un papel importante en el metabolismo de células de mamífero. La glutamina actúa como fuente de energía (glutaminólisis) y es precursora de pirimidinas, purinas y NAD. Además, el metabolismo de nitrógeno está estrechamente relacionado a la glutamina. Nótese que la glutamina es un aminoácido muy lábil, por lo que en cultivo su descenso se debe tanto al consumo por las células como por su descomposición. A su vez, el glutamato es utilizado en la síntesis de prolina y ornitina (Gódia y Cairó, 2006).

En la Figura 17 se muestran los patrones característicos de concentración de glutamina y glutamato de los esquemas de cultivo estudiados. Se puede apreciar que el descenso de la concentración de glutamina fue más pronunciado en el cultivo a 37°C que en las otras condiciones, llegándose a la concentración más baja obtenida y limitante para esta línea celular (0.2mM) a las 168 h. La velocidad específica de consumo aparente de glutamina ( $q_{\text{Gln}}$ ) para el cultivo a 37°C fue de 36.7 nMol/10<sup>6</sup>cel-h (Tabla 4). Tal valor se encuentra dentro de los valores característicos de consumo de glutamina para células de mamífero (alrededor de 30 nMol/10<sup>6</sup>cel-h). En las primeras 48 h, el cultivo bifásico mostró el mismo perfil de concentraciones de glutamina que el cultivo a 37°C, posteriormente, la disminución en la concentración es claramente menor (Figura 17A). Asimismo, la  $q_{\text{Gln}}$  para el cultivo bifásico fue un 74% menor que la del cultivo a 37°C (Tabla 4) y la concentración limitante no se alcanzó sino hasta las 288 h.

El comportamiento del cultivo 30°C/4, indicó que la velocidad de desaparición de glutamina fue menor comparada con la de los dos cultivos antes

mencionados. A pesar de ello, alrededor de las 288 h se llegó a la concentración mínima de glutamina de 0.2 mM. La velocidad específica de consumo aparente para el cultivo 30°C/4 fue sólo 55% de la  $q_{Gln}$  del cultivo control a . Por último, el cultivo a 30°C, no llegó a condiciones limitantes de glutamina, ya que la mínima concentración lograda fue de 0.5 mM a las 504 h. La velocidad de desaparición de glutamina en 30°C fue la menor de todas, y la  $q_{Gln}$  sólo se redujo un 22% con respecto al control.

Está reportado que la línea celular TF70R cuenta con actividad de glutamino sintetasa (Altamirano et al, 2000), por consiguiente, tiene la capacidad de consumir glutamato para generar glutamina. En la figura 17B se muestran los perfiles de concentración de glutamato. Allí se puede observar que en las primeras 120 h la mayoría de los cultivos tienen el mismo patrón de concentración y llegan alrededor de 1.1mM. La excepción fue el cultivo 30°C ya que la acumulación de glutamato en este cultivo fue ligeramente menor. Después de las 120 h el cultivo control (37°C) empezó a consumir el glutamato presente en el medio de cultivo, llegando a una concentración final de 0.8mM (Figura 17B). Entre las 168 y 336 h la concentración de glutamato en el cultivo bifásico permaneció relativamente constante, posteriormente el glutamato siguió acumulándose. Por otra parte, la concentración de glutamato en los dos cultivos restantes se acumuló durante todo el periodo de cultivo. La  $q_{Glu}$  en el cultivo a 30°C fue 1.6 veces mayor que en el cultivo a 37°C, mientras que para los cultivos bifásico y 30°C/4 mostraron una  $q_{Glu}$  de solamente 0.2 y 0.5 veces, respectivamente, del valor obtenido a 37°C (Tabla 4).

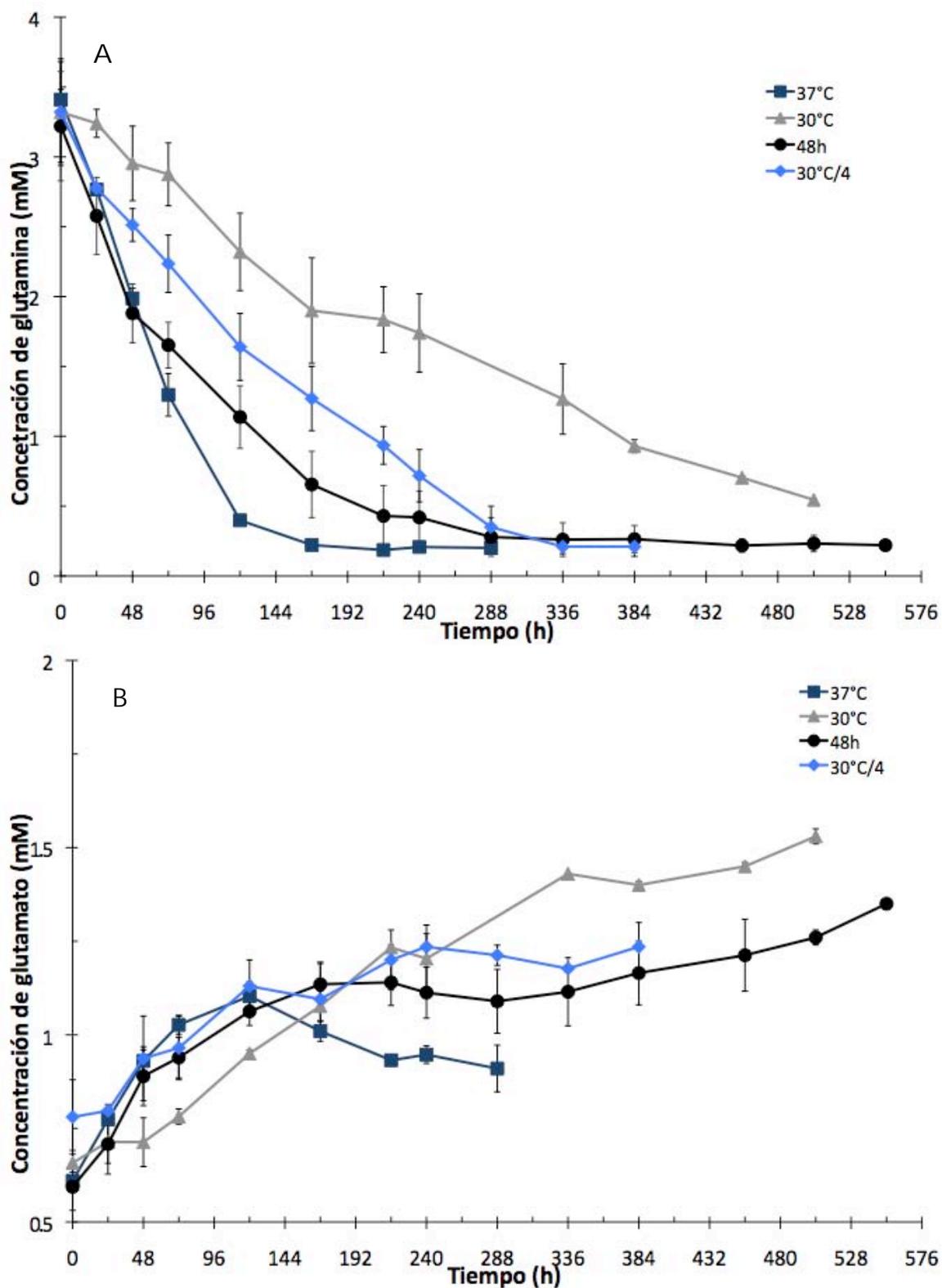


FIGURA 17- Evolución de la concentración de glutamina y glutamato en cultivos a 37°C, 30°C, 30°C/4 (cultivo a 30°C con inóculo de  $4 \times 10^5$  cel/mL) y bifásico ; A) Concentraciones de glutamina. B) Concentraciones de glutamato. Las barras de error representan la desviación estándar (n=3).

## 8.2.4 CICLO CELULAR.

Se ha reportado que la hipotermia moderada provoca un aumento en la proporción de células en la fase G1/G0 del ciclo celular (Moore et al., 1997; Fox et al., 2005a; Kaufmann et al., 1999). En esta tesis, las proporciones del ciclo celular se determinaron por medio de citometría de flujo, midiendo la incorporación de yoduro de propidio al material genético. La cantidad de yoduro de propidio detectado por el citómetro de flujo, es proporcional a la cantidad de DNA que tiene cada célula y a su vez depende de la fase del ciclo celular en la que se encuentra. En la figura 18 se muestra un histograma característico de las diferentes fases del ciclo celular para la línea TF70R.

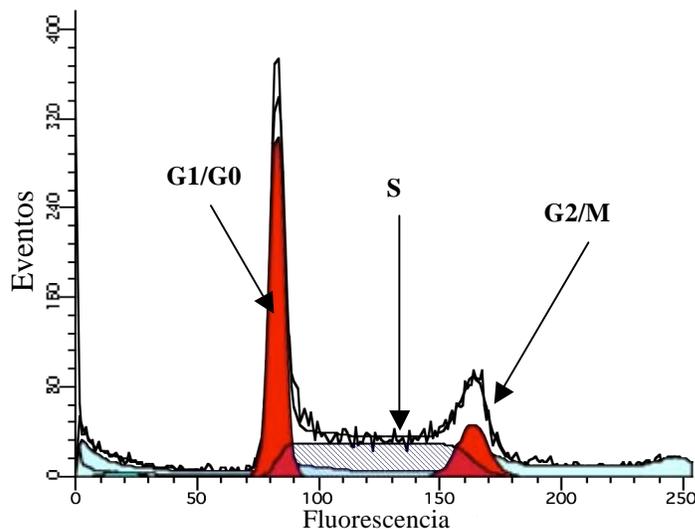


FIGURA 18.-Histograma característico de ciclo celular con tinción de yoduro de propidio (células en crecimiento exponencial).

En la Figura 19A, se puede observar que el comportamiento de la población G1/G0 con respecto al tiempo de cultivo fue distinto para los cuatro cultivos estudiados. En las primeras 48 h de los cultivos bifásico y control (37°C), el porcentaje de la población G1/G0 disminuyó alrededor de un 30%. Posteriormente, el porcentaje de esta población aumentó hasta llegar a un 58 y 74%, respectivamente. Una vez alcanzados estos porcentajes, esta población se mantuvo relativamente constante para ambos cultivos. Cabe aclarar que el porcentaje alcanzado por el cultivo a 37°C fue el más alto de entre todos los porcentajes de G1/G0.

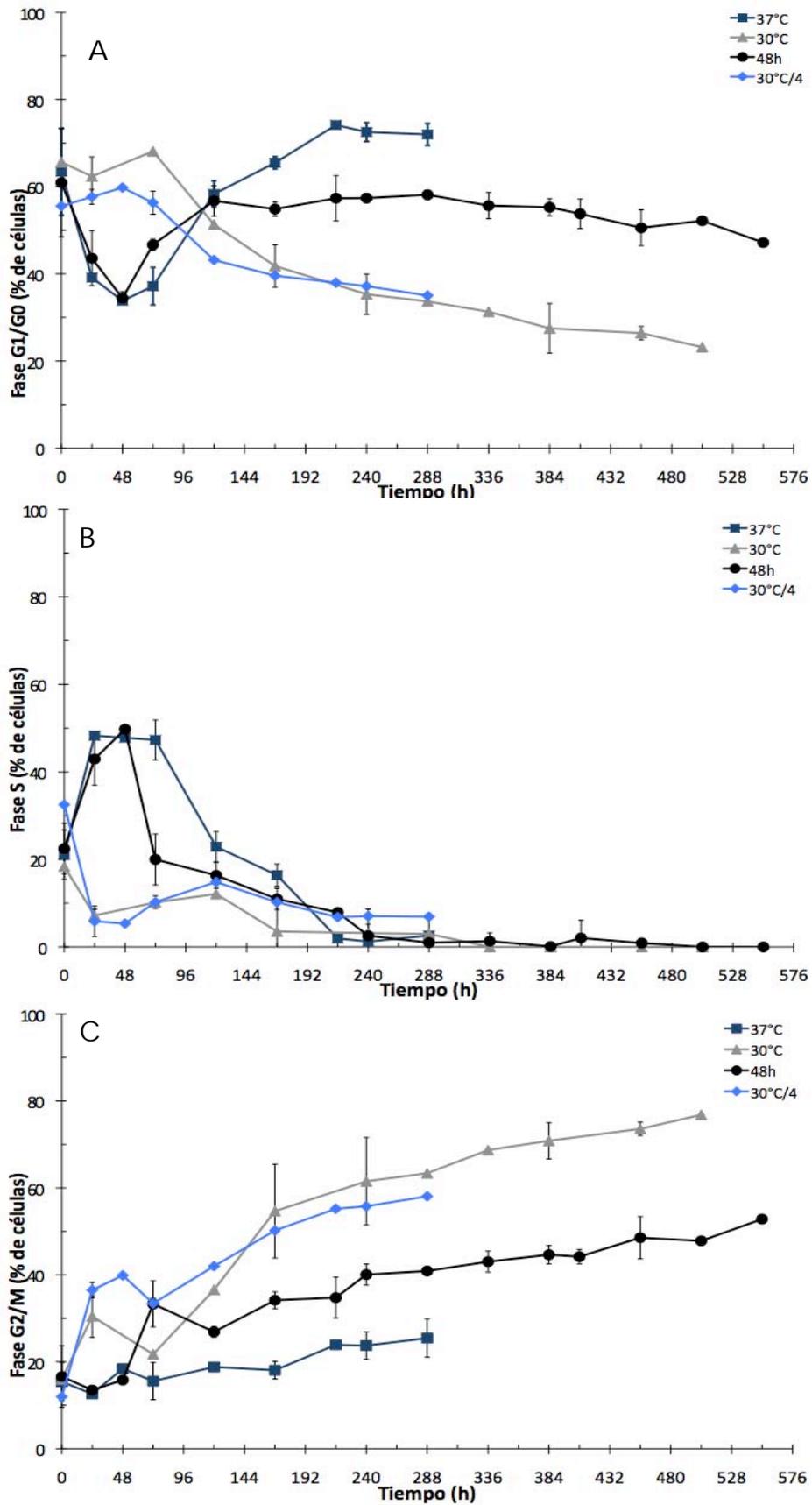


Figura 19.- Cinéticas de distribución de ciclo celular en cultivos a 37°C, 30°C, 30°C/4 y bifásico; A) Fase s, B) fase G2/M, C) Fase G1/G0. Las barras de error representan la desviación estándar (n=3).

Los cultivos a 30°C y 30°C/4 mantuvieron su porcentaje inicial de G1/G0 (60%) aproximadamente por 72 h, después este porcentaje cayó hasta llegar a menos de 30% en etapas tardías del cultivo. Los porcentajes de la población G1/G0 de los cultivos a baja temperatura no sobrepasaron al porcentaje del cultivo control, lo que indica que no existe un arresto en esta fase debido a la baja temperatura.

Una alta proporción de células en fase S indica un crecimiento celular activo. Éste fue el caso del cultivo control, el cual mostró un aumento de 25% durante las primeras 72 h (Fig. 19B). Después de este tiempo, la población S en el cultivo a 37°C cayó constantemente, finalizando en un porcentaje cercano a cero a las 240 h. En el cultivo bifásico, la fase S se comportó igual al cultivo a 37°C durante las primeras 48 h, sin embargo, después del cambio de temperatura hubo una caída súbita del 20%, lo cual reveló un claro efecto de la temperatura sobre la fase S del ciclo celular. Una vez que se dio esta caída, continuó disminuyendo hasta llegar a 0% a las 240 h. Los cultivos a 30°C y 30°C/4 difirieron significativamente de los cultivos bifásico y control. El porcentaje de células en fase S de los cultivos a 30°C y 30°C/4, cayó de 25 a 5% tan sólo en las primeras 24 h. Posteriormente, el porcentaje se mantuvo en ese intervalo por el resto del cultivo, ratificando que la temperatura disminuye considerablemente la proporción de la fase S.

La fase G2/M fue la que presentó mayor diferencia con lo ya reportado hasta el momento. En la figura 19C se muestra que los cultivos que iniciaron a 30°C de temperatura acumularon la población G2/M desde el inicio y hasta el final del cultivo. Los porcentajes máximos de G2/M alcanzados por estos dos cultivos fueron de 76%. Cabe señalar que en el cultivo bifásico, la población G2/M aumentó un 18% inmediatamente después del cambio de temperatura, mostrando una vez más el efecto que tiene la temperatura sobre el ciclo celular. Para el cultivo bifásico, los porcentajes de la fase G2/M después del cambio de temperatura aumentaron ligeramente hasta el final del cultivo. La fase G2/M del cultivo a 37°C, mostró una muy ligera tendencia hacia el aumento, en un intervalo entre 12 y 25%. Estos resultados parecen indicar que el arresto provocado por la hipotermia moderada se da en la fase G2/M.

De acuerdo con los histogramas de citometrias de flujo, existen tres regiones que caracterizan al ciclo celular: 2n, Sd y 4n, que representan a las fases G1/G0, S y

G2/M, respectivamente. Estas regiones tienen una relación lineal de acuerdo al contenido de DNA. Por ejemplo, el contenido de DNA de  $4n$  es el doble de  $2n$  y  $8n$  se encuentra en una zona intermedia. En los cultivos a  $30^{\circ}\text{C}$  y  $30^{\circ}\text{C}/4$  se identificó una población  $8n$  que aumentaba con el tiempo, lo cual no sucedió a  $37^{\circ}\text{C}$  (Fig. 20).

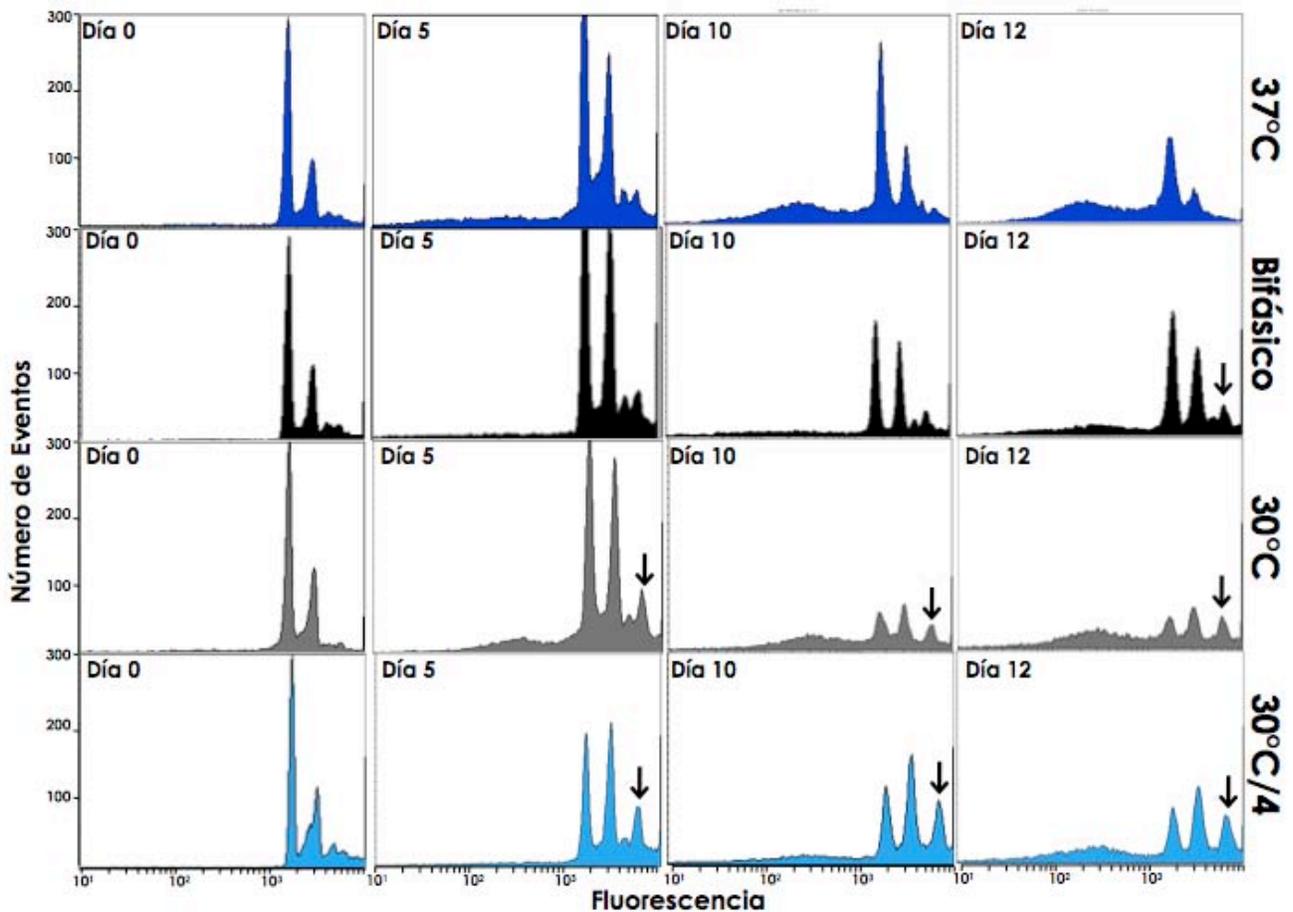


FIGURA 20.- Histogramas de contenido de DNA de células CHO cultivadas a  $37$  y  $30^{\circ}\text{C}$ . Se observa la aparición de una población octoploide de células CHO (Flecha) en los cultivos a  $30^{\circ}\text{C}$ , sin embargo en los cultivos a  $37^{\circ}\text{C}$  no aparece.

## 8.2.5 FRAGMENTACIÓN DE DNA

### 8.2.5.1. POBLACION SUB-G1.

La fragmentación de DNA es una característica identificada en diversos tipos de muerte celular. La fragmentación específica (múltiplos de 180 pb) se atribuye a la muerte celular apoptótica, y la fragmentación no específica puede presentarse en eventos como muerte celular autofágica (Bursch et al., 1996). Para estudiar el efecto de la temperatura subfisiológica sobre la muerte celular, se midió la fragmentación de DNA por medio de citometría de flujo, identificando la población sub-G1 (población con un contenido de DNA menor a  $2n$ ).

En la Figura 21 se pueden observar las diferentes cinéticas de aparición de población Sub-G1. Todos los cultivos tuvieron un porcentaje inicial de población sub-G1 muy bajo (entre 1 y 5%), este porcentaje permaneció en todos los cultivos hasta las 72 h. A partir de las 120 h los porcentajes comenzaron a aumentar en diferentes proporciones para cada cultivo. El cultivo control a 30°C fue el que aumentó con mayor rapidez y de manera constante, llegando a un porcentaje del 68% a las 504 h. El cultivo a 37°C tuvo una cinética similar al cultivo a 30°C, sin embargo, la velocidad de fragmentación de DNA fue ligeramente menor y el porcentaje máximo sólo alcanzó un 45% a las 288 h. Los dos cultivos restantes tuvieron un patrón de fragmentación de DNA similar entre ellos. Para el cultivo bifásico la fragmentación de DNA superó el porcentaje inicial a partir de las 120 h, pero a una tasa muy baja. Finalmente, entre las 288 y las 552 h se dió un periodo de fragmentación masiva, el cual alcanzó el porcentaje máximo de población sub-G1 (81%) a las 552 h. Aunque el cultivo 30°C/4 duró menos tiempo que el cultivo bifásico, la cinética de aparición de sub-G1 fue similar en ambos cultivos. El cultivo 30°C/4 superó el porcentaje inicial después de las 120 h, pero a una velocidad muy baja; a las 240 h sólo llegó alrededor del 10%. Por último, en las siguientes 48 h, la degradación aumentó hasta alcanzar un 26% (288 h).

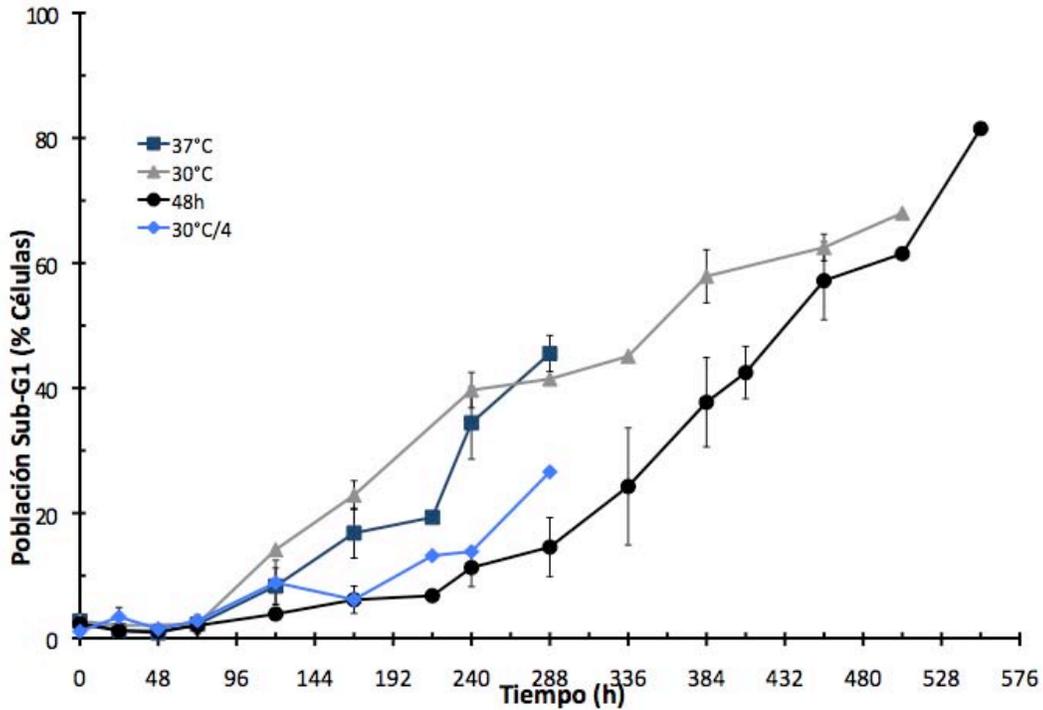


FIGURA 21.- Cinéticas de aparición de población sub-G1 en cultivos a 37°C, 30°C, 30°C/4 y bifásico; porcentajes obtenidos mediante citometría de flujo con el método de Mercille y Massie (1999). Las barras de error representan la desviación estándar (n=3).

#### 8.2.5.2. FRAGMENTACIÓN ESPECÍFICA DE DNA.

Con la finalidad de determinar de forma más precisa el mecanismo de muerte celular, también se determinaron los perfiles de fragmentación específica de DNA cromosomal originada por la muerte celular. Como se puede observar en la figura 22-A, la degradación del material genético en el cultivo a 37°C comenzó aproximadamente a las 120 h, en este tiempo la degradación fue sutil y se presentó un patrón de fragmentación mixto, se pudieron observar fragmentos con de tamaño de múltiplos de 180 pb (tamaño intranucleosomal) y un barrido de degradación inespecífica. A las 240 y 288 h del mismo cultivo cultivo, la fragmentación aumentó, y el perfil de fragmentación también fue mixto, sin embargo, la fragmentación específica fue más evidente que la inespecífica.

Entre las 0 y 216 h del cultivo bifásico no se observó fragmentación de DNA, esta última comenzó aproximadamente a las 288 h (Fig. 22-B), presentando fragmentación tenue y con patrón mixto. Ya para las 384 h la degradación aumentó y la mayor parte de la fragmentación tuvo el patrón específico de escalera.

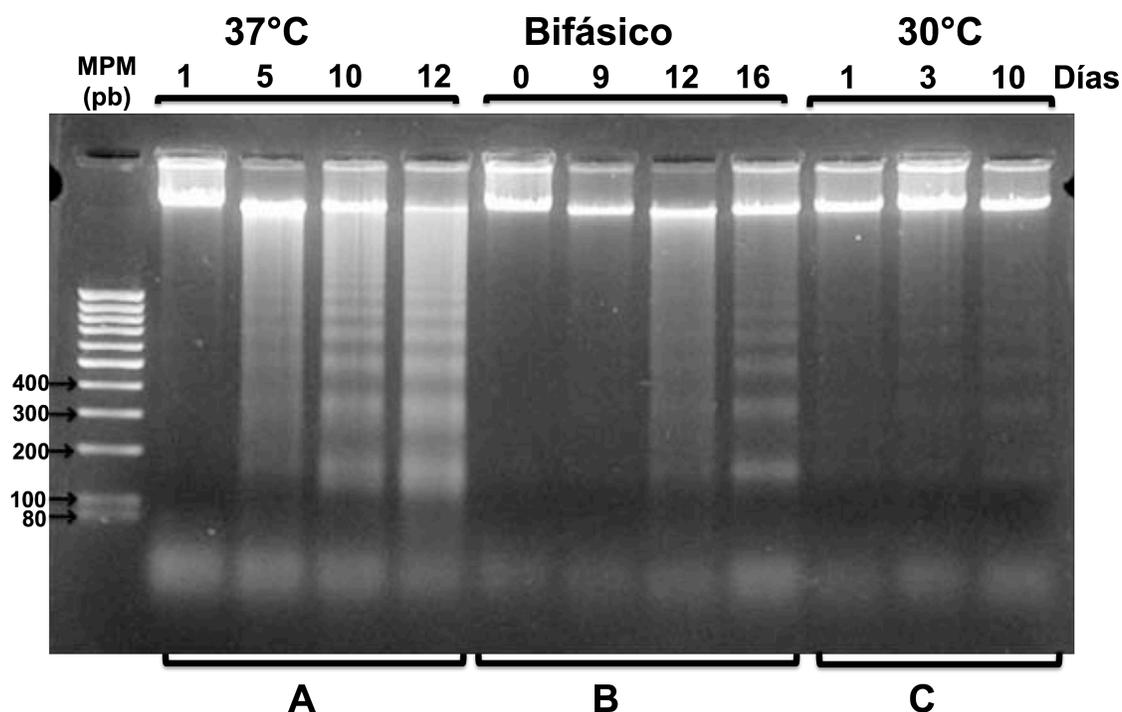


FIGURA 22.- Perfil de degradación específica de DNA cromosomal en cultivos a A) 37°C, B) bifásico y C) 30°C. MPM: Marcador de peso molecular 100pb

En el caso del cultivo a 30°C se presentó una cinética de fragmentación diferente a los dos cultivos antes mencionados. Ya que a las 24, 72 y 240 h la fragmentación fue casi imperceptible, sólo se observó un pequeño porcentaje de degradación específica a las 72 y 240 h.

Los resultados del cultivo a 30°C que se observan en la figura 22-C contrastan con los resultados de porcentajes de población sub-G1 para el mismo cultivo. Sin embargo, es necesario aclarar que en el ensayo de electroforesis de agarosa, únicamente se puede observar la fragmentación de bajo peso molecular, y no se puede determinar fragmentos de alto peso molecular (entre 30 y 250 kpb) que puede presentarse en diversos procesos celulares (Cain et al, 1994; Bursch et al, 1996).

## 8.2.6. MORFOLOGÍA ULTRAESTRUCTURAL DE LA MUERTE CELULAR.

La microscopía electrónica de transmisión (MET) es una técnica muy confiable para identificar las diferentes morfologías de muerte celular. Asimismo, se puede caracterizar ultraestructuralmente el estado físico de la célula aunque no esté en proceso de muerte celular.

En las MET se pudieron identificar estructuras mitocondriales, que en su mayoría presentaron forma globular. Otra estructura identificada fue el retículo endoplásmico, que se encontró disperso por todo el citoplasma, con algunas estructuras asociadas a la membrana nuclear. El núcleo identificado en las MET mostró ambas especies de cromatina; heterocromatina (transcripcionalmente inactiva) y eucromatina (transcripcionalmente activa), así como el nucleolo. También se pudieron observar vacuolas (presumiblemente autofagosomas). En la Figura 23 se muestran las estructuras antes mencionadas.

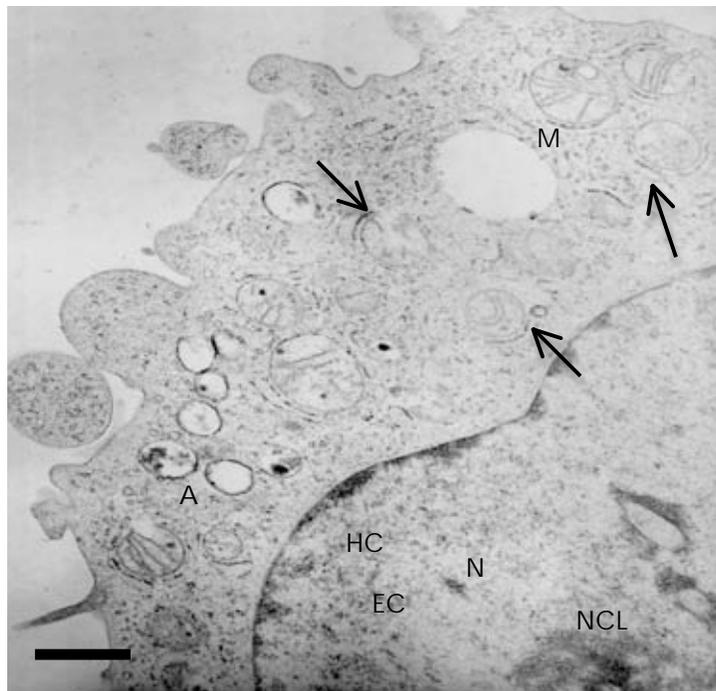


FIGURA 23.-Microscopías electrónica de transmisión (MET) característica de la línea TF70R; cultivo a 37°C en fase de crecimiento exponencial; M) Mitocondria, N)Núcleo, A)autofagosoma, EC)Eucromatina, HC) Heterocromatina, NCL) Núcleo y Flechas) RER (Reticulo Endoplásmico Rugoso). La barra representa 1μm.

En este trabajo, se consideró como morfología estándar aquella que se pudo observar de las MET en las primeras 24 h de cultivo a 37°C, ya que es en este tiempo y condición donde las células están en etapa de crecimiento exponencial. En consecuencia, las MET de los cultivos a 37°C y bifásico en este tiempo comparten ultraestructuras estándar.

En la morfología estándar de la Figura 24 se pueden observar características que revelan una buena integridad celular. En las estructuras mitocondriales (M) se pudo observar claramente las crestas que reflejan el buen estado fisiológico. El retículo endoplásmico rugoso (RER), fácil de identificar por la presencia de ribosomas, presentó estructuras sin hinchamiento, lo que indica que la célula no está sometida a algún tipo de estrés. La presencia de vacuolas (Au; presumiblemente autofagosomales) en las primeras 24 h de cultivo, está asociada a la actividad autofágica basal y a la maquinaria de recambio de proteínas y organelos.

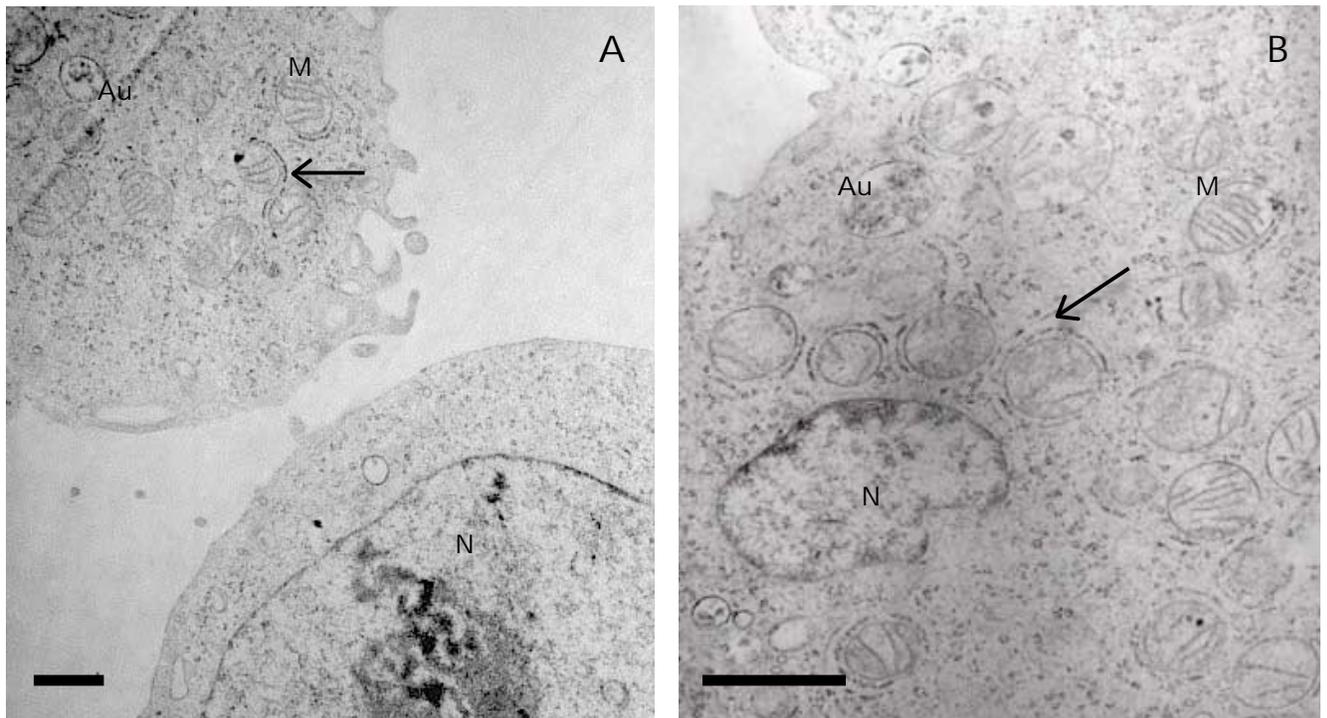


FIGURA 24.-MET de cultivos a A) 37°C y B) Bifásico en las primeras 24 h (morfología estándar) ; M) Mitocondria, N)Núcleo, Au)Autofagosoma, y Flechas) RER. La barra representa 1μm.

### 8.2.6.1 MORFOLOGÍA ULTRAESTRUCTURAL DEL CULTIVO A 37°C.

En el cultivo control a las 168 h se pudo apreciar la presencia de algunas vacuolas, así como algunas mitocondrias que carecieron de cisternas o que se encontraban en muy mal estado (Figura 25A). Otra característica de este tiempo es el hinchamiento del RER. Para las 288 h se notó una baja cantidad de mitocondrias y el RER se encontraba completamente hinchado (Fig. 25-B). En este mismo tiempo el núcleo presentó cambios morfológicos (una ligera condensación de cromatina), sin embargo, esta morfología no cumple totalmente con las características de muerte celular apoptótica como condensación de cromatina y la desintegración del núcleo. Cabe resaltar que la integridad celular entre las 168 y 288 h del cultivo a 37°C, es muy mala si se compara con la morfología estándar (Fig. 24).

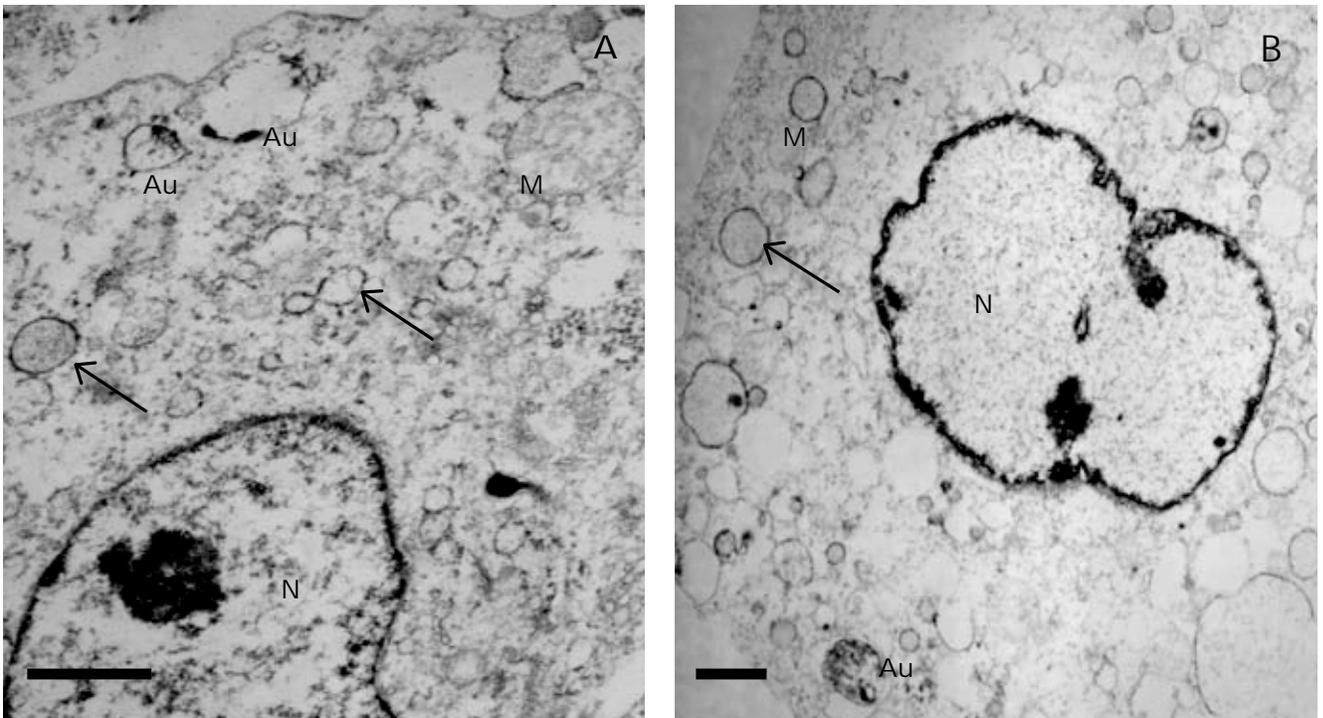


FIGURA 25. -MET de cultivos a 37°C A) 168 h y B) 288 h; M) Mitocondria, N) Núcleo, Au) Autofagosoma, y Flechas) RER. La barra representa 1µm.

### 8.2.6.2 MORFOLOGÍA ULTRAESTRUCTURAL DEL CULTIVO BIFÁSICO.

Una característica que se notó a las 216 h del cultivo bifásico fue la presencia de autofagosomas pero en un bajo número (Figura 26-A). También se observaron mitocondrias en mal estado, con pocas cisternas y estructuras de RER sin hinchamiento. Posteriormente, a las 384 h de cultivo (Figura 26-B) se observaron morfologías celulares con alto número de autofagosomas, pero, también se identificaron células con bajo o nulo número de autofagosomas y con buena integridad celular. Los núcleos que se lograron identificar a las 384 h de este cultivo, presentaron condensación de cromatina aunque nuevamente la morfología no era típica de apoptosis.

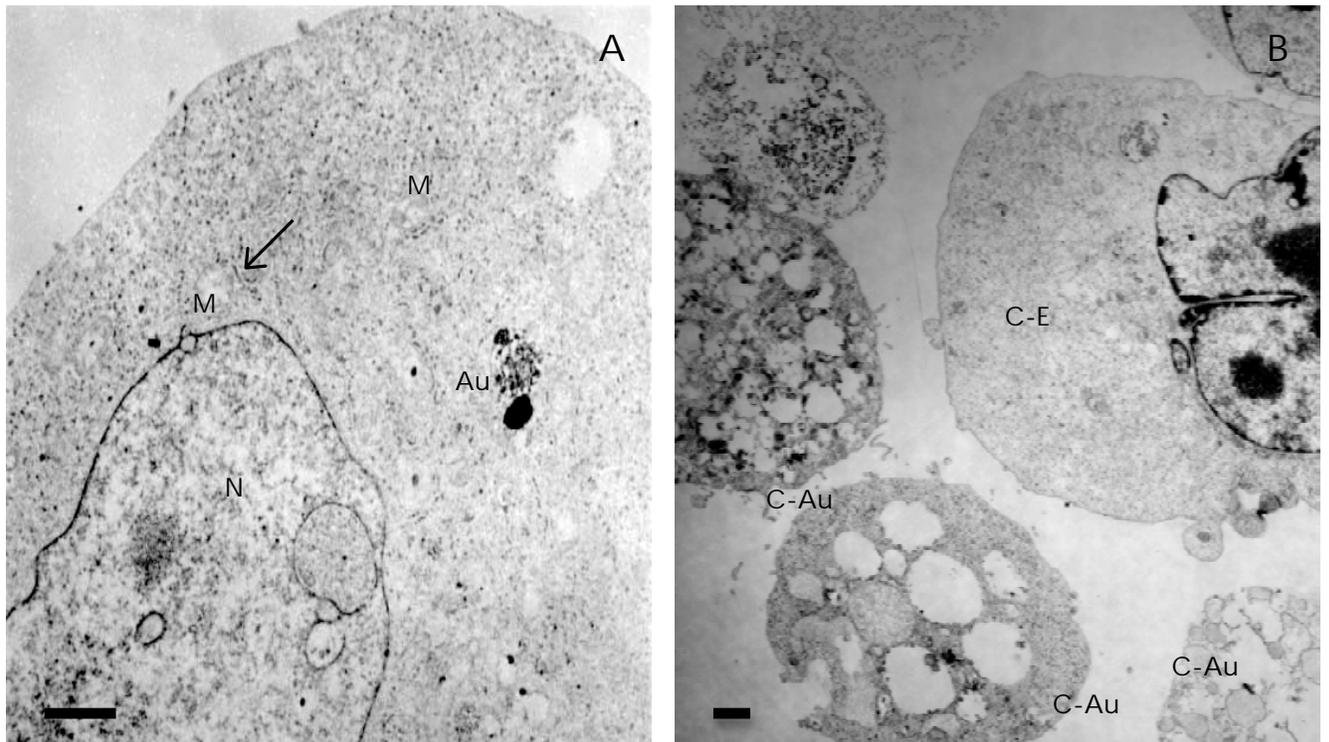


FIGURA 26.-MET del cultivo bifásico a A) 216 h y B) 384 h; M) Mitocondria, N) Núcleo, Au) Autofagosoma, Flechas) RER, C-Au) Célula autofágica y C-E) Célula con morfología estándar. La barra representa 1 $\mu$ m.

### 8.2.6.3 MORFOLOGÍA ULTRAESTRUCTURAL DEL CULTIVO A 30°C.

En la figura 27A se puede observar la morfología de las células presentes en el cultivo a 30°C en las primeras 24 h. La característica más notable fue la presencia de numerosos autofagosomas. En este mismo tiempo de cultivo, se pudo observar que la integridad celular fue parcialmente buena ya que el RER no mostró hinchamiento pero las estructuras mitocondriales estaban ligeramente deterioradas. A las 384 h de cultivo (Figura 27B), el número de autofagosomas siguió alto, el RER no se observó hinchado (a pesar de ser un periodo avanzado del cultivo), y las mitocondrias perdieron la integridad de sus cisternas.

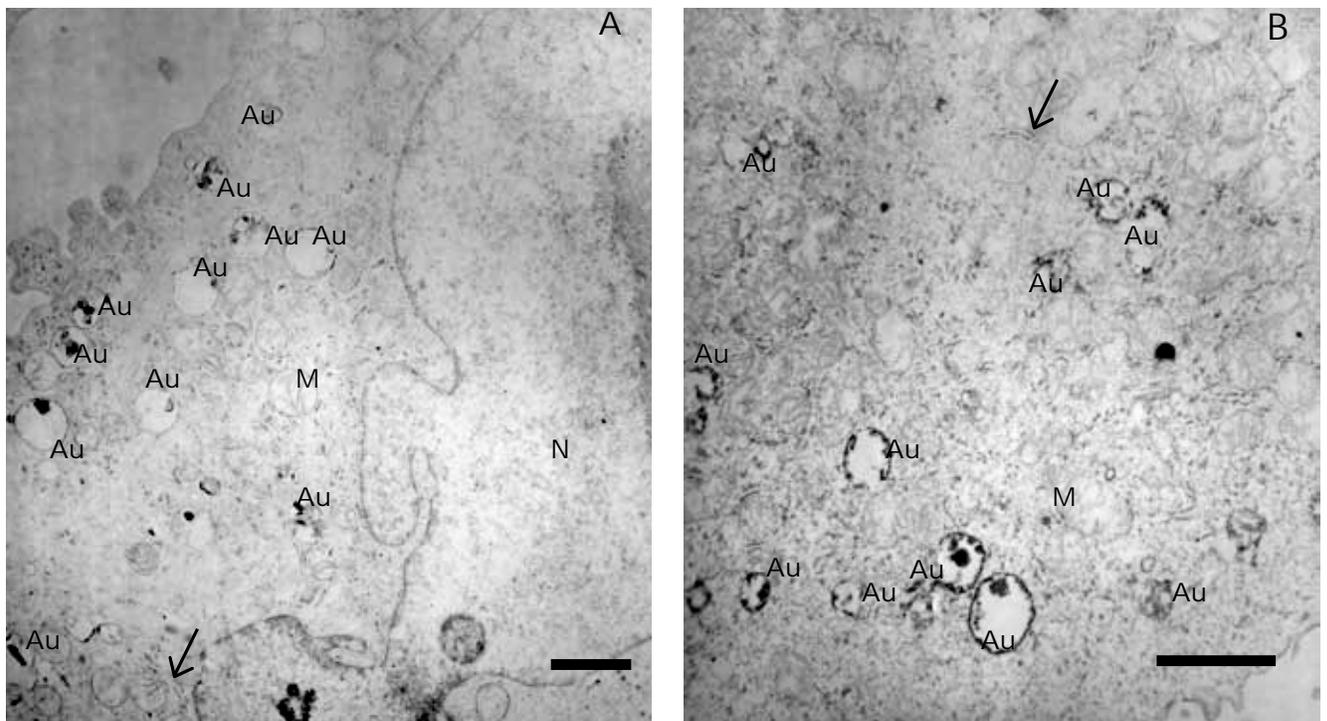


FIGURA 27.-MET de cultivos a 30°C a A) 24 h y B) 384 h; M)Mitocondria, N)Núcleo, Au)autofagosoma, y Flechas) RER. La barra representa 1μm.

#### 8.2.6.4 MORFOLOGÍA ULTRAESTRUCTURAL DEL CULTIVO A 30°C/4.

La integridad celular del cultivo a 30°C/4 en las primeras 24 h fue buena. Las mitocondrias se observaron con cisternas normales, el RER no presentó hinchamiento y la presencia de autofagosomas se dio pero en bajo número (Fig. 28-A). Hacia las 216 h de cultivo, las mitocondrias estaban deterioradas y sin cisternas, no se detectó la presencia de RER, y la cantidad de autofagosomas no aumentó significativamente y la estructura nuclear permaneció intacta.

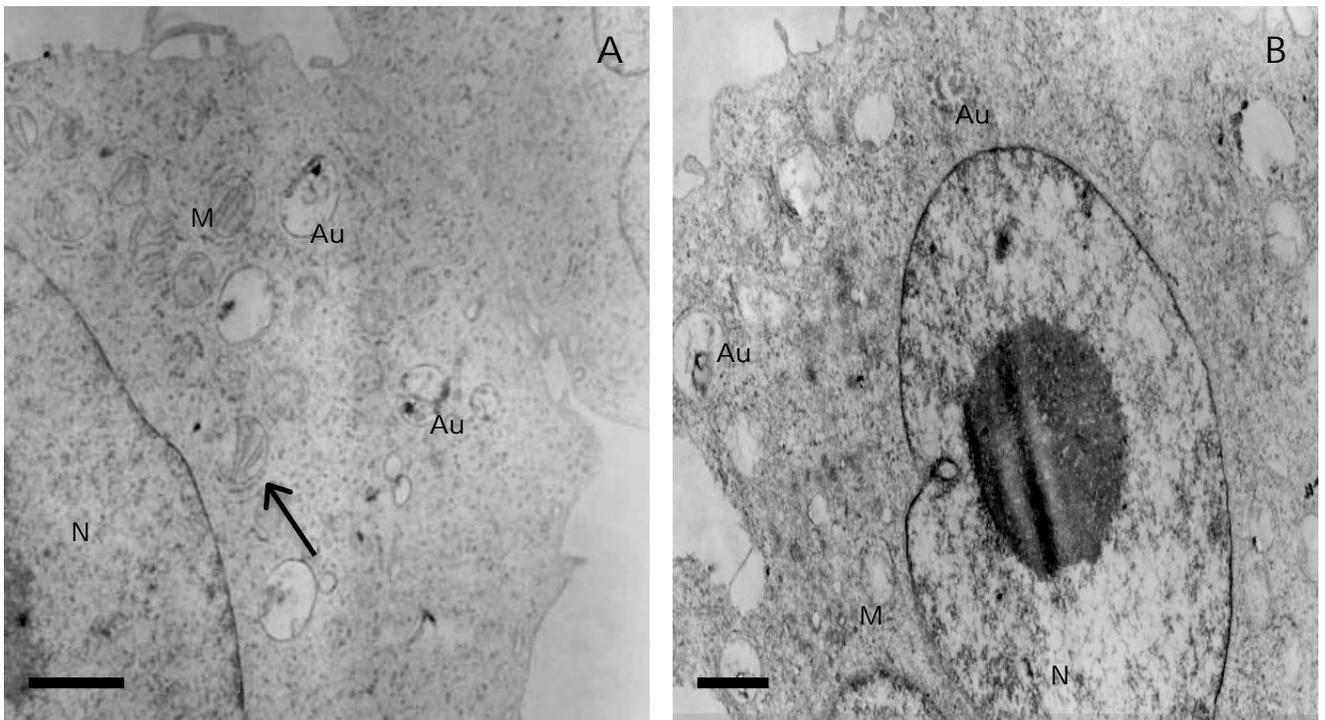


FIGURA 28.-MET de cultivos a 30°C/4 a A) 24 h y B) 216 h; M)Mitocondria, N)Núcleo, A)autofagosoma, y Flechas) RER. La barra representa 1µm.

#### 8.2.7 PROCESAMIENTO DE LC3.

Como ya se mencionó, la fragmentación de DNA no es un evento exclusivo de muerte celular apoptótica. Por tal motivo, las mediciones del contenido de DNA por citometría de flujo y el perfil de degradación no son suficientes, para determinar qué tipo de muerte celular se presentó. Con la finalidad de caracterizar mejor la muerte celular bajo hipotermia moderada y con base en la presencia de vacuolas

ácidas o autofagosomas (MET) y en el reporte de Hwang y Lee (2008) donde identificaron la presencia de apoptosis y autofagia en cultivos de células CHO recombinantes, se optó por buscar la presencia de muerte celular autofágica. El marcador de autofagia seleccionado fue la identificación del procesamiento de LC3I a LC3II por medio de inmunodetección. Para asegurar que se cargó la misma cantidad de proteína en cada pozo, se introdujo un testigo de carga (actina). Este testigo resultó constante en cada uno de los geles (Fig. 29A,B,C y D), por esta razón, las diferencias que a continuación se mencionan sólo están relacionadas al tratamiento entre las muestras.

En el caso del cultivo a 37°C, LC3II empezó a acumularse entre las 120 y 168 h (Fig. 29A). La proporción de esta isoforma continuó aumentando, y para las 288 h ya representaba la mayor parte de la proteína LC3, lo cual sugiere una alta actividad autofágica. Por otro lado en las primeras 24 h del cultivo control, la isoforma LC3I representaba el mayor porcentaje de LC3, pero conforme aumentó el tiempo de cultivo ésta empezó a desaparecer y a las 288 h la cantidad de LC3I fue menor en relación LC3II (Figura 29A).

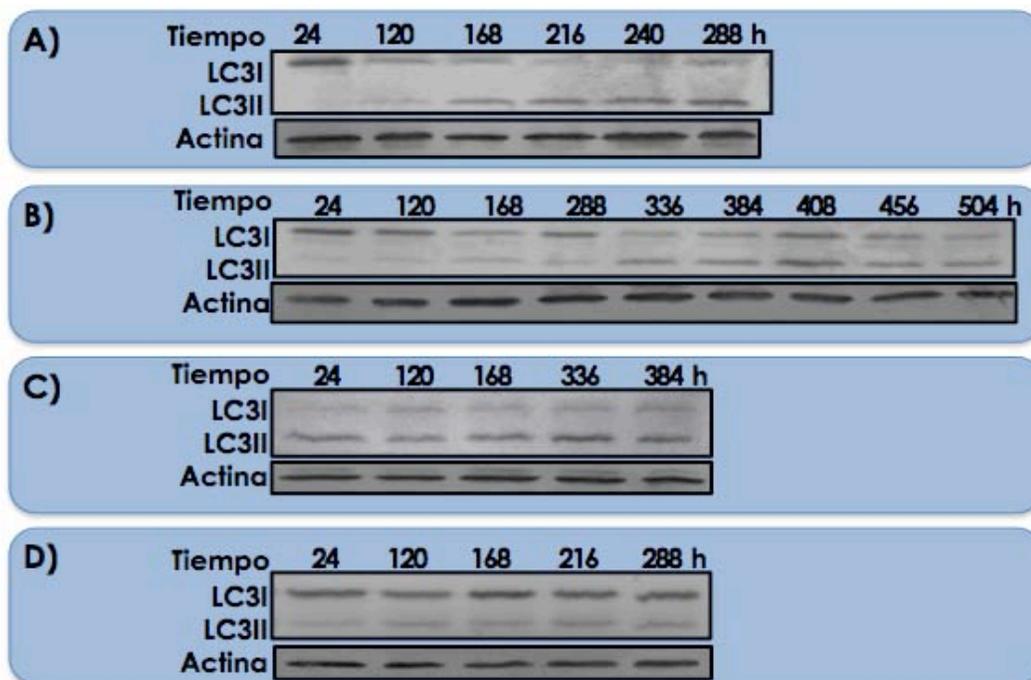


FIGURA 29.- Inmunodetección del procesamiento de LC3 en diferentes esquemas de cultivo; A) 37°C, B) bifásico, C) 30°C y D) 30°C/4,

Entre las primeras 24 y 120 h del cultivo bifásico, la cantidad de LC3I representó la mayor parte de la proteína LC3, en este mismo periodo LC3II fue casi imperceptible. Entre las 168 y 288 h del mismo cultivo, se percibió un pequeño aumento del porcentaje de LC3II, asimismo, LC3I disminuyó ligeramente. A partir de las 336 h, LC3II aumentó considerable y se mantuvo casi constante el resto del cultivo. En la figura 29B se puede apreciar que la proporción de la isoforma LC3I no desapareció y se mantuvo relativamente constante después de las 288 h.

En el cultivo a 30°C se observó una alta proporción de LC3II desde las 24 h, y su proporción no tuvo diferencias significativas por el resto del periodo de cultivo. Asimismo la isoforma LC3I del cultivo a 30°C se mantuvo casi imperceptible durante todo el cultivo (Fig. 29C). En el cultivo 30°C/4 la isoforma LC3II se apreció desde las 24 h y se acumuló de forma ligera durante todo el cultivo. Por el contrario, la proporción de LC3I fue alta y constante durante todo el tiempo.

### 8.3. INHIBICIÓN DE AUTOFAGIA.

Una vez que se identificó la presencia de autofagia y dada la posible relación que puede tener con los cultivos en hipotermia moderada, se decidió realizar una serie de cultivos inhibiendo autofagia a temperatura control (37°C) y a temperatura subfisiológica (30°C).

#### 8.3.1 CRECIMIENTO CELULAR, VIABILIDAD Y DIAMETROS CELULARES.

En la Figura 30 se muestra las cinéticas de crecimiento, viabilidad y diámetro celular de los cultivos con y sin inhibidor de autofagia (LY294002). El crecimiento celular a 37°C no se vió considerablemente afectado con la adición del inhibidor, ya que las velocidades de crecimiento para el cultivo control a 37°C (C37) y el cultivo inhibido a 37°C (LY37) fueron de 0.384 y 0.369 d<sup>-1</sup>, respectivamente. Las concentraciones celulares máximas para este par de condiciones fueron de 1.4 y 1.33 x 10<sup>6</sup> cel/mL y ambas llegaron a este punto a las 168 h. Después de este tiempo la concentración celular viable del cultivo C37 cayó significativamente, pero en el cultivo LY37, la concentración celular se mantuvo aproximadamente constante por cinco días más, hasta que por último cayó después de las 288 h (Fig. 30-A). El comportamiento de la viabilidad para los cultivos C37 y LY37 fue similar en las

primeras 120 h. Posteriormente, la caída de la viabilidad fue más rápida en el cultivo C37 que en el cultivo LY37. La máxima diferencia entre las viabilidades de ambos cultivos fue de 40% (Fig. 30-B).

Las velocidades de crecimiento para el cultivo control a 30°C (C30) y para el cultivo inhibido a 30°C (LY30) fueron de 0.033 y 0.043 d<sup>-1</sup>, respectivamente. Entre estos dos cultivos se observó una pequeña diferencia en la concentración celular máxima; 0.24x10<sup>6</sup> y 0.32x10<sup>6</sup> cel/mL, para el cultivo C30 y LY30, respectivamente. Otra diferencia que se pudo observar entre los cultivos C30 y LY30, fue que a las 168 h la concentración celular viable del cultivo C30 se mantuvo constante, mientras que la del cultivo LY30 siguió creciendo. Finalmente, La caída de la concentración de células viables para el cultivo C30 se dio a partir de las 216 h y para el cultivo LY30 se dio hasta las 336 h. La viabilidad en el cultivo C30 permaneció por arriba del 80% hasta las 216 h, a partir de este momento se dio una caída constante hasta llegar a 38% de viabilidad a las 456 h. Por el contrario, en el cultivo LY30 la viabilidad fue prácticamente mayor al 80% por todo el periodo de cultivo (384 h) (Fig. 30-B).

El comportamiento del diámetro celular promedio en los cultivos C37 y C30 fue similar al reportado en la sección 7.2.2 para los cultivos a 37°C y control a 30°C. El diámetro celular del cultivo LY30 tuvo un perfil idéntico a su control (C30). Por otro lado la diferencia más notable para este parámetro se observó en el cultivo LY37. En este cultivo, el diámetro promedio tuvo el mismo perfil que su control (C37) en las primeras 120 h, después de este periodo, el diámetro aumentó hasta llegar a 14.55 μm al final del cultivo (Figura 30-C).

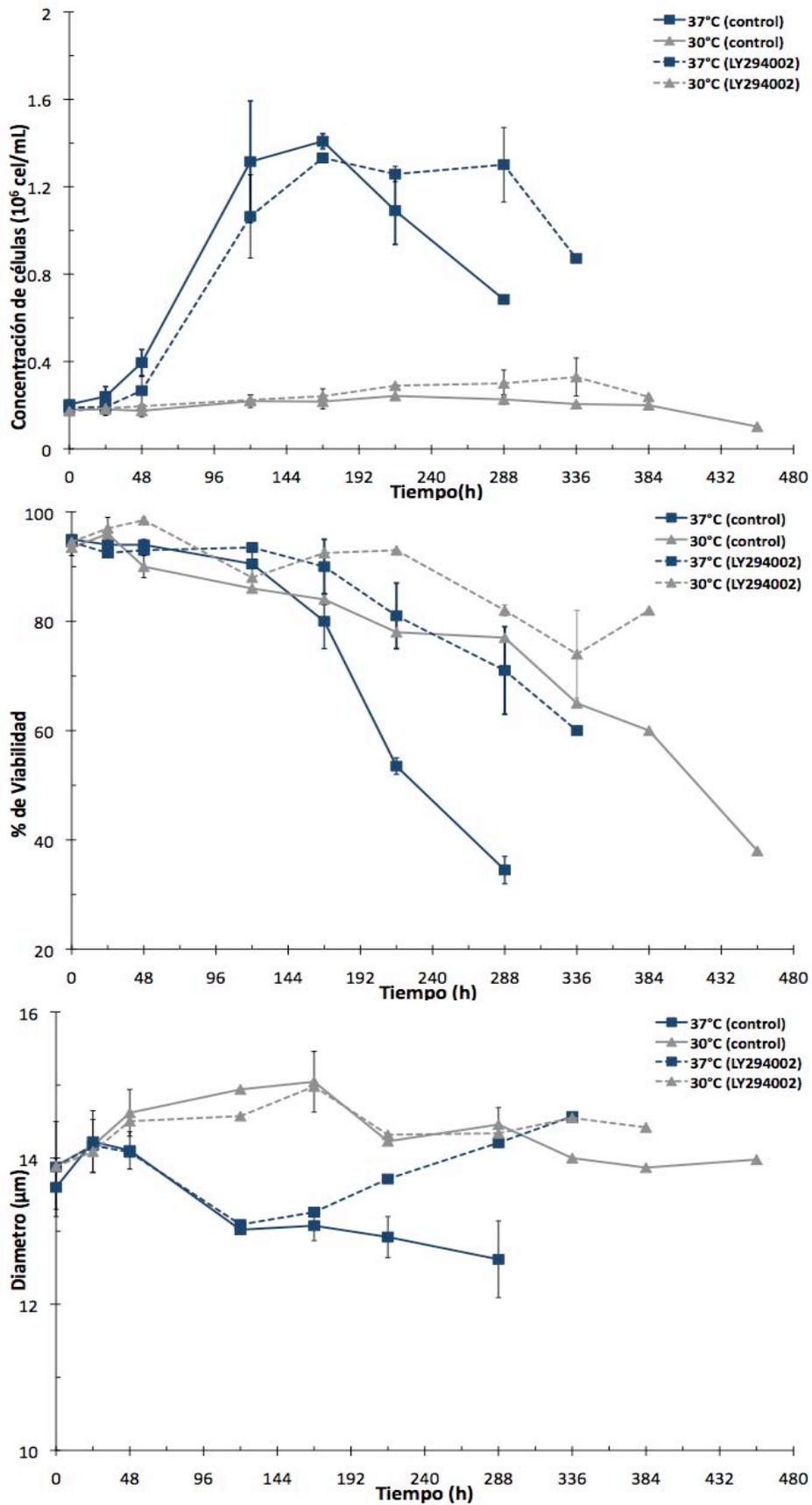


FIGURA 30.-Ensayos de inhibición de autofagia a 37°C y 30°C con LY29002 (5µM); A) crecimiento celular, B) Viabilidad y C) Diametros promedios. Las barras de error representan la la diferencia entre 2 experimentos diferentes.

### 8.3.2 CONCENTRACIÓN DE tPA.

Los mecanismos celulares de síntesis de proteína están fuertemente ligados a los procesos autofágicos. Con base en esto, se decidió evaluar la producción de tPA en los ensayos de inhibición de autofagia. La medición de tPA en estos experimentos se realizó con ensayos de ELISA utilizando el anticuerpo HY. Las mediciones realizadas fueron de forma relativa (normalizada), y se definió como 1 UR (unidad relativa) a la concentración máxima de tPA en el cultivo C37.

La acumulación de tPA en el cultivo C37 se dio de forma lineal y llegó a su concentración máxima (1 UR) a las 288 h. En las primeras 168 h, los cultivos C37 y LY37 tuvieron el mismo perfil de concentraciones de tPA. Entre las 168 y 288 h el cultivo LY37 produjo proteína recombinante a mayor velocidad que el cultivo C37; la máxima concentración en el cultivo LY37 fue de 1.6 UR (Fig. 31). En relación a la producción de tPA, los cultivos C30 y LY30 se comportaron de forma similar en las primeras 168 h (ambas alcanzaron aproximadamente 0.35 UR de concentración). Pero después de este punto, el cultivo LY30 siguió acumulando proteína llegando a una concentración de 0.82 UR a las 384 h. Por el contrario, la concentración de tPA en el cultivo C30 disminuyó después de las 168 h, hasta llegar a 0.12 UR a las 456 h (Fig. 31).

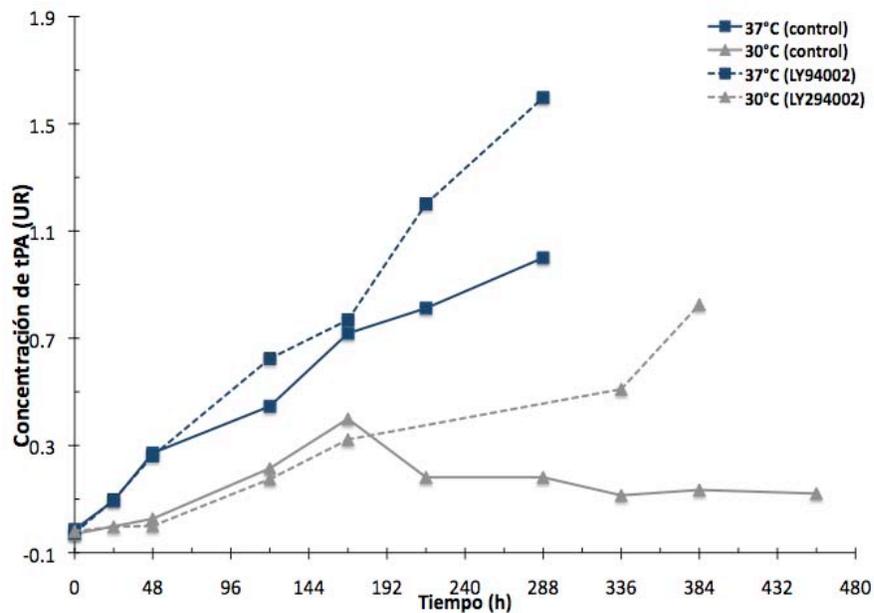


FIGURA 31.-Producción de tPA en ensayos de inhibición de autofagia con LY29002 (5 $\mu$ M).

## 9. DISCUSIÓN.

La hipotermia moderada en cultivos de células CHO proporciona beneficios relacionados a la productividad de proteína recombinante. Este fenómeno se ha intentado explicar desde un enfoque molecular, celular o por modelamiento matemático (Moore et al., 1997; Fox et al., 2004; Fox et al., 2005a). Sin embargo, aún no se conocen todos los factores que intervienen en el incremento de la producción. Los reportes que relacionan a la baja temperatura con la productividad, tienen grandes diferencias en relación a las condiciones empleadas, por ejemplo línea celular, proteína producida, temperatura, tipo de medio de cultivo (con suero o libre de suero), concentración celular del inóculo, esquema de cultivo, etc. Debido a esto, resulta difícil encontrar características comunes que revelen las causas del incremento en la productividad. Una de las pocas características que tienen en común todos estos reportes, es el aumento del tiempo de vida media del cultivo (retraso de la muerte celular). Sin embargo, este rubro no ha sido objeto de mayor estudio (Moore et al., 1997 ; Shi et al., 2005). Por lo tanto el objetivo principal de este trabajo fue determinar si la muerte celular juega un papel importante en el incremento de la productividad en células CHO en hipotermia moderada.

Para determinar la importancia que tiene la muerte celular en cultivos de hipotermia moderada, se decidió evaluar tres condiciones diferentes; cultivos control a 37°C, cultivos control a baja temperatura y cultivos bifásicos (es decir con cambio de temperatura). Furuawa y Oyushe (1998) reportaron que los efectos de la hipotermia moderada en cultivos de células CHO recombinantes dependen de la temperatura empleada. Sin embargo, se decidió realizar los cultivos hipotérmicos a 30°C, ya que ésta es una de las temperaturas más bajas que se han probado en trabajos de cultivos hipotérmicos (Yoon et al, 2003a, Yoon et al, 2006b Fogolin et al, 2005 Kaufmann et al,1999; Schatz et al., 2003; Fox et al, 2004; Hendrich et al, 2001). Sin embargo, es necesario aclarar que ésto no significa que 30°C sea la temperatura óptima para producción de proteína recombinante en la línea TF70R.

Una vez que se estableció la temperatura a trabajar, el siguiente paso fue seleccionar un proceso bifásico a esta temperatura. Se ha reportado que en esquemas bifásicos, el tiempo en el cual se hace el cambio de temperatura repercute fuertemente en la productividad (Yoon et al, 2006b; Fox et al, 2004). Por

esta razón, se decidió realizar un experimento de evaluación de diferentes cultivos bifásicos para determinar el tiempo óptimo del cambio de la temperatura de 37 a 30°C. El parámetro de selección para este experimento fue la productividad volumétrica.

### **9.1. DETERMINACIÓN DEL MEJOR TIEMPO PARA CAMBIO DE TEMPERATURA: 37 A 30°C**

Los resultados que se observan en la Tabla 3 concuerdan con reportes publicados con anterioridad (Fox et al., 2004; Yoon et al., 2006b). Eventos tal como: la disminución en las concentraciones celulares, en la velocidad de crecimiento, aumento del periodo de cultivo y aumento de la productividad de proteína, se pudieron observar en la evaluación del tiempo óptimo para cambiar la temperatura. Sin embargo, una peculiaridad que se observó en los resultados de este experimento, y que no ha sido reportada previamente (Fox et al., 2004; Yoon et al., 2006b), fue que los parámetros cinéticos de los cultivos bifásicos (medidos después del cambio de temperatura), no fueron iguales a los parámetros del cultivo monofásico a 30°C.

Fox et al. (2004), intentaron modelar cultivos bifásicos (cambio de temperatura de 37 a 32°C) utilizando parámetros cinéticos ( $\mu$ ,  $q_s$  y  $q_p$ ) obtenidos de datos experimentales de cultivos monofásicos. Sin embargo, su modelo no se ajustó a los datos experimentales de los cultivos bifásicos. Altamirano et al. (2001), analizaron diferentes estados estacionarios de cultivos continuos mediante la manipulación de la concentración de glucosa, y demostraron que la historia de la población celular influye considerablemente en el desempeño de la misma. Con base en estos dos reportes y en los resultados obtenidos en este trabajo, se puede pensar que las condiciones previas al cambio de temperatura, repercuten significativamente en el desarrollo del cultivo después del cambio de temperatura. Condiciones como concentración celular, concentración de sustratos y factores de crecimiento, viabilidad y estado metabólico, con las que se cuentan al inicio de la etapa de 30°C pudieron ser factores que afectaron el comportamiento de los parámetros en los cultivos bifásicos.

## **9.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA SUBFISIOLÓGICA SOBRE EL METABOLISMO, CICLO Y MUERTE CELULAR.**

Los diferentes reportes caracterizando la hipotermia moderada, muestran una relación entre productividad, ciclo, muerte celular, metabolismo y procesos moleculares. A continuación se discuten, desde un enfoque de los procesos de muerte celular, los parámetros medidos de las cuatro condiciones probadas.

### **9.2.1. CULTIVO CONTROL 37°C: ¿APOPTOSIS O AUTOFAGIA?**

Para determinar el efecto de la hipotermia moderada sobre la muerte celular, primero se caracterizó la muerte en condiciones estándar de cultivo (37°C). Bajo esta condición, al concluir la fase de crecimiento exponencial, comenzó a caer la viabilidad y la concentración celular viable, lo cual indicó el inicio de la muerte celular masiva. En ese mismo tiempo se presentaron algunos marcadores característicos de muerte celular ([Meneses-Acosta et al., 2001](#); [Hwang y Lee, 2008](#)) como la disminución de la población G1/G0, el aumento de la población sub-G1, comenzó la degradación específica y la aparición de la isoforma LC3II.

Mercille y Massie([1994b](#)) han reportado que el agotamiento de glucosa y glutamina detonan la muerte celular masiva en cultivos de células de mamífero. En particular, la glutamina tiene mayor importancia detonando dicho evento. Los resultados de este trabajo muestran que al inicio de la etapa de muerte celular en el cultivo a 37°C, la concentración de glucosa no presenta condiciones limitantes (alrededor de 1mM). Sin embargo, en ese mismo tiempo la glutamina llegó a la concentración mínima, por lo que se puede asumir que el agotamiento de la glutamina fue el principal inductor de la muerte celular.

El consumo de glutamato como remplazo de glutamina, se dio al término de la etapa de crecimiento exponencial. Sin embargo, es probable que las concentraciones de glutamato que se presentaron en ese tiempo (1mM) fueron insuficientes para mantener viable al cultivo. Altamirano et al.( [2000](#)), observaron que al disminuir la concentración de glutamato de 7mM a 4mM en un cultivo de la línea TF70R, inició la muerte sin que la glucosa fuera sustrato limitante.

Históricamente, la apoptosis ha sido considerada como el principal mecanismo de muerte celular en biorreactores. Sin embargo, existen tres consideraciones que deben hacerse. Primero, los métodos de detección de apoptosis como fragmentación de DNA (población sub-G1), integridad de membrana y disminución de diámetro celular son marcadores que también pueden presentarse en la muerte celular autofágica (Galluzi et al, 2007; Kroemer et al, 2008). Segundo, existe una estrecha relación entre las vías autofágicas y apoptóticas, donde la familia Bcl-2 juega un papel importante en la regulación de ambas muertes (Levine et al, 2008). Tercero, la limitación de glucosa, aminoácidos y factores de crecimiento, es un importante inductor de los procesos autofágicos (Kadowaki et al., 2006; Burchs et al, 2008; Maiuru et al, 2007; Levine y Yuan, 2005). Con base en estas tres consideraciones, se puede decir que los métodos con los que se ha caracterizado la muerte celular programada en células CHO, no son suficientemente selectivos para asegurar que la apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular en biorreactores. Por lo tanto, no se puede descartar que lo medido hasta la fecha en tales estudios podría ser muerte celular autofágica.

La morfología y características de muerte celular que se identificaron en los cultivos a 37°C incluyeron ambos tipos de muerte celular (muerte celular apoptótica y autofágica). En las MET no se percibió una clara condensación de cromatina ni desintegración del núcleo celular (ni en periodos avanzados de cultivo). Pero se identificó un aumento de la población sub-G1, disminución del diámetro celular e hinchamiento de RER y degradación específica de DNA cromosómico (características apoptóticas). Por el contrario, el aumento en LC3II y la presencia de vacuolas ácidas en citoplasma, sugirieron la presencia de muerte celular autofágica.

Goswami et al. (1999) y Sauerwald et al. (2003) utilizaron inhibidores químicos de caspasas (ejecutores principales de apoptosis) para estudiar el efecto que tenían en la muerte de células CHO recombinantes. Ellos encontraron que la inhibición química de apoptosis no era suficiente para retrasar la muerte celular. Por el contrario, en este trabajo se encontró que al inhibir la formación de autofagosomas a 37°C con LY294002, se retrasó la muerte celular hasta por 5 días (Fig. 29). Lo anterior nos sugiere que la muerte celular autofágica es el mecanismo principal de muerte en células CHO recombinantes o por lo menos juega un papel de suma

importancia al desencadenar los eventos de muerte celular, ya que al inhibir los procesos apoptóticos (otros reportes) no se tienen efectos en la muerte, pero al inhibir la vías autofágicas sí se retrasa la muerte celular (esta tesis).

Otra explicación de los resultados obtenidos en este trabajo, es la existencia de un esquema de muerte celular donde la apoptosis es inducida por medio de procesos autofágicos, como se ha reportado en los últimos años ([Thorburn, 2008](#); [Yousefi et al, 2006](#); [Scott et al, 2007](#)). Con base en estos reportes, es posible encontrar morfologías apoptóticas y autofágicas en una misma célula. El caso del perfil de degradación en el cultivo a 37°C ya que inició de forma inespecífica (degradación no apoptótica) y finalizó de forma específica (degradación apoptótica).

Al inicio de la etapa de muerte celular en los cultivos a 37°C, se observaron características que sugieren la presencia de autofagia y concuerdan con otros reportes. Por ejemplo, al inicio de la fase de muerte celular masiva la producción de proteína recombinante (tPA) se detuvo, esto es un indicador del estado de la traducción global de proteínas. Como respuesta a la falta de energía, las células de mamífero activan procesos catabólicos como autofagia, que a su vez reprime la síntesis de proteínas ([Burchs et al., 2007](#); [Codogno y Meijer, 2005](#)).

Cuando inició la etapa de muerte celular masiva en el cultivo a 37°C, el lactato se dejó de producir, pero el consumo de glucosa continuó. Este resultado sugiere que al no producir lactato, la glucosa consumida se direcciona de forma más eficiente a la generación de energía. En concordancia con estos resultados, [Colell et al. \(2007\)](#), mostraron que cuando los niveles de ATP se ven comprometidos, aumenta la expresión de GAPDH y por lo tanto aumenta el flujo glicolítico. Lo anterior sucede sólo cuando la concentración de glucosa no se encuentra en condiciones limitantes, como lo fue en nuestro caso. Otra función que desarrolla GAPDH es la de factor de transcripción de genes reguladores de autofagia ([Rathmel y Kornblut, 2007](#)). Este hecho refuerza la hipótesis de la presencia de procesos autofágicos en la etapa de muerte celular de este cultivo. Aunque en este trabajo no se midió la expresión de GAPDH, esta suposición se ajusta a los resultados obtenidos, pero son necesarios más estudios para darla por cierto.

Cuando se presenta algún estrés nutricional, las células inician el proceso autofágico en su faceta de rescate celular, sin embargo, cuando el estrés es muy severo, el proceso sufre una transición de rescate a muerte celular. La conversión entre rescate celular y muerte celular es un evento que aún no está claramente definido (Baehrecke, 2005). En el cultivo a 37°C no se pudo identificar características que revelaran la presencia de la autofagia como rescate celular. Es probable que en el momento en que la concentración de glutamina se acercó a la concentración limitante, el proceso de rescate celular iniciara. Sin embargo, la velocidad de consumo de glutamina fue tan rápida, que se puede suponer que la transición entre rescate celular a muerte celular fue instantánea. Un poco antes del comienzo de la muerte celular masiva, empezó el consumo de glutamato, tal vez éste fue un indicador de que la célula entró en un proceso de rescate, sin embargo, es necesario realizar más pruebas para verificar esta hipótesis.

### **9.2.2. CULTIVO BIFÁSICO: LA AUTOFAGIA COMO PROCESO CATABÓLICO.**

Muchos de los reportes publicados en torno a los cultivos bifásico de temperatura, muestran que pueden ser mejores que los procesos monofásicos de temperatura, sin embargo, no se han generado estudio cualitativos que comparen a estas dos condiciones (Fox et al., 2004; Yoon et al., 2006b).

El inicio de la fase de muerte celular en el cultivo bifásico, se identificó por eventos como la caída de la viabilidad, la caída de la concentración de células viables y el aumento de marcadores de muerte celular ( población sub-G1, perfil de degradación y LC3II ). Nuevamente estos eventos coincidieron con el agotamiento de glutamina y cuando las concentraciones de glucosa no eran limitantes. Estos resultados sugieren que en el caso del cultivo bifásico, el agotamiento de la glutamina también fue la causa del desencadenamiento de la muerte celular masiva. Con base en las MET y en el aumento de LC3II al inicio de la muerte celular, características de morfologías autofágicas, podemos suponer que el mecanismo por el cual mueren las células en el cultivo bifásico nuevamente es muerte celular autofágica. Sin embargo, aunque el perfil de fragmentación de DNA comenzó de forma inespecífica finalizó específico. Esto abre la necesidad de realizar más experimentos para conocer la dinámica de muerte celular y la incidencia de apoptosis y autofagia en esta dinámica.

Se ha reportado que los procesos de muerte celular sufren un retraso cuando las células se exponen a hipotermia moderada (Moore et al. 1997; Shi et al., 2005). En este trabajo, de acuerdo con los datos de la población sub-G1 y LC3II, se observó que el cultivo bifásico inició su periodo de muerte celular masiva después que el cultivo control (37°C). Es probable que el periodo de 48 h que tuvo el cultivo bifásico a 37°C, le confirió características o ventajas que le permitieron retrasar los procesos de muerte celular. Una de ellas pudo ser una mayor presencia de factores de crecimiento al inicio de su fase a 30°C (Fox et al., 2005b). Otra de ellas pudo ser la redistribución del metabolismo (Altamirano et al., 2000), en virtud de que los parámetros metabólicos mostraron que el metabolismo desarrollado en este cultivo fue el que derrochó menos recursos en comparación a los otros cultivos. Contrario a lo que sucedió con el cultivo bifásico, el cultivo a 30°C no tuvo un periodo a 37°C, de tal manera que no adquirió las características que le permitieran retrasar su muerte celular; la población sub-G1 y LC3II aparecieron en etapas tempranas. En este cultivo las concentraciones celulares fueron bajas y el metabolismo que desarrolló desperdició mucha fuente de energía (Tabla 4).

La fase de crecimiento que se consideró, para realizar los cálculos, en el cultivo bifásico comprendió el tiempo entre el cambio de temperatura y la concentración celular máxima. En la segunda mitad de la fase de crecimiento, se presentaron algunos eventos que sugieren la transición de la autofagia entre rescate y muerte celular. La presencia de actividad autofágica en esta fase de cultivo se fundamenta en el aumento moderado de los marcadores de muerte celular (LC3II y población Sub-G1). La presencia de autofagia como rescate celular posiblemente se debió a que la  $q_{Gln}$  fue muy baja, de tal manera que cuando la concentración de glutamina llegó a menos de 1mM, ésta tardó aproximadamente 120 h en llegar a la concentración limitante (0.2 mM). Este tiempo permitió observar los efectos del sistema de rescate celular en esta fase del cultivo. En el cultivo control, el rescate celular no se pudo observar ya que la  $q_{Gln}$  fue muy rápida y la concentración de glutamina pasó de 1 a 0.2 mM apenas en un poco más de 24 h.

La producción de glutamato por células de mamífero en cultivo es atribuida principalmente a la desaminación de glutamina (Fig. 32). Aunque no se conoce con exactitud dónde se encuentra la primera enzima del metabolismo de glutamina (glutaminasa), se sabe que un porcentaje de glutamato proveniente de esta reacción es expulsado fuera de la mitocondria y en ocasiones de la célula (Gódia y Cairó, 2006). Es por ello que la producción de glutamato por cultivos de células animales es una medida indirecta de la cantidad de glutamina que no es metabolizada. El  $Y_{Glu/Gln}$  del cultivo bifásico fue bajo en comparación a los demás cultivos e indica que la asimilación de glutamina fue mejor en este cultivo. Las concentraciones de glutamato en la segunda mitad de la fase de crecimiento permaneció aproximadamente constante, a pesar de que en las demás etapas del cultivo se acumuló. Este comportamiento puede tener dos explicaciones: que en este intervalo de tiempo el glutamato llegó a un equilibrio entre producción y consumo, o que la producción y el consumo de glutamato fueron de cero. Cualquiera de las dos hipótesis sugieren una mejor asimilación de glutamina en este periodo del cultivo, ya sea por inclusión directa de glutamina a ciclo de Krebs o por inserción del glutamato vía glutamino sintetasa.

La mejor asimilación de glutamina antes de que el cultivo entrara en su etapa de muerte celular masiva, pudo ser resultado de la adaptación de las células a la limitación de glutamina, desencadenando el proceso autofágico de rescate celular. En este rubro el papel que juega la glutamino sintetasa puede ser de suma importancia ya que se ha demostrado que bajos niveles de glutamina intracelular son inductores de los procesos autofágicos (Nicklin et al., 2009). Si se plantea que en la etapa preliminar a la muerte celular del cultivo bifásico existió un consumo de glutamato, se podría inferir que la célula responde de esta manera para mantener los niveles de glutamina intracelular y de esta forma retrasar la muerte celular masiva. Sin embargo, es necesario profundizar en el tema para conocer la importancia que tiene el sistema de glutamino sintetasa en el rescate celular.

A la mitad de la etapa de crecimiento del cultivo bifásico terminó la producción de lactato, este evento influyó en el  $Y_{Lac/Glc}$ , ya que fue el más bajo de todos (Tabla 4), lo cual indica una mejor asimilación de glucosa. Este evento también puede estar relacionado a la mejor asimilación de la fuente de carbono cuando la célula está expuesta a limitaciones de nutrientes. Así, cuando las

concentraciones de glutamina se ven comprometidas se procesa de forma más eficiente la glucosa consumida.

Existen reportes que relacionan a actores de autofagia como mTOR y Akt en la regulación del crecimiento y tamaño celular ( [Fingar et al., 2002](#); [Edinger et al., 2002](#)). En el cultivo bifásico de esta tesis se pudo observar que al bajar la temperatura, inmediatamente se produjo un aumento en el diámetro celular. En los experimentos de inhibición de autofagia, se observó un efecto similar en el cultivo a 37°C con inhibidor de autofagia pero esto sucedió a partir de las 120 h. Estos resultados señalan que hay una relación entre diámetro celular, temperatura y autofagia, sin embargo aún se necesitan más estudios para conocer la relación que tienen estos parámetros.

### **9.2.3. CULTIVOS A 30°C : FACTORES DE CRECIMIENTO Y AUTOFAGIA.**

Para caracterizar el tipo de muerte celular, el metabolismo y el ciclo celular en los cultivos a 30°C, se compararon cultivos a 30°C con inóculos de  $2 \times 10^5$  y  $4 \times 10^5$  cel/mL. De acuerdo con los resultados de LC3II y de MET, las vacuolas autofágicas se presentaron desde etapas tempranas de estos dos cultivos. Estas características sugieren la presencia de autofagia cuando los cultivos son expuestos a 30°C. Existen reportes que soportan la hipótesis de la presencia de autofagia cuando la células se cultivan en hipotermia moderada. Lu et al. (2005), demostraron la existencia de autofagia en hepatocitos expuestos a baja temperatura. Kumar et al. (2008), reportaron un aumento de 2 veces en los niveles de proteína GADPH cuando cultivaron células CHO a baja temperatura. Como ya se mencionó, esta proteína es un inductor positivo de autofagia, además de mantener los niveles energéticos de la célula como un esfuerzo para sobrevivir. Ohsaka et al.(2002), reportaron que en cultivos a baja temperatura de células HepG2, la proteína JNK (c-Jun N-terminal Kinasa) está fosforilada y por consiguiente activa. Cuando esta molécula es activa, tiene la capacidad de fosforilar a Bcl-2 ([Wei et al, 2008](#)) e inhibir su función. Como resultado de la inhibición de Bcl-2, aumenta la actividad del complejo formador de autofagosomas (PI3K).

Una característica muy importante que tienen en común la autofagia y la hipotermia moderada es que en los dos casos se atenúa la traducción global de proteínas, este proceso se realiza mediante la fosforilación de factores de iniciación de la traducción (eIF's) (Al-faghee et al, 2006; Underhill, 2006). Las moléculas mTOR, S6K y 4E-BP juegan un papel central en la fosforilación de los eIF's, este mecanismo de atenuación se ha caracterizado ampliamente en procesos autofágicos (Arsham y Neufeld, 2006; Carrera, 2004; Gingras et al, 2001). Por esta razón, se puede inferir que los efectos observados en la traducción global a causa de la hipotermia moderada, son dirigidos por mecanismos de autofagia.

Existen evidencias que sugieren la presencia de ambas modalidades de autofagia en la fase de crecimiento del cultivo a 30°C. Por un lado en esta etapa hay un alto porcentaje de la población sub-G1 y alta degradación celular (Fig. 15) dando indicios de muerte celular (posiblemente autofágica). Estos resultados coinciden con lo observado por Clark et al. (2004), quienes observaron mayor actividad proteolítica en cultivos a mediana hipotermia. Probablemente el aumento de esta actividad proteolítica fue un efecto de la degradación celular que presentaron estos cultivos. Por otro lado la supervivencia celular está presente ya que en la fase de crecimiento de este cultivo hay un alto porcentaje de células viables. Estos resultados indican que un porcentaje de células murieron y otro porcentaje permaneció viable. Con base en lo anterior, es posible pensar que la alta proporción de LC3II que se presentó en el cultivo a 30°C tuvo una fracción asociada a muerte celular autofágica y otra fracción al proceso de supervivencia, de tal forma que al sumar ambas fracciones explicaría la alta proporción de LC3II que se encontró en este cultivo.

Cain et al. (1994) y Bursch et al. (1996), reportaron que debido a eventos relacionados con autofagia, se presenta fragmentación inespecífica de alto peso molecular (30-250 kpb). Esto correlaciona con los resultados de población sub-G1 y fragmentación específica que se obtuvieron del cultivo a 30°C. Aunque el aumento de la población sub-G1 se da desde la mitad de la etapa de crecimiento exponencial del cultivo a 30°C, la degradación específica de bajo peso molecular no se observó. Con base en esto se puede descartar que la degradación de material genético que presentó el cultivo a 30°C haya sido por procesos apoptóticos, y

probablemente se debió a procesos autofágicos ya que los fragmentos fueron de alto peso molecular.

A diferencia de los cultivos a 37°C y bifásico, en el cultivo a 30°C la glutamina no fue causante del desencadenamiento de la muerte celular masiva. La caída en la concentración celular viable y la caída de la viabilidad por debajo de 90% fueron los únicos marcadores de muerte celular que pudieron ser identificados cuando inició la etapa de muerte. Los resultados de inhibición con LY294002 en cultivos a 30°C sugieren que al inhibir autofagia en estos cultivos el proceso de muerte celular se ve ligeramente atrasado, ya que cuando en el cultivo sin inhibición disminuyó la población viable, el cultivo con inhibición creció ligeramente. Estos resultados sugieren que el mecanismo por el que murieron estas células podría ser muerte celular autofágica. Sin embargo, hay que tener presente que en este caso la muerte celular no está inducida por limitación de algún nutriente. Además, la presencia de autofagia (como muerte y sobrevivencia) se dio a lo largo de todo el cultivo. Por lo cual, son necesario más experimentos que puedan aclarar el mecanismo y la causa de la muerte en este cultivo.

Los altos valores que alcanzaron los rendimientos  $Y_{Glu/Gln}$  y  $Y_{Lac/Glc}$  en el cultivo a 30°C representan una muy mala asimilación de glutamina y glucosa, respectivamente. Este comportamiento metabólico sugiere que la incorporación de fuente de energía y carbono a TCA es muy limitada para este cultivo. Acorde con esta suposición, Docummun et al. (2002) reportaron un bajo  $q_{O_2}$  en cultivos de células CHO sometidos a temperatura subfisiológica, lo cual refleja también la posible baja actividad de fosforilación oxidativa en cultivos hipotérmicos. La poca integridad en la que se encontraron las estructuras mitocondriales del cultivo a 30°C también podría estar relacionada a la baja respiración y actividad de TCA.

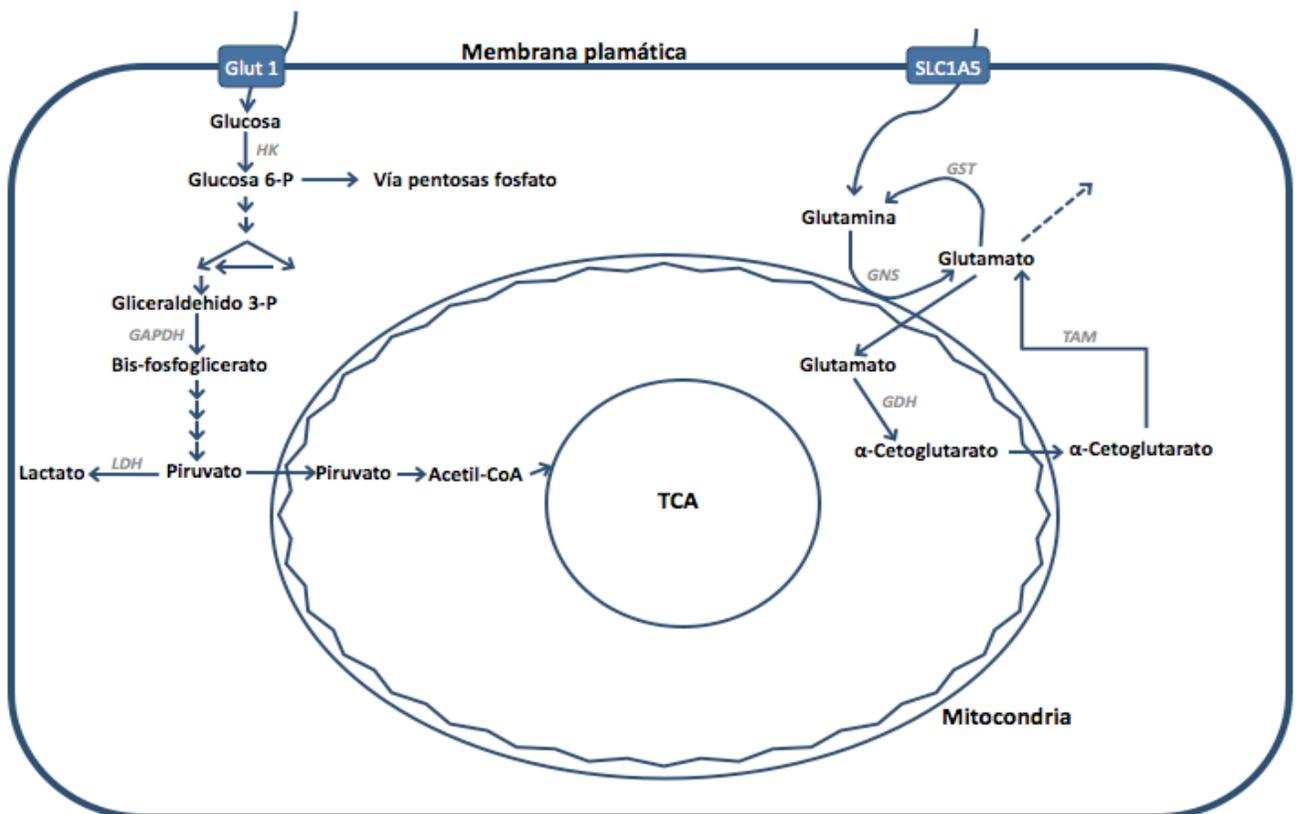
Buller et al. (2008) y Lum et al. (2005) han relacionado la inhibición de mTOR y la presencia de autofagia como atenuadores de la expresión de GLUT1; el principal transportador de glucosa en mamíferos. Ya que en este trabajo se ha confirmado la presencia de autofagia en los cultivos a 30°C, existe la posibilidad que en este cultivo se limite la disposición de energía intracelularmente. En el caso de la glutamina, Nicklin et al. (2009) demostraron que la asimilación de glutamina por su transportador (SLC1A5), y su posterior antiporte con aminoácidos esenciales (como

leucina), son un paso limitante para la evitar la inhibición de mTOR y la consecuente activación de autofagia. De esta manera la concentración intracelular de glutamina es de suma importancia para evitar la autofagia. Probablemente en los cultivos a 30°C existe algún tipo de inhibición del transportador de glutamina debido a la baja temperatura, por lo cual la asimilación de este aminoácido es muy baja. Esto llevaría a la baja disponibilidad de aminoácidos esenciales así como a la presencia de autofagia.

En el cultivo 30°C/4 igual que en los cultivos a 37°C y bifásico, se presentaron eventos que coinciden con la muerte celular masiva como agotamiento de glutamina, aumento de la población sub-G1 y la caída de viabilidad. Sin embargo, sólo en los cultivos bifásicos y control, la aparición de LC3II también coincidió con el inicio de la muerte celular, pero en el cultivo 30°C/4 este evento no coincidió. La aparición de LC3II para el cultivo 30°C/4 se dió desde el inicio, con un aumento muy ligero a lo largo del cultivo. La diferencia observada en el comportamiento de LC3II entre los cultivos a 30°C y 30°C/4 sugiere que la intensidad con que se presentó la autofagia en el cultivo 30°C/4 fue menor en comparación a la que se presentó en el cultivo a 30°C. Además del comportamiento de LC3II, hay más evidencias que insinúan que la autofagia actuó con menor intensidad en el cultivo 30°C/4 que en el cultivo 30°C. Por ejemplo: A diferencia del cultivo a 30°C, en la fase de crecimiento del cultivo 30°C/4 no se presentaron características de muerte celular autofágica (detritos celulares), el aumento de la población sub-G1 se dio hasta el agotamiento de la glutamina, de acuerdo a las MET, la integridad celular del cultivo 30°C/4 fue mejor y el número de autofagosomas presentes fue menor que en el cultivo a 30°C. Todas estas diferencias entre los cultivos 30°C y 30°C/4 están propiciadas con tan sólo duplicar la concentración celular del inóculo.

Es muy importante mencionar que el medio CDM4CHO es un medio químicamente definido y no tiene suplementos como suero fetal bovino. Por esta razón, los factores de crecimiento necesarios para la proliferación celular deben ser producidos por la mismas células. Las diferencias observadas entre el cultivo 30°C y el cultivo 30°C/4 pudieron estar relacionadas a la concentración de factores de crecimiento autócrinos, ya que con una mayor concentración celular inicial hay una mayor concentración de éstos. Los factores de crecimiento están estrechamente

relacionados con el consumo de sustratos, actividad biosintética y son uno de los actores principales en las vías autofágicas (Lum et al, 2005; Levine y Yuan, 2005; Corradetti y Guan, 2006 ). Es posible que los efectos que la autofagia tuvo sobre el cultivo a 30°C, no se presentaron de forma tan drástica en el cultivo 30°C/4, gracias que había una mayor concentración de factores de crecimiento en etapas tempranas del cultivo. Fox et al. (2005b) demostraron que al adicionar factores de crecimiento a cultivos de células CHO expuestos a 32°C, se incrementó la producción de IFN- $\gamma$ , se prolongó el periodo de cultivo y aumentó la densidad celular, lo que les hizo suponer un mejor estado fisiológico capaz de crecer activamente.



**FIGURA 32.**-Esquema general del metabolismo de glucosa y glutamina en células de mamífero. Glut1: transportador de glucosa, HK: Hexokinasa, GAPDH: Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, LDH: Lactato deshidrogenasa, GST: Glutamino sintetasa, GNS: Glutaminasa, GDH: Glutamato deshidrogenasa, TAM: Transaminasa, TCA: ciclo ácidos tricarboxílicos.

Es claro que el metabolismo del cultivo a 30°C/4 derrocha menos sustratos que el metabolismo del cultivo a 30°C. La presencia de más factores de crecimiento en el cultivo a 30°C/4 debido al aumento de la concentración celular, pudo haber afectado este comportamiento metabólico. En el caso del cultivo a 30°C la falta de

factores de crecimiento pudo disminuir la expresión de Glut1 y por consiguiente la disponibilidad de glucosa, tal y como lo reportó Edinger et al. (2002 y 2003). Este suceso pudo mermar la disponibilidad de energía e intermediarios del ciclo de Krebs. Al no tener los intermediarios suficientes el glutamato proveniente de la desaminación de glutamina no puede incorporarse al ciclo de Krebs. Por lo que se produjo demasiado glutamato en el medio de cultivo. Sin embargo, es necesario realizar más pruebas para corroborar esta hipótesis.

La producción de glutamato en el cultivo a 30°C fue muy alta, pero se puede pensar que las células no activaron el sistema glutamino sintetasa porque aún había glutamina presente en el medio cultivo. Sin embargo, en el cultivo 30°C/4 no se presentó consumo de glutamato a pesar de que se agotó la glutamina. Estas evidencias sugieren que el sistema glutamino sintetasa no es funcional o es muy poco funcional en esta línea celular a 30°C. Nicklin et al. (2009) mostraron que es necesaria una buena integración entre factores de crecimiento y disponibilidad de nutrientes para regular adecuadamente la autofagia. De esta manera, aunque en el cultivo a 30°C estén disponibles los nutrientes, la falta de factores de crecimiento atenúa sus procesos metabólicos.

### **9.3. INHIBICIÓN DE AUTOFAGIA.**

Se ha observado actividad inhibitoria de LY294002 sobre Vps34 (PI3K clase III), PI3K clase I, mTOR, Akt y S6K, sin embargo, la concentración utilizada en este trabajo (5µM) tiene muy poca actividad en la mayoría de estas enzimas exceptuando a la Vps34 (Gingras et al., 2001; Codogno y Meijer, 2005), esta última forma parte de las vías de señalización de autofagia. Existen reportes que indican que la inhibición de mTOR por inhibidores como el LY294002 únicamente se da en ausencia de aminoácidos (Blommaert et al 1997) pero la inhibición de Vps34 asegura que no se complete la formación de autofagosomas por lo tanto no habrá degradación autofágica. Aunque el LY294002 puede llegar a inhibir las proteínas mTOR, Akt y S6K, que tienen actividad sobre el crecimiento celular y síntesis de proteína. Los resultados demuestran que el LY294002 no tuvo efectos significativos en el crecimiento celular o en la síntesis de proteína por lo tanto es válido considerar que el inhibidor sólo tuvo efectos en la autofagia.

La concentración de tPA en el cultivo C30 disminuyó cuando las células viables disminuyeron, pero el cultivo LY30 continuó produciendo proteína recombinante después de este periodo. Esto nos indica que la inhibición de la formación de autofagosomas en cultivos a hipotermia moderada resulta benéfica para la productividad del biofármaco, y abre la posibilidad para optimizar los cultivos de células CHO a baja temperatura. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos que determinen cual es la vía más efectiva de inhibición de autofagia sin que se afecte la producción de proteína, tanto a 37°C como a 30°C.

#### **9.4.CICLO CELULAR.**

Muchos trabajos han relacionado el arresto en G1/G0 del ciclo celular con el aumento de la productividad en temperaturas subfisiológicas ([Moore et al., 1997](#); [Kaufmann et al., 1999](#); [Fox et al., 2005a](#)). Sin embargo, en esta tesis se demostró un arresto en la fase G2/M del ciclo celular, lo cual va en contra de la mayoría de los reportes realizados. Rieder y Cole ([2002](#)) demostraron que el arresto celular (fase del ciclo) inducido por hipotermia moderada, es línea celular y temperatura dependiente lo cual podría explicar el fenómeno que observamos aquí. Otra posible explicación se relaciona a algún tipo de poliploidía inducido debido a la baja temperatura. Con base en lo anterior se puede especular que sí se presentó un alto porcentaje de células en G1/G0, pero con un número mayor de cromosomas del que las células CHO suelen contener. Por esta razón, el arresto en fase G2/M podría ser sólo aparente. Es necesario otro tipo de ensayos para verificar esto, y saber si este fenómeno tiene alguna relación con la productividad, pese al reporte de Fox et al. ([2005a](#)), quienes demostraron que los efectos positivos de la baja temperatura no tienen relación al arresto en G1/G0.

## 10.CONCLUSIONES.

La línea celular TF70R, responde favorablemente a la disminución de temperatura (30°C), aumentando su productividad específica hasta un 30% y su productividad volumétrica hasta un 56%. Aunque el cultivo bifásico con cambio de temperatura a las 48 h, no resultó en la productividad específica más alta, si presentó la mayor productividad volumétrica de todos los procesos bifásicos de 37°C a 30°C.

Aunque en cultivos de la línea TF70R se presentaron características apoptóticas, la muerte celular autofágica puede ser el principal mecanismo de muerte celular o juega un papel de suma importancia para la muerte en cultivos a 37°C , cultivos a 30°C y en cultivos bifásicos. El agotamiento de glutamina es el detonante de los procesos de muerte celular para los cultivos a 37°C y cultivos bifásicos.

Existe una alta actividad autofágica en los cultivos a 30°C de la línea TF70R. La concentración celular y/o factores de crecimiento pueden ser elementos que optimizan el desempeño de cultivos a esta temperatura. La inhibición de muerte celular autofágica puede mejora la producción de proteína recombinante a 37 y 30°C.

El cultivo bifásico a 48 h, fue el más eficiente metabólicamente, ya que tuvo bajos consumos de sustratos (glucosa y glutamina) y bajas producciones de desechos (glutamato y lactato). Por el contrario, el cultivo a 30°C fue menos eficiente metabólicamente; el metabolismo de glutamina juega un papel muy importante en el desempeño de estos cultivos.

El aumento de la producción de tPA en la línea TF70R cultivada a baja temperatura, no tuvo relación con un arresto en la fase G1/G0 del ciclo celular.

## **11 PERSPECTIVAS.**

El conocimiento generado con este trabajo, deja abiertas una serie de preguntas en la cuales es necesario investigar más para definir en sistema de hipotermia moderada en cultivos de células CHO. Algunas de estas investigaciones podrían ser:

- Determinar si existe algún relación o evento molecular entre el consumo de nutrimentos y la hipotermia moderada.

- Determinar el papel que juega el sistema glutamino sintetasa en la sobrevivencia y productividad de cultivos a temperatura subfisiológica.

- Determinar la dinámica de muerte celular y el papel que desempeñan la apoptosis y la autofagia.

- Desarrollar estrategias de cultivo que mejoren los cultivos en hipotermia moderada: Cultivos bifásicos alimentados.

- Desarrollo racional de ingeniería celular relacionada a la autofagia para cultivos hipodérmicos y a temperatura fisiológica.

## 12. BIBLIOGRAFÍA.

Abu-absi NR, Srienc F. **1998**. Cell cycle events and cell cycle-dependent processes. en: Spier RE, editor. *The Encyclopedia of Cell Technology*. New York: John Wiley & Sons. 320-334.

Adams JM. **2003**. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 17; 2481–2495.

Al-Fageeh MB, Marchant RJ, Carden MJ, Smales CM. **2005**. The cold-shock response in cultured mammalian cells: harnessing the response for the improvement of recombinant protein production *Biotechnol Bioeng* 93; 829-835.

Al-Faghee BM, Smales M. **2006**. Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochem J* 397; 247–259.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. **1994**. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Publishing. 1294 p.

Altamirano C, Illanes A, Casablanco A, Gámez X, Cairó JJ, and Gódia C. **2001**. Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture. *Biotechnol Prog* 17; 1032-1041.

Altamirano C, Paredes C, Cairo JJ, Godia F. **2000**. Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnol Prog* 16; 69-75.

An-Ping Z, Ping-Xiu B. **2006**. Cell culture kinetics and modeling. en: Ozturk SS, Hu WS, editores. *Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies*. New York: Taylor & Francis group. 299-333.

Arden N, Betenbaugh MJ. **2006**. Regulating apoptosis in mammalian cell cultures. *Cytotechnol* 50; 77-92.

Arden N, Betenbaugh MJ. **2004**. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. *Trends Biotechnol* 22; 174–180.

Arsham AM, Neufeld TP. **2006**. Thinking globally and acting locally with mTOR. *Curr Opin Cell Biol* 18; 589–597.

Baehrecke EH. **2005**. Autophagy: dual roles in life and death?. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6; 505-510.

Baik JY, Lee MS, An SR, Ion SK, Joo EJ, Kim YH, Park HW, Lee GM. **2005**. Initial transcriptome and proteome analyses of low culture temperature-induced expression in CHO cells producing erythropoietin. *Biotechnol Bioeng* 93; 361-371.

Barnabe N, Butler M. **1994**. Effect of temperature on nucleotide pools and monoclonal antibody production in a mouse hybridoma. *Biotechnol Bioeng* 44;1235-1245.

Bloemkolk JW, Gray MR, Merchant F, Mosmann TR. **1992**. Effect of temperature on hybridoma cell-cycle and Mab production. *Biotechnol Bioeng* 40;427-431.

Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelarova H, Meijer AJ. **1997**. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 243; 240-246.

Brightwel G, Poirier V, Cole E, Ivins S, Brown KW. **1997**. Serum-dependent and cell cycle-dependent expression from a cytomegalovirus-based mammalian expression vector. *Gene* 194; 115-123.

Buller CL, Loberg RD, Fan MH, Zhu Q, Park JL, Vesely E, Inoki K, Guan KL, Brosius FC. **2008**. A GSK-3/TSC2/mTOR pathway regulates glucose uptake and GLUT1 glucose transporter expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 295; 836-843.

Bursch W, Ellinger A, Kienz H, Torok L, Pandey S, Sikorska M, Walker R, Hermann RF. **1996**. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* 17; 1595-1607.

Bursch W, Karwan A, Mayer M, Dornetshuber J, Fröhwein U, Schulte-Hermann R, Fazi B, Di Sano F, Piredda L, Piacentini M, Petrovski G, Fésüs L, Gerner C. **2008**. Cell death and autophagy: cytokines, drugs, nutritional factors. *Toxicology* 254;147-57.

Butler M. **2005**. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol* 68; 283-291.

Cain K, Inayat-Hussain SH, Wolfe JT, Cohen GM. **1994**. DNA fragmentation into 200-250 and/or 30-50 kilobase pair fragments in rat liver nuclei is stimulated by Mg<sup>2+</sup> alone and Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> but not by Ca<sup>2+</sup> alone. *FEBS Lett* 349; 385-391.

Carrera AC. **2004**. TOR signaling in Mammals. *J Cell Sci* 117; 4615-4616.

Chu L, Robinson D K. **2001**. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Curr Opin Biotechnol* 12;180-187.

Clark RJK, Chaplin FWR, Harcum SW. **2004**. Temperature effects on product-quality-related enzymes in batch CHO cell cultures producing recombinant tPA. *Biotechnol Prog* 20;1888-1892.

Codogno P, Meijer AJ. **2005**. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Diff* 12;1509–1518.

Colell A, Ricci JE, Tait S, Milasta S, Maurer U, Bouchier-Hayes L, Fitzgerald P, Guio-Carrion A, Waterhouse NJ, Li CW, Mari B, Barbry P, Newmeyer DD, Beere HM and Green DR. **2007**. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* 129; 983–997.

Corradetti MN, Guan KL. **2006**. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene* 25; 6347–6360.

Castro-Obregón S, Covarrubias L. **2007**. Types of cell death: basic mechanisms. en: Massieu L, Arias C, Morán J, editores. *Neurochemistry of neuronal death*. Kerala: Research Signpost. 1-27.

Cudna RE, Dickson AJ. **2003**. Endoplasmic reticulum signaling as a determinant of recombinant protein expression. *Biotechnol Bioeng* 81;56–65

Daniel NN, Korsmeyer SJ. **2004**. Cell death: critical control points. *Cell* 116; 205–219.

de Boer L, Gray PP, Sunstrom NA. **2004**. Enhanced productivity of G1 phase Chinese hamster ovary cells using the GADD153 promoter. *Biotechnol Lett* 26; 61–65.

Degterev A, Yuan J. **2008**. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9; 378-390.

Dresios J, Aschrafi A, Owens GC, Vanderklis PW, Edelman GM, Mauro VP. **2005**. Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102; 1865–1870.

Documun P, Reux PA, Kadouri A, von Stockar U, and Marison IW. **2002**. Monitoring temperature effects on animal cell metabolism in packed bed process. *Biotechnol Bioeng* 7; 838-842.

Driscoll M. **1992**. Molecular genetics of cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Neurobiol* 23; 1327-51.

Dutton RL, Scharer JM, Moo-Young M. **1998**. Descriptive parameter evaluation in mammalian cell culture. *Cytotechnol* 26; 139–152.

Edinger AL, Cinnalli RM, Thompson CB. **2003**. Rab7 prevents growth factor-independent survival by inhibiting cell-autonomous nutrient transport expression. *Dev Cell* 5; 571–582.

Edinger AL, Thompson CB. **2002**. Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol Biol Cell* 13; 2276–2288.

Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. **2002**. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 16; 1472–1487.

Fogolin BM, Forno G, Nimtz M, Conradt HS, Etcheverrigaray M, Kratje R. **2005**. Temperature reduction in cultures of hGM-CSF-expressing CHO cells: Effect on productivity and product quality. *Biotechnol Prog* 21; 17-21.

Fogolín BM, Wagner R, Etcheverrigaray M, Kratje R. **2004**. A Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *J Biotechnol* 109; 179–191.

Fox SR, Patel UA, Yap MG, Wang DI. **2004**. Maximizing interferon- $\gamma$  production by chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: Experimental and modeling. *Biotechnol Bioeng* 85; 177-184.

Fox SR, Tan HK, Tan MC, Wong SC, Yap MG, Wang DI. **2005a**. A detailed understanding of the enhanced hypothermic productivity of interferon gamma by chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Appl Biochem* 41;255–264.

Fox SR, Yap MX, Yap MGS, Wang DIC. **2005b**. Active hypothermic growth: a novel means for increasing total interferon- $\gamma$  production by Chinese-hamster ovary cells. *Biotechnol Appl Biochem* 41; 265–272.

Furukawa K, Ohsuye K. **1998**. Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C-terminal amidatin enzyme. *Cytotechnol* 26;153–164.

Fussenegger M, Bailey JE. **1998**. Molecular regulation of cell-cycle progression and apoptosis in mammalian cells: Implications for biotechnology. *Biotechnol Prog* 14; 807-833.

Galbraith DJ, Tait AS, Racher AJ, Birch JR, James DC. **2006**. Control of culture environment for improved polyethylenimine-mediated transient production of recombinant monoclonal antibodies by CHO cells. *Biotechnol Prog* 22; 753 –762.

Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. **2007**. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Diff* 14; 1237–1243.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. **2001**. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Gen Dev* 15; 807–826.

Gódia F, Cairó J.J. **2006**. Cell Metabolism. en: Ozturk SS, Hu WS, editores. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. New York: Taylor & Francis group. 81-112.

Goswami J, Sinskey AJ, Steller H, Stephanopoulos GN, Wang DIC. 1998.

Apoptosis in batch cultures of chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 62; 632-640.

Harcum S. **2006**. Protein Glycosylation en: Ozturk SS, Hu WS, editores. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. New York: Taylor & Francis group. 113-145.

Hendrick V, Winnepeninckx P, Abdelkafi C, Vandeputte O, Cherlet M, Marique T, Renemann G, Loa A, Kretzmer G, Werenne J. **2001**. Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis. *Cytotechnol* 36; 71-83.

Hengartner MO. **2000**. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407; 770-776.

Hof R. **2008**. Poster: Monoclonal antibody titers of 10 gram/liter and beyond; the PerC6 cell line XD process. En memorias del congreso: *Cell culture engineering XI*. Sunshine Coast, Queensland, Australia, Abril 2008.

Hwang SO, Lee GM. **2008**. Nutrient deprivation induces autophagy as well as apoptosis in chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol Bioeng* 99; 678-685.

Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu WS, Yap MGS. **2007**. Recombinant protein therapeutics-20 years and counting. *Chem Eng Prog* 103; 40-48.

Kadowaki M, Karim R, Carpi A, Miotto G. **2006**. Nutrient control of macroautophagy in mammalian cells. *Mol Asp Med* 27; 426-443.

Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM. **2002** The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3; 411-421.

Kaufmann H, Mazur X, Fussenegger M, Bailey JE, **1999**, Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells, *Biotechnol Bioeng* 63:573-582.

Kaufmann SH, Earnshaw WC. **2000**. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 256; 42-9.

Kita H, Carmichael J, Swartz J, Muro S, Wyttenbach A, Matsubara K, Rubinsztein DC, Kato K. **2002**. Modulation of polyglutamine-induced cell death by genes identified by expression profiling. *Hum Mol Gen* 11; 2279-2287

Klionsky DJ. **2005**. The molecular machinery of autophagy: Unanswered questions. *J Cell Sci* 118; 7-18.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M,

Zhivotovsky B and Melino G. **2008**. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Diff* 16; 3–11.

Kumar N, Gammell P, Meleady P, Henry M, Clynes M. **2008**. Differential protein expression following low temperature culture of suspension CHO-K1 cells. *BMC Biotechnol* 8; 1-13.

Lee FWF, Elias CB, Todd P, Kompala DS. **1998**. Engineering Chinese hamster ovary (CHO) cells to achieve an inverse growth–associated production of a foreign protein,  $\beta$ -galactosidase. *Cytotechnol* 28; 73–80.

Levine B, Sinha S, Kroemer G. **2008**. Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 4; 600-606.

Levine B, Yuan J. **2005**. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Inv* 115; 2679-2688.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D and Darnell J. **2004**. Molecular cell biology. New York: W.H. Freeman. 973 p.

Lu Z, Dono K, Gotho K, Shibata M, Koike M, Marubashi S, Myamoto A, Takeda Y, Nagano H, Umeshita K, Uchiyama, Monden M. **2005**. Participation of autophagy in the degeneration process of rat hepatocytes after transplantation following prolonged cold preservation. *Arch Hystol Cytol* 68;71-80.

Lum J, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB. **2005**. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120; 237–248.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. **2007**. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis, *Nat Rev Mol Cell Biol* 8; 741-752.

Meneses-Acosta A, Mendonça RZ, Merchant H, Covarrubias L, Ramírez OT. **2001**. Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures. *Biotechnol Bioeng* 2 ; 441-457.

Mercille S, Massie B. **1994a**. Induction of apoptosis in oxygen-deprived cultures of hybridoma cells. *Cytotechnol* 15; 117–128.

Mercille S, Massie B. **1994b**. Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnol Bioeng* 44; 1140–1154.

Mercille S, Massie B. **1999**. Apoptosis-resistant E1B-19K-expressing NS/O myeloma cells exhibit increased viability and chimeric antibody productivity under perfusion culture conditions. *Biotech Bioeng* 63; 529-543

Mizushima N. **2007**. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21:2861–2873.

Mizushima N., Yoshimori T. **2007**, How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3; 542-5.

Moore A, Mercer J, Dutina G, Donahue CJ, Bauer DK, Mather JP, Etcheverry T, Ryll T. **1997**. Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures. *Cytotechnol* 23; 47-54.

Murray A, Hunt T. **1993**. The cell cycle. New York: Oxford University Press. 251p.

Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, Yang H, Hild M, Kung C, Wilson C, Myer VE, MacKeigan JP, Porter JA, Wang YK, Cantley LC, Finan PM, Murphy LO. **2009**. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 136; 521–534.

Nishiyama H, Higashitsuji H, Yokoi H, Itoh K, Danno S, Matsuda T, Fujita J. **1997a**. Cloning and characterization of human CIRP (cold-inducible RNA-binding protein) cDNA and chromosomal assignment of the gene. *Gene* 204; 115–120.

Nishiyama H, Itoh K, Kaneko Y, Kishishita M, Yoshida O, Fujita j. **1997b**. A glycine-rich RNA binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth. *J Cell Biol* 137; 899-908.

Ohsaka Y, Ohgiya S, Hoshino T, and Ishizaki K. **2002**. Phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase in human hepatoblastoma cells is transiently increased by cold exposure and further enhanced by subsequent warm incubation of the cells. *Cell Physiol Biochem* 12; 111–118.

Osman JJ, Birch J, Varley J. **2001**. The response of GS-NS0 myeloma cells to pH shifts and pH perturbations. *Biotechnol Bioeng* 75; 63-73.

Ozturk SS. **2006**. Cell Culture Technology—An Overview. en: Ozturk SS, Hu WS, editores. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. New York: Taylor & Francis group. 1-11.

Patil C, Walter P. **2001**. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* 13;349–355.

Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P. **2008**. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochemi* 90; 313-323.

Pavlou AK, Reichert JM. **2004**. Recombinant proteina therapeutics-success rates, market trenes and values to 2010. *Nat Biotechnol* 22; 1513-1519.

Perreault J, Lemieux R. **1994**. Essential role of optimal protein synthesis in preventing the apoptotic death of cultured B-cell hybridomas. *Cytotechnol* 13; 99-105.

Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. **2004**. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 11; 372-80.

Rathmell JC, Kornblut S. **2007**. Filling a GAP(DH) in caspase-independent cell death. *Cell* 129; 861-863.

Rieder CL, Cole RW. **2002**. Cold-shock and the mammalian cell cycle. *Cell Cycle* 1, 169-175.

Ron D. **2002**. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* 110; 1383-1388

Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, Nonoguchi K, Liu Y, Watanabe H, Nakano T, Fukumoto M, Chiba T, Fujita J. **2006**. Cirp protects against tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis via activation of extracellular signal-regulated kinase. *Bioch Biophys Act* 1763; 290-295.

Sauerwald TM, Oyler GA, Betenbaugh MJ. **2003**. study of caspase inhibitors for limiting death in mammalian cell culture. *Biotechnol Bioeng* 81; 332-340.

Schatz SM, Kerschbaumer RJ, Gerstenbauer G, Kral M, Dorner F, Scheiflinger F. **2003**. Higher expression of Fab antibody fragments in a CHO cell line at reduced temperature. *Biotechnol Bioeng*. 84; 433-438.

Scott RC, Juhasz G, Neufeld TP. **2007**. Direct induction of autophagy by atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol* 17;1-11.

Shi M, Xie Z, Yu M, Shen B, Guo N. **2005**. Controlled growth of Chinese hamster ovary cells and high expression of antibody-IL-2 fusion proteins by temperature manipulation. *Biotechnol Lett* 27; 1879-1884.

Sureshkumar GK, Mutharasan R. **1991**. The influence of temperature on a mouse-mouse hybridoma growth and monoclonal antibody production. *Biotechnol Bioeng* 37:292-295.

Singh RP, Al-Rubeai M, Gregory CD, Emery AN. **1994**. Cell death in bioreactors: a role for apoptosis. *Biotechnol Bioeng* 44; 720-726.

Sonna LA, Fujita J, Gaffin SL, Lilly CM. **2002**. Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J Appl Physiol* 92; 1725-1742.

Tan HK, Lee MM, Yap MG, Wang DI. **2008**. Over-expression of cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) increases interferon- $\gamma$  production in CHO cells. *Biotechnol Appl Biochem* 49; 247-257.

Thorburn A. **2008** . Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis*. 13;1–9.

Underhill MF, Marchant MJ, Carden MJ, James DC, Smales CM. **2006**. On the effect of transient expresión of mutated eIF2 $\alpha$  and eIF4E Eukaryotic translation factors on reporter gene expresión in mammalian cells upon Cold-Shock. *Mol Biotechnol* 34; 141-149

Van Cruchten S, Van Den Broeck W. **2002**. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31; 214-23.

Walsh G. **2003**. Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology. New York: John Wiley & Sons. 686 p.

Wang X. **2001**. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15; 2922-33.

Weber W, Fussenegger M. **2007**. Inducible product gene expression technology tailored to bioprocess engineering. *Curr Opin Biotechnol* 18; 399–410

Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. **2008**. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* 30;678–88.

Weidemann R, Ludwig A, Kretzmer G. **1994**. Low temperature cultivation a step towards process optimisation. *Cytotechnol* 15;111–116.

Wurm FM. **2004**. Production of recombinant protein in cultivated mamalian cells. *Nat Biotechnol* 22;1393-1398.

Yoon KS, Hong KJ, Choo HS, Soon YJ, Park HW, Lee GM. **2006a**. Adaptation of chinese hamster ovary cells to low culture temperature: Cell growth and recombinant protein production. *J Biotechnol* 122; 463-472.

Yoon SK, Kim SH, Song JY, Lee GM. **2006b**. Biphasic culture strategy for enhancing volumetric erythropoietin productivity of Chinese hamster ovary cells. *Enz Microb Technol* 39;362-365.

Yoon SK, Kim SH, Lee GM. **2003b**. Effect of Low Culture Temperature on Specific Productivity and Transcription Level of Anti-4-1BB Antibody in Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnol Prog* 19; 1383-1386.

Yoon SK, Song JY, Lee GM. **2003a**. Effect of low culture temperature on specific productivity, transcripci3n level, and heterogeneity of erythropoietin in chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 82; 289-298.

Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L. **2006**. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* 8;1124-32.

Zanghi JA, Fussenegger M, Bailey JE. **1999**. Serum protects protein-free competent chinese hamster ovary cells against apoptosis induced by nutrient deprivation in batch culture. *Biotechnol Bioeng* 64;107-119.