



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Bioquímicas

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Determinación del efecto de la hipotermia moderada sobre la glicosilación del activador de plasminógeno tisular

TESIS

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

PRESENTA:

Q.F.B Alejandra Barrón Hernández

TUTOR PRINCIPAL

**Dra. Norma Adriana Valdez Cruz
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera
Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. Clarita Olvera Carranza
Instituto de Biotecnología, UNAM**

Ciudad de México., 12 enero 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Esta tesis se realizó bajo la tutoría de la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz en su laboratorio, perteneciente al Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México. Los experimentos fueron llevados a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en los laboratorios C-132 y C-036, así como en la Unidad de Bioprocesos (a cargo del Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán). Durante la realización de este proyecto se contó con los apoyos económicos de CONACyT Ciencia Básica 104951-Z, proyecto CONACYT INNOVAPYME-137854, y los proyectos PAPIIT-UNAM IN210419, IN209116, IN 208415, IN-209113, IN28509-3 y 210013-2 otorgados a la Dra. Valdez. También se contó con el apoyo del Programa de Investigación de Producción de Biomoléculas.

Se agradece al Programa en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca nacional número CVU 819168.

Se contó con el soporte de la Técnico M.C. Vanessa Hernández Rodríguez y de la Dra. Laura Palomares del Instituto de Biotecnología para la obtención de datos de glicosilación. Así como de la Dra. Angélica Vargas en la realización de experimentos de cuantificación de transcritos del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Se agradece el amable préstamo de oligonucleótidos al Dr. Tonatiuh Ramírez del Instituto de Biotecnología.

Se contó con el apoyo de las Dras. Laura Alicia Palomares y Clarita Olvera, como miembros del Comité Tutor, que aportaron su tiempo y críticas durante la discusión de los resultados para la culminación de la presente tesis.

Otros Agradecimientos

Se agradece a la Dra. Paola Toledo Ibelles, Inolab Especialistas en Servicio S.A. de C.V. y GE Healthcare Life Sciences por su apoyo en la obtención de medios de cultivo y a Sartorius De México, S.A. De C.V. por su soporte técnico.

Agradecimientos Personales:

A mi papá y a mi mamá por estar conmigo, apoyarme y brindarme todo lo necesario en todo momento.

A Karlo, por acompañarme siempre sin importar cuan largos fueran los seminarios o experimentos, siempre con una palabra de aliento o un poco de comida para animarme.

Sin ustedes, esto no hubiera sido posible.

INDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN.....	12
2.	ANTECEDENTES	14
2.1.	<i>Uso de Células de Ovario de Hámster Chino para la Producción de Medicamentos Biotecnológicos.....</i>	<i>14</i>
2.2.	<i>Glicosilación y su Relevancia en la Producción de Medicamentos Biotecnológicos</i>	<i>5</i>
2.2.1.	<i>Glicosilación.....</i>	<i>5</i>
2.2.2.	<i>N-Glicosilación.....</i>	<i>8</i>
2.2.3.	<i>Glicosilación y Medicamentos de Biotecnológicos.....</i>	<i>15</i>
2.3.	<i>Efecto de la Hipotermia Moderada Sobre la Productividad y Glicosilación de Proteínas Recombinantes Producidas en Células CHO.....</i>	<i>17</i>
2.3.1.	<i>Respuesta al Estrés por Frio en células de mamífero</i>	<i>18</i>
2.3.2.	<i>La Hipotermia Moderada y su Relación con la Producción de Proteínas Recombinantes Producidas en Células CHO.....</i>	<i>21</i>
2.3.3.	<i>Causas del aumento de la productividad con la disminución de la temperatura</i>	<i>26</i>
2.4.	<i>Efecto de la Hipotermia Moderada sobre la Glicosilación del el Activador de Plasminógeno Tisular³¹</i>	
2.4.2.	<i>Glicosilación del Activador del Plasminógeno Tisular</i>	<i>34</i>
2.4.3.	<i>Hipotermia moderada y su efecto en la glicosilación del activador de plasminógeno tisular recombinante producido en células CHO.....</i>	<i>35</i>
3.	HIPÓTESIS.....	40
4.	OBJETIVOS	40
4.1	<i>Objetivo General.....</i>	<i>40</i>
4.2	<i>Objetivos Específicos</i>	<i>40</i>
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
7.	CONCLUSIONES.....	88
8.	PERSPECTIVAS.....	89
9.	REFERENCIAS	90
10.	Anexos.....	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Uso relativo de líneas celulares de producción de mamíferos versus no mamíferas en la fabricación de productos biofarmacéuticos aprobados en los períodos indicados.

Figura 2. Tipos de enlaces carbohidrato-proteína

Figura 3. Tipos de N-glicanos.

Figura 4. Síntesis de dolichol-P-P-GlcNAc₂Man₉Glc₃.

Figura 5. Procesamiento y maduración de un N-glicano.

Figura 6. Diferencias en la N-glicosilación producida en los sistemas de expresión de uso común.

Figura 7. Molécula de t-PA

Figura 8. Fibrinólisis. Mecanismo de acción del activador de plasminógeno tisular

Figura 9. Efecto de la hipotermia moderada sobre la concentración y viabilidad celular

Figura 10. Efecto de la Hipotermia Moderada en el consumo/producción de metabolitos en células CHO TF70R productoras de rh-tPA

Figura 11. Efecto de la Hipotermia Moderada en el consumo de oxígeno en células CHO TF70R productoras de rh-tPA.

Figura 12. Efecto de la hipotermia moderada sobre la productividad volumétrica del rh-tPA.

Figura 13. Perfil del rh-tPA comercial en electroforesis y Western Blot

Figura 14. Cromatograma de las muestras de rh-tPA purificado mediante cromatografía de afinidad.

Figura 15. Perfil del rh-tPA purificado en electroforesis y Western Blot.

Figura 16. Cromatograma comparativo de las de las muestras de rh-tPA purificado de los cultivos control a 37°C, los cultivos bifásicos a 30°C, y el rh-tPA comercial Acetilyse de Boehringer Ingelheim, obtenido mediante cromatografía en HPLC fase reversa.

Figura 17. Perfil del rh-tPA purificado (colectado de la separación mediante RP-HPLC) en electroforesis y Western Blot

Figura 18. Perfil comparativo rh-tPA purificado de ambas condiciones de temperatura, rh-tPA comercial y sobrenadante sin purificar mediante electroforesis y Western Blot.

Figura 19. Integridad y pureza del RNA_{tot}.

Figura 20. Resumen de la acción de las enzimas (expresión evaluada mediante RT-qPCR sobre la glicosilación de la proteína.

Figura 21. Cromatograma comparativo de las muestras de rh-tPA de los cultivos control a 37°C y los cultivos bifásicos a 30°C.

Figura 22. Representación de las estructuras propuestas en la tabla 19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de los sistemas de producción para proteínas farmacéuticas humanas recombinantes

Tabla 2. Tipos de glicanos de acuerdo con su estructura y tipo de enlace en el glicoconjugado

Tabla 3. Papel potencial y efecto de la glicosilación de las proteínas.

Tabla 4. Factores que afectan la glicosilación

Tabla 5. Respuestas coordinadas al estrés por frío en células de mamífero.

Tabla 6. Efecto de la hipotermia moderada en la productividad de proteína recombinante en líneas celulares CHO.

Tabla 7. Mecanismos propuestos para el incremento en la producción de proteínas recombinantes

Tabla 8. Ejemplos de estudios que observaron los diferentes mecanismos involucrados en el incremento de proteína recombinante bajo hipotermia moderada en cultivos de células CHO

Tabla 9. Reportes del efecto de la disminución de la temperatura sobre la glicosilación de proteínas recombinantes.

Tabla 10. Sistemas de producción de rh-tPA reportados.

Tabla 11. Resumen de la Glicosilación del rh-tPA.

Tabla 12. Efecto de la hipotermia moderada en rh-tPA

Tabla 13. Parámetros obtenidos de la cinética de las células cultivadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL a 37°C (control) y el cultivo bifásico (37°C a 30°C).

Tabla 14. Tabla comparativa de valores de concentración celular máxima, viabilidad, μ , tiempo de duplicación, productividad volumétrica y específica reportados y obtenidos en este trabajo para la línea celular CHO TF70R productora de rh-tPA en cultivos tipo batch.

Tabla 15. Producción/consumos específicos de metabolitos por las células cultivadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL a 37°C (control) y el cultivo bifásico (37°C a 30°C).

Tabla 16. Producción volumétrica y específica de rh-tPA de las células cultivadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL a 37°C (control) y el cultivo bifásico (37°C a 30°C).

Tabla 17. Concentración de rh-tPA en las condiciones control a 37°C y los cultivos bifásicos (de 37°C a 30°C a las 48 h) obtenido en cada paso de purificación

Tabla 18. Veces de cambio de los genes diferenciamente expresados debido a la respuesta al cambio de temperatura (de 37°C a 30°C a las 48 h) determinada por RT-qPCR.

Tabla 19. Estructuras propuestas de oligosacáridos ligados a N a rh-tPA producido bajo diferentes condiciones de temperatura (Control 37°C y cultivo bifásico a 30°C).

Tabla 20. Porcentaje relativo de estructuras propuestas por grupos característicos del rh-tPA producido a 37°C y en los cultivos bifásicos de 37 a 30°C.

Tabla 21. Oligonucleótidos usados para el análisis transcripcional.

NOMENCLATURA Y ABREVIATURAS

Asn: Asparagina

BHK: Células de riñón de hámster

CHO: Células de Ovario de Hámster Chino

CIRP: Cold inducible RNA binding Protein

CSPs: Cold-shock proteins

cDNA: DNA complementario

DHFR: Dihidrofolato Reductasa

DMI: Diabetes mellitus tipo I

DMII: Diabetes mellitus tipo II

Dol-P: Fosfato de Dolicol

EGF: Factor de Crecimiento Epidermal

EPO: Eritropoyetina

Gal: Galactosa

GalA: Ácido Galacturónico

GalNAc: N-Acetilgalactosamina

GalN: Galactosamina

GHT: Glicina, hipoxantina y timidina

Glc: Glucosa

GlcA: Ácido Glucurónico

GlcNAcTs: N-acetilglucosaminiltransferasas

E. coli: *Escherichia coli*

FDA: US Food and Drug Administration

FRhL-2: Células de mono

FSH: Hormona estimuladora folicular

Fuc: Fucosa

HIC: Cromatografía de interacción hidrofóbica

HSPs: Heat-shock proteins

HCPs: Host cell proteins

IRESs: Internal ribosome entry segments

mAbs: Anticuerpos Monoclonales
Man: Manosa
ManA: Ácido Manurónico
ManNAc: N-Acetilmanosamina
ManN: Manosamina
MTX: Metrotrexato
MERS-CoV: Síndrome Respiratorio del Medio Oriente
MPT: Modificaciones post-traduccionales
Neu5Ac: Acido N-Acetilneuraminico
Neu5Gc: Acido N-Glicolilneuraminico
OST: Oligosacariltransferasa
P. pastoris: *Pichia pastoris*
PR: Proteínas Recombinantes
PDI: proteína disulfuro isomerasa
qP: Productividad específica
rDNA: DNA recombinante
rh-tPA: Proteína activadora de plasminógeno tisular recombinante
RBP: "RNA binding proteins"
RBM3: RNA binding protein
RE: Retículo Endoplasmático
SEAP: Fosfatasa alcalina embrionaria secretada
Ser: Serina
t-PA: Activador del Plasminógeno Tisular
TDS: Hipotermia moderada
THF: Tetrahidrofolato
Thr: Treonina
TRP: Transient Receptor Potencial
UV: Luz ultravioleta
Xyl: Xilulosa

RESUMEN

La hipotermia moderada (30 a 34°C) ha sido considerada como una estrategia para incrementar la productividad de glicoproteínas recombinantes terapéuticas en líneas celulares de ovario de hámster chino, sin embargo, existe la preocupación del efecto que puede tener en el patrón de glicosilación de la proteína resultante.

En este trabajo se evaluó el efecto de la hipotermia moderada sobre el metabolismo, la productividad, la expresión de genes relacionados con la glicosilación y la glicosilación final del activador de plasminógeno tisular recombinante producido en la línea celular CHO TF70R cultivada en condiciones bifásicas (cambio de temperatura de 37°C a 30°C a las 48h de cultivo).

De manera general, la hipotermia moderada disminuyó la concentración celular viable, retrasó la caída de la viabilidad, disminuyó la actividad metabólica y aumentó la productividad específica del rh-tPA (18%). Para el caso de las células en el cultivo control (37°C), se observó una concentración celular máxima de $13.18 \pm 0.55 \times 10^6$ células/mL, una viabilidad mayor al 90% durante 7 días de cultivo y productividad de 1.61 ± 0.02 pg/cel/día. Para el caso de las células en el cultivo bifásico (30°C), se observó la concentración celular máxima viable de $2.85 \pm 0.12 \times 10^6$ células/mL, viabilidad mayor al 90% durante 14 días de cultivo y productividad específica de 1.89 ± 0.01 pg/cel/día.

En el cultivo bifásico se disminuyó el consumo específico de glucosa y glutamina en 1.1 y 2.43 veces respectivamente, mientras que la producción específica de lactato y amonio disminuyó 1.06 y 1.07 veces respectivamente a comparación del cultivo control.

El análisis transcripcional mostró que, para el caso de las células cultivadas en hipotermia moderada, hubo un incremento en la expresión de proteínas de choque frío CIRP y RBM3 de 9.87 y 9.50 veces respectivamente, indicando la presencia del estrés ocasionado por la disminución de la temperatura. Para el caso de enzimas relacionadas con la N-glicosilación, se observó un aumento en la expresión las glicosiltransferasas

B4galt1 y St3gal4 (4.31 y 2.35 veces respectivamente), 4.12 veces para el transportador de UDP galactosa y 7.43 veces para la glicosidasa Man1A2, mientras que para el caso de la expresión de las glicosidasas Neu2, Glb1 y el transportador de CMP ácido siálico disminuyó 1.81, 1.80 y 1.14 veces respectivamente a comparación con las células de los cultivos control.

Debido a que la calidad y, por lo tanto, la eficacia de la proteína recombinante podría verse afectada por la disminución de la temperatura y correlacionando los hallazgos encontrados en la expresión de enzimas relacionadas con la N-glicosilación, se analizó el patrón de glicosilación de la proteína producida en ambas condiciones de cultivo mediante el uso de cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC). No se observaron diferencias importantes en el porcentaje relativo de estructuras de glicanos en el rh-tPA producido en los cultivos control y el producido en los cultivos bifásicos por lo que se concluyó que la disminución de la temperatura no altera el perfil de glicosilación de rh-tPA, incluyendo el grado de sialilación terminal.

Estos resultados revelaron que la estrategia empleada tuvo un efecto positivo sobre la productividad específica de las células CHO-TF70R sin afectar la calidad del producto, lo que representa un procedimiento efectivo para el proceso de producción de rh-tPA.

1. INTRODUCCIÓN

Los sistemas basados en células de ovario de hámster chino (CHO) siguen siendo, por mucho, la línea celular de mamífero más usada ya que son capaces de realizar modificaciones post traduccionales eficientes produciendo proteínas recombinantes con glicofomas que son compatibles y bioactivas en humanos (Tripathi., *et al.*, 2019; Owczarek, *et al.*, 2019; Butler, 2005; Dinnis, *et al.* 2005; Jenkins, *et al.*, 1996; Jenkins, *et al.*, 1992; Jayapal, *et al.*, 2006; Kim, *et al.*, 2012).

Aproximadamente el 50% de las proteínas recombinantes terapéuticas aprobadas en los Estados Unidos y la Unión Europea son glicoproteínas y el 84% de estas (57 de los 68 de los anticuerpos aprobados de enero 2014 a Julio del 2018) se producen en sistemas de células CHO (Kim, *et al.*, 2012; Walsh, 2014 y 2018), es por esta razón que se requieren procesos altamente productivos y eficientes asegurando a su vez patrones de glicosilación uniformes para generar medicamentos biotecnológicos con calidad, eficacia reproducible y consistente.

La hipotermia moderada (TDS, 30-34 °C) ha sido usada como estrategia para incrementar los rendimientos en la producción de proteínas recombinantes terapéuticas en los cultivos de células CHO (Wulhfard, *et al.*, 2008). En cultivos de células CHO, las cuales inicialmente crecen a 37°C, al ser expuestos a una temperatura de 30°C durante la fase de crecimiento exponencial, resulta en un incremento entre 1.3 hasta 4.7 veces más en la productividad específica (qp) de proteína recombinante, y un incremento de 1.2 a 3.8 veces en la productividad volumétrica, también hay un incremento de la viabilidad celular de las células crecidas a 30°C con respecto a las obtenidas a 37°C (Marchant, *et al.*, 2008, Ahn, *et al.*, 2008, Nam, *et al.*, 2008, Wulhfard, *et al.*, 2008, Trummer, *et al.*, 2006, Shi, *et al.*, 2005, Fox, *et al.*, 2004, Fox, *et al.*, 2005, Bollati-Fogollin, *et al.*, 2004, Yoon., *et al.*, 2004, Kaufmann., *et al.*, 1999, Furukawa., & Ohsuye., 1999, Rodríguez., *et al.* 2005, Henniscke, *et al.*, 2019, Aghamohseni., *et al.* 2017, Hendrick., *et al.*, 2001, Vergara., *et al.*, 2015).

La mayoría de los reportes realizados han sido enfocados en el beneficio que tiene la disminución de la temperatura sobre la viabilidad y productividad de proteínas recombinantes, sin embargo, muy pocos reportes se han enfocado en el efecto que tiene la disminución de la temperatura sobre la glicosilación (Ahn, *et al.*, 2008, Nam, *et al.*, 2008, Trummer, *et al.*, 2006, Galbraith., *et al.*, 2006, Hennicke, *et al.*, 2019, Aghamohseni., *et al.* 2017, Sou., *et al.* 2015 y 2017).

El efecto de la hipotermia moderada en los patrones de glicosilación son dependientes de la línea celular, tipo de proteína y temperatura estudiada por lo que no solo se verá afectado por los mecanismos genéticos y moleculares intrínsecos de la célula huésped, sino también por las condiciones de cultivo y el estado metabólico celular, lo cual explica algunas observaciones contradictorias encontradas en la literatura (Ahn., *et al.* 2008; Bollati-Fogolín., *et al.* 2005; Rodríguez., *et al.* 2005; Serrato., *et al.* 2007).

En el caso del activador de plasminógeno tisular recombinante, además de reportar que la línea celular CHO TF70R bajo condiciones de hipotermia moderada incrementa su productividad volumétrica y/o específica (Hendrick., *et al.* 2001, Vergara., *et al.* 2009, 2012, 2014 y Bedoya., *et al.*, 2016), un estudio transcriptómico describe que bajo hipotermia moderada hay cambios en la expresión de enzimas relacionadas con la glicosilación de proteínas (Bedoya, *et al.*, 2016) y otro reporte que evaluó la glicosilación del rh-tPA mediante el uso de lectinas sugiere cambios en la mannosilación del mismo (Hendrick, *et al.*, 2001), es por esto, que en este proyecto se pretende evaluar si el patrón de glicosilación se ve afectado por la disminución en la temperatura en un modelo de células CHO TF70R productoras de rh-tPA.

Mediante el uso de qPCR, y HILIC se estudió el efecto de la TDS (cultivos control a 37°C y cultivos bifásicos a 30°C) sobre la expresión de 7 genes relacionados con la glicosilación y sobre el patrón de glicosilación final de la proteína rh-tPA con el objetivo de poder tener un mejor entendimiento del uso de la TDS a favor de una mayor producción de rh-tPA con calidad consistente (perfil de glicosilación homogéneo y deseado) y poder implementar así esta útil y económica herramienta de cultivo para la optimización de procesos industriales.

2. ANTECEDENTES

2.1. Uso de Células de Ovario de Hámster Chino para la Producción de Medicamentos Biotecnológicos

A mediados de 1970 se inició el desarrollo de la ingeniería genética basada en la tecnología de DNA recombinante que marcó a su vez, el comienzo de la industria biotecnológica actual (Berg, *et al.*, 1975). Mediante la tecnología de DNA recombinante ha sido posible modificar genéticamente diversos tipos de células que actúan como “reactores” biológicos, capaces de sintetizar biofármacos con aplicaciones terapéuticas basados en proteínas recombinantes (PR) (Drago, *et al.*, 2006). La tecnología de DNA recombinante ha tenido impacto positivo sobre la producción de PR:

- *Supera el problema de disponibilidad de fuente del producto:* Muchas proteínas con potencial terapéutico son producidas naturalmente por el cuerpo en cantidades minoritarias. Algunos ejemplos incluyen interferones, interleucinas y factores estimuladores de colonia. Esto hizo poco práctico su extracción directa del material de origen nativo en cantidades suficientes para satisfacer la probable demanda clínica. La producción recombinante permite la fabricación de cualquier proteína en cualquier cantidad que se requiera.
- *Supera el problema de seguridad del producto:* En el pasado la extracción directa del producto de algunas fuentes biológicas ha llevado a la transmisión involuntaria de enfermedades como hepatitis B, C y VIH.
- *Proporciona una alternativa a la extracción directa de material inapropiado o peligroso:* Un número de proteínas terapéuticas han sido extraídas de la orina humana, como por ejemplo la hormona foliculoestimulante (FHS), obtenida de la orina de mujeres post- menopáusicas, mientras que una hormona relacionada, la hormona Gonadotropina coriónica humana (hCG), es extraída de la orina de mujeres embarazadas. La orina no es considerada como una fuente particular de productos biofarmacéuticos.

- *Facilita la generación de proteínas terapéuticas diseñadas que muestran alguna ventaja clínica sobre el producto proteico nativo (Walsh, 2013)*

Los medicamentos biotecnológicos tienen características diferenciales en origen, producción, estructura química, propiedades farmacéuticas y farmacológicas. Los medicamentos biotecnológicos son producidos por organismos genéticamente modificados e incluyen pequeñas moléculas como: algunos antibióticos, vitaminas, aminoácidos y esteroides; también se producen macromoléculas como: proteínas que intervienen en procesos de coagulación, anticuerpos y vacunas, por mencionar algunos ejemplos (Matar, 2009).

Los sistemas de expresión para la obtención de medicamentos biotecnológicos se basan en vectores que permiten la clonación del gen que codifica la proteína de interés en una célula hospedera como: bacterias, hongos, plantas y animales (las ventajas y desventajas de cada sistema se incluyen en la tabla 1)

Desde enero 2014 a Julio 2018 han sido aprobados 155 medicamentos biotecnológicos en USA y/o la UE. Con estas nuevas aprobaciones, el número de medicamentos biotecnológicos individuales que obtuvieron una licencia en estas regiones ahora asciende a 374, que contienen 285 ingredientes biotecnológicos activos distintos. (Walsh, 2018). Desde ese mismo año hasta la fecha la FDA (US Food and Drug Administration) ha autorizado más medicamentos biotecnológicos que fármacos químicos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, enfermedades autoinmunes e infecciosas, y otras. De hecho, el mercado de los medicamentos biotecnológicos ha ido en aumento, en el 2013 se ganó un total de \$140 mil millones de pesos por estos productos (Walsh, 2014).

Tabla 1. Comparación de los sistemas de producción para proteínas farmacéuticas humanas recombinantes (Tripathi., *et al.*, 2019; Owczarek, *et al.*, 2019., Yao, *et al.* 2015; Sweich, *et al.* 2012, Walsh, 2013, Ikononou, L., *et al.*, 2003).

Sistema	Costo total	Tiempo de producción	Capacidad de Producción Nivel de Expresión	Glicosilación	Riesgos de Contaminación	Ventajas	Desventajas
<i>Bacteria</i>	Bajo	Corto	Alto	Ninguna	Endotoxinas	-Biología molecular bien caracterizada (<i>E.coli</i>) -Altos niveles de expresión -Crecimiento rápido -Medios relativamente simples y baratos	-Acumulación intracelular de proteínas -Presencia de lipopolisacárido en su superficie -Ausencia de glicosilación
<i>Hongo</i>	Medio	Medio	Alto Bajo-Alto	Alta Manosilación	Bajo Riesgo	-Fácil manipulación genética -Mayoría de organismos seguros -Rápido crecimiento y medios no costosos	-Diferente patrón de glicosilación respecto al de la glicoproteína nativa -En la mayoría, nivel de expresión <5% proteína total
<i>Insecto</i>	Alto	Medio	Medio Bajo-alto	Alta Manosilación	Bajo Riesgo	-Cultivo relativamente fácil -Buen plegamiento de proteínas	- Tasa de crecimiento lenta y alto costo de producción -Diferente patrón de glicosilación al producido en humanos
<i>Células de Plantas</i>	Bajo	Corto	Alto Moderado-Alto	Diferencias menores (fucosa y Xilosa)	Bajo Riesgo	-Bajo costo producción -Equipos y metodologías baratos y bien establecidos -Proteínas expresadas en semillas generalmente estables durante períodos prolongados de tiempo -Libres de patógenos humanos (por ejem., VIH)	-Niveles de expresión variables / bajos. -Posible silenciamiento de genes post-traduccionales. - Diferente patrón de glicosilación al producido en humanos -Naturaleza estacional / geográfica del crecimiento de las plantas
<i>Células de Mamífero</i>	Alto	Largo	Muy Bajo Bajo-Moderado	Similar a la humana	Virus, priones y DNA oncogénico	- Modificaciones post-traduccionales de las proteínas similares a las humanas - Buen plegamiento de proteínas	-Requerimientos nutricionales complejos. -Crecimiento lento y susceptible al daño físico

Una tendencia que continua es la mayor importancia de los sistemas de expresión de mamíferos sobre los no mamíferos utilizados para producir productos biotecnológicos aprobados. De hecho, la tendencia hacia las líneas celulares de mamíferos se ha acelerado dramáticamente en los últimos tres o cuatro años. Sesenta y dos de los 71 ingredientes activos biofarmacéuticos genuinamente nuevos que han salido al mercado del 2014 al 2018 son proteínas recombinantes. De ellos, 52 (84%) se expresan en líneas celulares de mamíferos, uno (Kanuma, sebelipasa alfa) se expresa en un sistema transgénico de mamíferos y los nueve restantes se producen utilizando *Escherichia coli* (cinco productos) o levadura (cuatro productos producidos en *S. cerevisiae*). El aumento en la producción basada en mamíferos no es sorprendente, dadas las numerosas aprobaciones recientes de productos de mAb y factor de coagulación, con ambas clases de productos con modificaciones postraduccionales y, por lo tanto, que requieren sistemas de expresión de mamíferos (Walsh., 2018).

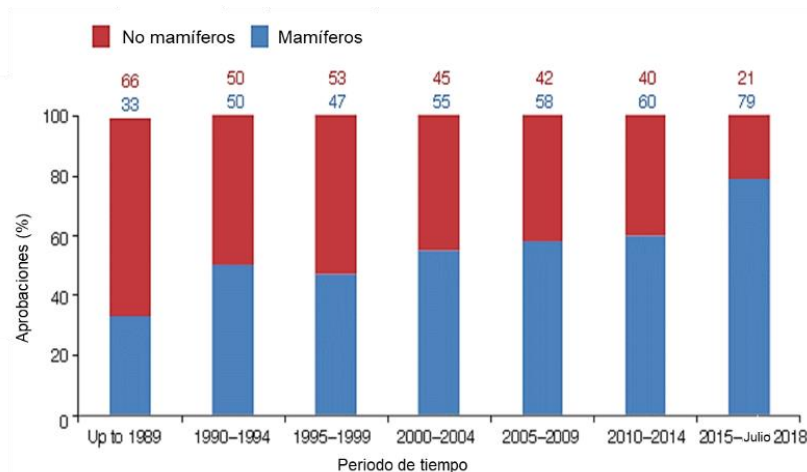


Figura 1. Uso relativo de líneas celulares de producción de mamíferos versus no mamíferas en la fabricación de productos biofarmacéuticos aprobados en los períodos indicados. Cada conjunto de datos se expresa como un porcentaje del total de aprobaciones de productos biofarmacéuticos para el período en cuestión (Adaptado de Walsh, 2018).

Los sistemas basados en células de ovario de hámster chino (CHO) siguen siendo la línea celular de mamífero más usada; el 84% (57 de los 68 productos de mAb aprobados de enero 2014 a Julio del 2018) se producen en sistemas CHO, y el resto de los

anticuerpos aprobados se producen en células NS0 (nueve productos) o células Sp2 / 0 (dos productos) (Kim, *et al.*, 2012; Walsh, 2014 y 2018).

Las células CHO son el sistema preferido para la producción de glicoproteínas recombinantes de uso terapéutico a gran escala debido a que presentan un crecimiento rápido (Puck, *et al.* 1958), pueden ser transfectadas con facilidad, han demostrado seguridad desde las pasadas dos décadas, pueden ser fácilmente adaptables al crecimiento en condiciones de suspensión libre de suero, fácilmente manejables (lo cual es una característica preferida para el cultivo de biorreactores a gran escala), los virus patógenos humanos como VIH, influenza, polio, herpes y sarampión no pueden replicarse en las células CHO y son capaces de realizar modificaciones post traduccionales eficientes produciendo proteínas recombinantes con glicoformas que son compatibles y bioactivas en humanos (Tripathi., *et al.*, 2019; Owczarek, *et al.*, 2019; Butler, 2005; Dinnis, *et al.* 2005; Jenkins, *et al.*, 1996; Jenkins, *et al.*, 1992; Jayapal, *et al.*, 2006; Kim, *et al.*, 2012). Además, esta línea junto con las de mieloma de ratón NS0 y SP2/0, han sido clasificadas como nivel de bioseguridad 1 por las autoridades federales suizas como la Oficina Federal del Ambiente (FOEN por sus siglas en inglés), lo cual implica la ausencia de riesgo o riesgo insignificante para la salud humana y el ambiente (Keller, 2007).

2.2. Glicosilación y su Relevancia en la Producción de Medicamentos Biotecnológicos

2.2.1. Glicosilación

La glicosilación tiene una influencia sustancial en las propiedades físicas y funcionales de las glicoproteínas recombinantes, y es uno de los atributos de calidad críticos más importantes para la eficacia y seguridad óptimas de un producto biofarmacéutico. (Matar., 2008; Butler & Spearman, 2014) y consiste en la adición covalente de carbohidratos a secuencias consenso dentro de las proteínas, en un proceso enzimático tipo célula, tejido y sitio específico (Varki., *et al.* 2017). Numerosos factores pueden afectar la glicosilación, incluyendo la línea celular, la estructura proteica en sí, los componentes del medio y las condiciones de cultivo (Butler., & Spearman, 2014). Una

misma proteína puede presentar diferentes tipos de enlaces carbohidrato-péptido como los mostrados en la Figura 2 (Varki., *et al.* 2017).

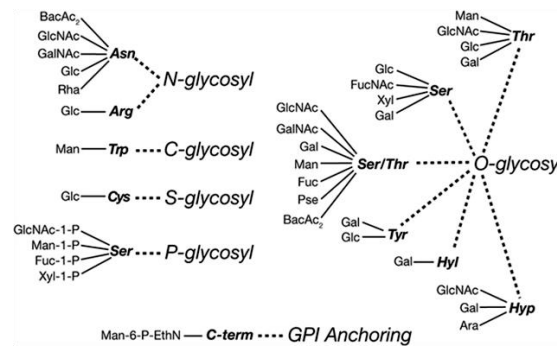


Figura 2. Tipos de enlaces carbohidrato-proteína (Tomado de Varki., *et al.* 2017).

La composición de carbohidratos de las glicoproteínas revela la presencia de una gran variedad de azúcares, incluyendo D-galactosa, D-manosa y L-fucosa (azúcares neutros), amino azucares como N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina, y azúcares ácidos, como por ejemplo el ácido siálico (Varki., *et al.* 2017). Se identifican distintos tipos de glicanos de acuerdo con su estructura y tipo de enlace en el glicoconjugado:

Tabla 2. Tipos de glicanos de acuerdo con su estructura y tipo de enlace en el glicoconjugado

Tipo de Enlace	Características
O-glicanos (Higel, <i>et al.</i> , 2019)	La cadena lateral de azúcar está unida mediante el grupo hidroxilo de serina o treonina, o a veces aminoácidos modificados tales como hidroxilisina
N-glicanos (Higel, <i>et al.</i> , 2019)	La unión es a través del grupo amino de la asparagina
C-glicanos (Liao, <i>et al.</i> , 2018)	Es una forma rara de glicosilación donde el azúcar es unido al carbón del triptófano
Fosfo-glicanos (Haynes., 1998)	Unidos a la proteína a través del fosfato de una fosfo-serina
Proteoglicanos (Yanagishita, <i>et al.</i> , 1993)	Unión de glicosaminoglicanos a proteínas, los cuales también se pueden encontrar en forma libre.
Glipidación (Ikezawa., <i>et al.</i> , 2002)	Unión covalente de un glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) de las proteínas para su anclaje a los lípidos de membrana a través de un enlace glicano.

Las glicosiltransferasas y las glicosidasas son responsables del ensamblaje, el procesamiento y la renovación de los glicanos (Varki., *et al.* 2017). Aproximadamente el 1% de los genes del genoma de los mamíferos están involucrados en la producción o modificación de glicanos. Se conocen casi 200,000 secuencias de glicosiltransferasas

en todos los reinos, y comprenden aproximadamente 97 familias de glicosiltransferasas como se definidas por la secuencia primaria (Varki., *et al.* 2017).

Una glicoproteína puede tener más de un sitio de N-glicosilación por lo que se han definido dos términos primordiales, los cuales son: *la macroheterogeneidad*, la cual se refiere a los sitios potenciales de N-glicosilación ocupados, y la *microheterogeneidad*, la cual se refiere a los motivos estructurales y composición de monosacáridos que conforman la glicosilación (Matar, 2008; Varki., *et al.* 2017).

Así, dependiendo de la estructura del oligosacárido y de la proteína a la cual esté unido, la glicosilación participa en funciones como: adhesión y reconocimiento celular, señalización, evita la desnaturalización y proteólisis, participa en procesos de transporte a través de la vía secretoria, puede proporcionar hidrofiliidad y carga negativa, reduciendo así las interacciones intermoleculares inespecíficas en los espacios extracelulares (Jayaprakash & Surolia, 2017). Los glicanos tienen muchas funciones protectoras, estabilizadoras, organizativas y de barrera, además están implicados en el plegado apropiado de polipéptidos recién sintetizados en el retículo endoplasmático (RE) o en el subsiguiente mantenimiento de la solubilidad y conformación de la proteína (Varki., *et al.* 2017; Rudd., *et al.* 2001). De hecho, si algunas proteínas están incorrectamente glicosiladas, no se pliegan adecuadamente y/o salen del RE, siendo consignadas en su lugar a la degradación en proteosomas. Esto puede ser explicado ya que el plegamiento correcto y en ensamble controlado glicoproteínas requiere de interacciones coordinadas con chaperonas y enzimas (Tabla 3) (Varki., *et al.* 2017; Rudd., *et al.* 2001).

Tabla 3. Papel potencial y efecto de la glicosilación de las proteínas (Adaptada de Walsh., *et. al.* 2006).

Papel/Efecto	Comentario
Plegamiento de la proteína	La glicosilación puede afectar la estructura secundaria de la proteína local y ayudar al plegamiento directo de la cadena polipeptídica.
Orientación / tráfico de proteínas	El glicocomponente puede participar en la clasificación / dirección de una proteína para su destino final.
Reconocimiento/unión de ligando	El contenido de carbohidratos de los anticuerpos, por ejemplo, funciona en la unión de anticuerpos (Fc) a los monocitos y la interacción con el componente del complemento C1q.
Actividad biológica	La cadena lateral de carbohidratos de las gonadotropinas (específicamente la cadena lateral N ⁵² de la subunidad α) es esencial para la activación de la transducción de señales de gonadotropinas.
Estabilidad	Las cadenas laterales de azúcar pueden estabilizar una glicoproteína de varias maneras, incluida la mejora de su solubilidad, la protección de parches hidrófobos en su superficie, la protección de la proteólisis y la participación directa en las interacciones de estabilización intracadena.
Regulación del tiempo de vida media	Grandes cantidades de ácido siálico pueden aumentar la vida media plasmática de una glicoproteína. La exposición a los residuos de galactosa puede disminuir la vida media plasmática al promover la captación a través de los residuos de galactosa hepáticos. La N-glicosilación de levadura es de tipo alto en manosa, lo que conduce a una rápida eliminación de la circulación a través de los receptores de manosa.
Inmunogenicidad	Algunos motivos de glicosilación característicos de las glicoproteínas derivadas de plantas (que a menudo contienen residuos de fucosa y xilosa) son altamente inmunogénicos en los mamíferos.

Fc: Fracción constante

N⁵²: Asparagina 52

2.2.2. N-Glicosilación

El tipo de glicosilación más estudiado e importante para las glicoproteínas recombinantes de uso terapéutico es la N-glicosilación ya que esta participa en el plegamiento y la actividad de las proteínas (Jenkins., *et al.* 1996; Walsh., & Jefferis., 2006; Helenius., & Aebi., 2001), por lo que, para poder garantizar la estabilidad y eficacia de las glicoproteínas terapéuticas, la industria biotecnológica se ha interesado en mantener consistencia en el perfil de N-glicosilación de sus productos.

Un N-glicano es una cadena de azúcar unida covalentemente a una asparagina (Asn) de una cadena polipeptídica por un enlace N-glicosídico, implicando comúnmente un residuo de GlcNAc y la secuencia de péptido consenso: Asn-X-Ser/Thr, donde X representa cualquier aminoácido excepto prolina. Todos los N-glicanos comparten una región central de polisacárido común (Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn-X-Ser / Thr) y

se pueden dividir generalmente en tres clases principales como se puede observar en la Figura 3 (Varki, *et al.*, 2009 y Varki., *et al.* 2017):

1. **Tipo oligomanosa (o alta manosa):** Estructuras que contienen entre 5 y 9 unidades de manosa unidas al núcleo principal.
2. **Tipo complejo:** Residuos de manosa unidos con enlaces $\alpha 1,3$ y $\alpha 1,6$ en el núcleo son sustituidos por GlcNAc.
3. **Tipo híbrido:** Solo los restos de manosa que están unidas al brazo Man $\alpha 1-6$ del núcleo y una o dos antenas están en el brazo Man $\alpha 1-3$ son sustituidos por GlcNAc (Varki, *et al.*, 2009; Varki., *et al.* 2017).

Las glicoproteínas humanas además presentan fucosa o ácido siálico en los extremos terminales de algunos N-oligosacáridos, siendo los procesos de fucosilación y siliación los que indican el término de la extensión de la cadena (Varki, *et al.*, 2009).

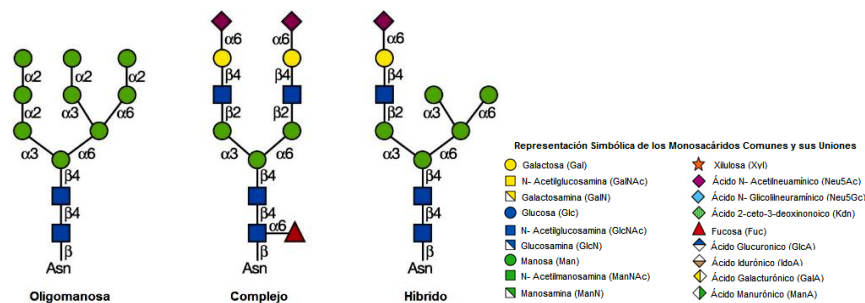


Figura 3. Tipos de N-glicanos. Los N-glicanos añadidos a la proteína en las secuencias Asn-X-Ser/Thr son de tres tipos generales en una glicoproteína madura: oligomanosa, compleja e híbrida. Cada N-glicano contiene el núcleo común $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ (Adaptada de Varki, *et al.*, 2009).

Biosíntesis de N-glicanos

La vía principal de N glicosilación está conservada en todos los eucariontes (también se ha observado en arqueobacterias y eubacterias); el mayor grado de diversificación estructural de una glicoproteína se da en el aparato de Golgi.

La biosíntesis de N-glicanos ocurre en dos fases y en dos compartimentos de células eucariotas, el RE y el Golgi. La primera fase es una vía altamente conservada que avanza en la membrana del RE en el portador de lípidos Dol-P. Un oligosacárido ensamblado en Dol-P se transfiere a Asn en secuencias seleccionadas de Asn-X Ser /

Thr de proteínas secretoras y de membrana durante su translocación al RE. La segunda fase comienza con el procesamiento de N-glicanos por glicosidasas y glicosiltransferasas en la luz del RE y continúa en el Golgi de una manera específica de especie, tipo celular, proteína e incluso sitio específico. Muchas de las glicosidasas y glicosiltransferasas se expresan diferencialmente y son extremadamente sensibles al estado fisiológico de la célula. Todas las glicosiltransferasas utilizan azúcares activados (azúcares nucleotídicos, azúcares dolicólicos) como sustratos. Así, una glicoproteína madura porta N-glicanos que dependen del complemento de genes de glicosilación expresados en el tipo de célula en la que se produce la glicoproteína y del estado fisiológico de esa célula que puede afectar la localización y actividad de las enzimas y transportadores de glicosilación (Varki, *et al.*, 2017).

El fosfato de dolicol (Dol-P) ubicado en la cara citoplasmática de la membrana del retículo endoplásmico (RE) recibe GlcNAc-1-P de UDP-GlcNAc en el citoplasma para generar Dol-P-P-GlcNAc. Dol-P-P-GlcNAc se extiende a Dol-P-P-GlcNAc₂Man₅ antes de “voltearse” a través de la membrana del ER hacia el lado luminal. Posteriormente, se añaden cuatro residuos de manosa (Man) al Dol-P-Man y tres residuos Glucosa (Glc). El oligosacárido GlcNAc₂Man₉Glc₃ se transfiere a la cadena lateral Asn dentro del sequon N-X-S/T por la oligosacariltransferasa (OST). En células de mamíferos, el complejo OSTA está asociado con el translocón en la membrana del RE y glicosila preferentemente los polipéptidos nacientes asociados con el translocón, mientras que el complejo OSTB modifica las proteínas que han abandonado el translocón y se encuentran en la luz del RE (Figura 4) (Varki, *et al.*, 2017).

El N-glicano unido a proteínas se remodela posteriormente en el RE y Golgi mediante una serie compleja de reacciones catalizadas por glicosidasas unidas a membrana y glicosiltransferasas. Muchas de estas enzimas son sensibles al estado fisiológico y bioquímico de la célula en la que se expresa la glicoproteína. Por lo tanto, los glicanos unidos a cada asparagina glicosilada en una glicoproteína madura dependerán del tipo celular en el que se expresa la glicoproteína y del estado fisiológico de la célula, el cual es regulado durante el desarrollo y la diferenciación y alterado en la enfermedad (Varki, *et al.*, 2017).

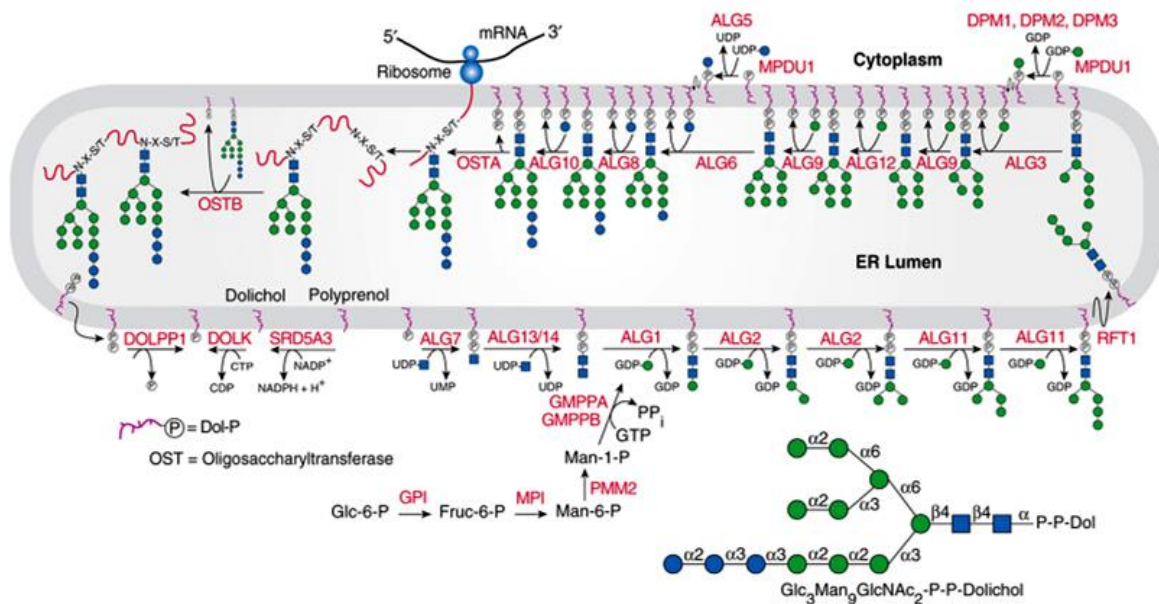
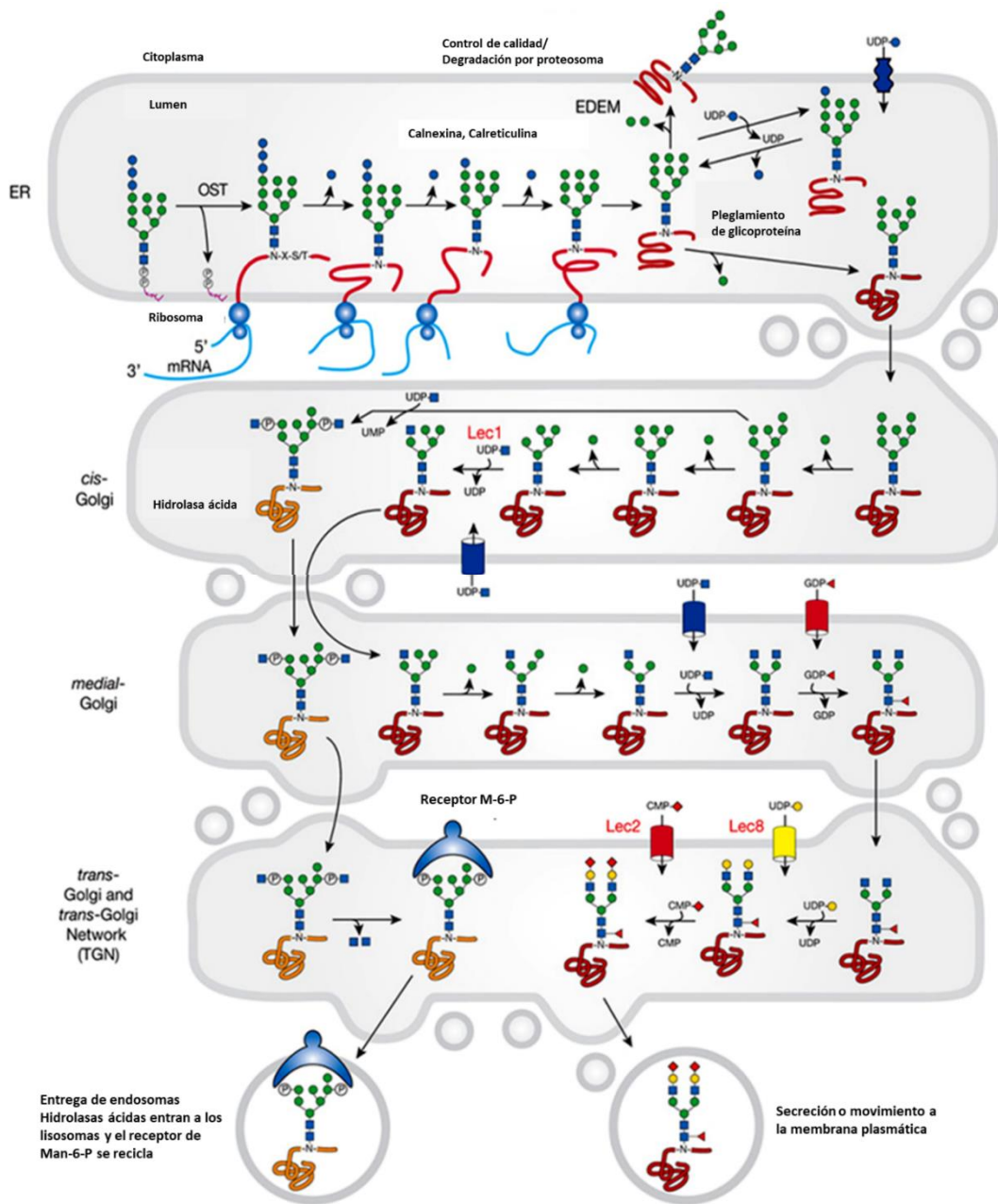


Figura 4. Síntesis de dolicol-P-P-GlcNAc₂Man₉Glc₃ (Tomada de de Varki, *et al.*, 2017).

Tras la transferencia del glicano Glc₃Man₉GlcNAc₂ de 14 azúcares a la proteína, las glicosidasas en el RE eliminan los tres residuos de glucosa, y la manosidasa RE elimina un residuo de manosa (Varki, *et al.*, 2017). Estas reacciones están íntimamente asociadas con el plegamiento de la glicoproteína asistida por las lectinas calnexina y calreticulina, y determinan si la glicoproteína continúa hasta el Golgi o se degrada. Otra lectina, denominada EDEM (proteína que mejora la degradación de la α -manosidasa I) se une a residuos de manosa en glicoproteínas mal plegadas y las acompaña por retrotranslocación al citoplasma para su degradación (Varki, *et al.*, 2017; Helenius., & Aebi., 2001; Varki, *et al.*, 2009). Para la mayoría de las glicoproteínas, se eliminan residuos de manosa adicionales en el compartimento cis del Golgi hasta que se genera Man₅GlcNAc₂Asn. La acción de GlcNAcT-1 en Man₅GlcNAc₂Asn en el Golgi medial inicia en la primera rama de un N-glicano. La α -manosidasa II elimina dos residuos manosa externos. La acción de α -manosidasa II genera el sustrato para GlcNAcT-II. El N-glicano biantenarico resultante se extiende mediante la adición de fucosa, galactosa y ácido siálico para generar un N-glicano complejo con dos ramas. Los N-glicanos complejos pueden tener muchos más azúcares que los mostrados en la Figura 5, incluyendo residuos adicionales unidos al núcleo, ramas adicionales, ramas extendidas con unidades de poli-N-acetil-lactosamina y diferentes estructuras (Varki, *et al.*, 2009; Helenius., & Aebi., 2001).

Figura 5. Procesamiento y maduración de un N-glicano (Adaptada de Varki, *et al.*, 2017).



También es importante mencionar que en el RE existe una gran variedad de chaperonas y enzimas que ayudan a la maduración conformacional de las proteínas antes de ser transportadas al aparato de Golgi. Se han descrito dos sistemas encargados de verificar el plegamiento de las proteínas, los cuales son:

1. Sistema GRP78/GRP94 que recibe el péptido nascente. La proteína GRP78 (constituye aproximadamente el 5% del total de chaperonas presentes en el RE por lo que casi todas las proteínas sintetizadas en el RE se unen a ella) y BiP regulada por glucosa, esta proteína junto con la proteína disulfuro isomerasa (PDI) forman parte de un complejo multiproteico que procesa y verifica el plegamiento de proteínas de forma más eficiente. PDI es la encargada de formar puentes disulfuro (oxidación de cisteínas) y GRP78 reconoce y se une a secuencias hidrófobas de 7 residuos de aminoácidos evitando interacciones inespecíficas y por lo tanto la agregación. Este sistema sirve como respaldo del sistema CNX/CRT para retener péptidos mal plegados y es regulador de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) brindando protección celular ante el estrés en el RE (Zhu., & Lee., 2015; Herbert., *et al.* 2005; Helenius., & Aebi., 2001).
2. Sistema calnexina/calreticulina (CNX/CRT) que modifica los glicanos unidos. La calnexina es una proteína de membrana, mientras que la calreticulina es una proteína soluble. Ambas proteínas son lectinas dependientes de calcio que se unen a la secuencia GlcMan₉NACGlc₂ presente en proteínas mal plegadas. Su función consiste en evitar la agregación de proteínas mal plegadas e incrementar la eficiencia del plegamiento, al retenerlas en el RE, disminuyendo la velocidad del proceso, y reclutando a otras chaperonas que asistan en el plegamiento antes de exportar la proteína al aparato de Golgi (Zhu., & Lee., 2015; Rudd., *et al.* 2001; Hidalgo., 2010; Herbert., *et al.* 2005; Helenius., & Aebi., 2001).

Se sabe que la glicosilación promueve la maduración y el control de calidad de proteínas en el lumen de la ruta de secreción. Más de la mitad de todas las proteínas eucariotas son glicoproteínas, y el 90% de ellas son N-glicosiladas (Lombard., 2016),

1% de los genes de mamíferos están involucrados en el proceso de glicosilación, para el caso de los humanos, al menos el 5% de su genoma parece estar involucrado en la glicosilación de proteínas (Krištić, *et al.*, 2014).; la proteína promedio contiene al menos 3 sitios consenso de glicosilación, con más de dos tercios de estos sitios siendo utilizados (Herbert, D. *et al.* 2005) por lo que la glicosilación global de una proteína recombinante es un proceso complejo que refleja el equilibrio en la interacción de varias rutas biosintéticas (glicanos, nucleótidos, lípidos, péptidos, etc) y el control de calidad en el plegamiento.

Existen diversos factores que pueden afectar la glicosilación de una proteína, algunos ejemplos son explicados en la Tabla 4.

Tabla 4. Factores que afectan la glicosilación

Evento	Comentarios
Glicosiltransferasas (Wang., <i>et al.</i> , 2017; Zhang., <i>et al.</i> 2016; Mikolajczyk., <i>et al.</i> , 2020)	Las glicosiltransferasas catalizan la transferencia de restos de carbohidratos de un donante de azúcar nucleótido activado a una molécula aceptora. Su localización y actividad a lo largo de la vía secretoria afectan la glicosilación de una proteína.
Donadores/aceptores de azúcares (Varki., <i>et al.</i> , 2017)	La disponibilidad de donadores y aceptores de azúcares afecta la glicosilación ya que pueden competir por el sustrato y su acción depende de la enzima antecesora.
pH (Jiang., <i>et al.</i> , 2018; Kellokumpu., <i>et al.</i> , 2019)	La glicosilación es probablemente el proceso más sensible al pH de las funciones de Golgi. A lo largo de la vía se acidifica influenciando la actividad relativa de las diferentes enzimas
Expresión enzimática (Wang., <i>et al.</i> , 2017; Zhang., <i>et al.</i> 2016; Mikolajczyk., <i>et al.</i> , 2020)	El nivel de expresión de las diferentes enzimas ya que algunas se expresan de manera constitutiva y otras son tejido específicas
Tiempo de tránsito de la glicoproteína (Ferris, <i>et al.</i> , 2014)	El tiempo de tránsito de la glicoproteína a través de los compartimientos del aparato de Golgi. Si el tránsito es rápido a través de la vía secretoria, el tiempo disponible para que algunas reacciones ocurran es limitado
Glicosidasas (Wang., <i>et al.</i> , 2017; Zhang., <i>et al.</i> 2016; Mikolajczyk., <i>et al.</i> , 2020)	Son una variedad de enzimas disponibles que eliminan los azúcares y su presencia y actividad afectan la glicosilación de proteínas.
Control de calidad del RE (Ferris, <i>et al.</i> , 2014)	Estrecha asociación de la glicoproteína naciente con las chaperonas que ayudan a su plegamiento adecuado. Las glicoproteínas propensas a la agregación mal plegadas se degradan fácilmente. Estudios realizados sugieren que la adición y modificación del núcleo de N-glicano está íntimamente relacionada con el plegamiento, la formación de enlaces disulfuro y el ensamblaje complejo de glicoproteínas.
Purificación de glicoproteína (Zhang., <i>et al.</i> , 2016)	Para el caso de glicoproteínas recombinantes, el proceso de purificación puede determinar y seleccionar un subconjunto de glicofomas particulares

2.2.3. Glicosilación y Medicamentos de Biotecnológicos

Muchos medicamentos biotecnológicos son proteínas glicosiladas (Varki, *et al.*, 2017), algunos ejemplos de tales proteínas incluyen anticuerpos monoclonales (mAbs) y otros productos proteicos recombinantes como factores de coagulación sanguínea, factores de crecimiento, proteínas de fusión, enzimas terapéuticas, hormonas, citocinas y algunos interferones (Kim, *et al.*, 2012; Walsh., *et al.*, 2018). En la Figura 6, se puede observar de manera general la glicosilación que se presenta en los diferentes sistemas de expresión de proteínas recombinantes:

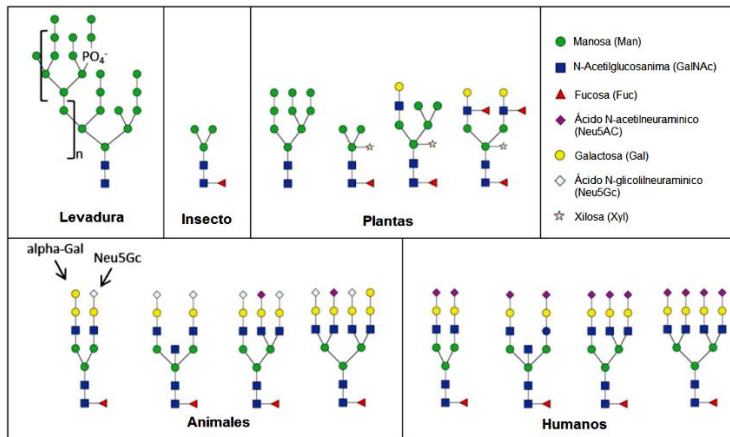


Figura 6. Diferencias en la N-glicosilación producida en los sistemas de expresión de uso común (Adaptada de Zhang, 2016).

Las glicoproteínas de mamíferos se presentan en diferentes glicofomas, y en el contexto de proteínas terapéuticas, esta diversidad puede afectar la potencia de los medicamentos, así como su farmacocinética. Para el caso de **células de ovario de hámster chino (CHO)**, utilizadas en este trabajo, se ha reportado que estas producen glicanos que no se producen en las células humanas, como el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) y galactosa- α 1,3-galactosa (α -gal), pero ocurren a niveles muy bajos (<2% y <0.2% respectivamente) (Bosques, *et al.*, 2010). Las células CHO carecen de la enzima α 2-6 sialiltransferasa y sintetizan exclusivamente ácido siálico terminal unido α 2-3 vía α 2-3 sialiltransferasa. Las células humanas tienen ambas enzimas (Jenkins., *et al.* 1996).

La glicosilación de las proteínas terapéuticas afecta su estructura, función, plegamiento, orientación espacial, propiedades fisicoquímicas, estabilidad térmica, interacción con receptores, su producción, farmacocinética, farmacodinamia, bioactividad, seguridad (inmunogenicidad) y el tiempo de vida media en circulación *in vivo*. Está bien documentado que la glicosilación de las proteínas no solo incrementa la estabilidad de la proteína *in vitro*, si no también protege a las proteínas de la degradación proteolítica *in vivo* (Zhang, *et al.*, 2016; Kawasaki, *et al.*, 2009; Lattova, *et al.*, 2006).

En cuanto a la importancia de la glicosilación en el aspecto farmacocinético y farmacodinámico de las proteínas terapéuticas, existe evidencia de que proteínas parcialmente glicosiladas, las cuales usualmente tienen galactosa terminal, tienen un tiempo de vida media en la circulación mucho más corto que las proteínas completamente glicosiladas con ácido siálico terminal, esto se debe a el receptor de asialoglicoproteína (ASGPR) es una lectina de tipo C, expresada principalmente en la superficie sinusoidal del hepatocito (Diao *et al.*, 1996; Valladeau *et al.*, 2001). El papel principal de ASGPR es la unión, internalización y eliminación posterior de la circulación de glicoproteínas que contienen galactosa terminal o residuos de N-acetilgalactosamina (asialoglicoproteínas) (Roggenbuck, *et al.*, 2012). Otros receptores de tipo lectina con especificidad de unión a manosa terminal GlcNAc o fucosa también contribuyen a la eliminación de glicoproteínas que contienen estos glicanos (Zhang, *et al.*, 2016).

Cambios en los procesos de manufactura de medicamentos biotecnológicos causan la alteración de la glicosilación y plantean inquietudes acerca de la alteración de su calidad, seguridad y eficacia. Existen diferentes factores relacionados con el cultivo las cuales han probado ser un factor determinante en la glicosilación terminal de una proteína terapéutica, algunos ejemplos son: medios de cultivo celular (Jenkins., *et al.* 1996; Gupta, *et al.*, 2018; Radhakrishnan, *et al.*, 2018; Wong., *et al.* 2010), la suplementación de los medios de cultivo (Radhakrishnan, *et al.*, 2018), cambios en la concentración de oxígeno disuelto (Kimura., & Miller., 1997, Serrato., *et al.* 2007, Kunkel., *et al.*, 1998, varsson., *et al.*, 2014), cambios en la concentración de CO₂ (Kimura., & Miller., 1997; Gupta, *et al.*, 2018), cambios en el pH (Ivarsson., *et al.*, 2014), cambios en la concentración de nutrientes/desechos celulares (Jenkins., *et al.* 1996; Gupta, *et al.*, 2018) y cambios en la

temperatura. Este último se discutirá más adelante, con especial enfoque en el activador del plasminógeno tisular recombinante (rh-tPA), la cual es la proteína de estudio usada en este trabajo.

La modificación de los glicanos es un blanco en el diseño de fármacos para incrementar su eficacia, pero las glicoproteínas deben idealmente mostrar glicanos tipo humanos; y segundo, los patrones de glicosilación deben ser lo más uniformes posible ya que algunos reportes señalan reacciones anafilácticas causadas por cambios en la glicosilación, por lo que es crucial mantener el patrón en los residuos de carbohidratos para la eficiencia y el uso de medicamentos biotecnológicos glicosilados (Kim, *et al.*, 2012).

Por lo tanto, el entendimiento detallado de la estructura de las glicoproteínas tiene un impacto tanto en aplicaciones médicas como en el desarrollo y la entrega de nuevos fármacos y debe ser extensivamente caracterizado con el fin de asegurar la calidad y eficacia de la proteína resultante (Kawasaki, *et al.*, 2009; Lattova, *et al.*, 2006; Lepenies., & Seeberger., 2014).

2.3. Efecto de la Hipotermia Moderada Sobre la Productividad y Glicosilación de Proteínas Recombinantes Producidas en Células CHO

El rendimiento de la proteína recombinante en células CHO está directamente relacionado con la concentración celular y longevidad del cultivo, por lo que algunas estrategias de optimización están dirigidas al control de la proliferación, fisiología y comportamiento celular en situaciones de estrés, así como el mejoramiento de funciones celulares expresando enzimas ausentes en el sistema o con bajo nivel de expresión (Barnes. & Dickson., 2006; Kumar., *et al.* 2007; Kunert., & Reinhart., 2016).

La caracterización del metabolismo celular y la fisiología ha permitido el diseño de procesos de biorreactores de perfusión y de alimentación por lotes que han permitido una mejora significativa en la productividad, algunos de los cuales ahora se acercan a la producción de hasta 10-13 g /L (Kunert., & Reinhart., 2016). Hay varias áreas que pueden

identificarse que podrían conducir a una mejora adicional en los sistemas de cultivo celular como la regulación a la baja de la apoptosis para permitir una supervivencia celular prolongada en condiciones potencialmente adversas, el pH, pO₂, pCO₂, osmolaridad, composición de los medios de cultivo, entre otros. En particular, los cambios de temperatura a temperaturas de cultivo más bajas se emplean con frecuencia en la fabricación de proteínas terapéuticas en células de mamíferos para mejorar la productividad, la viabilidad o calidad de la proteína producida (McHugh, *et al.*, 2020).

2.3.1. Respuesta al Estrés por Frio en células de mamífero

La mayoría de los organismos han desarrollado estrategias que les permitan sobrevivir en un intervalo dinámico de temperatura, las cuales involucran reprogramación genética, metabólica y expresión de diversas proteínas que ayudan a contrarrestar y evitar el estrés producido (Fujita., 1999; Al-Fageeh, *et al.* 2006; Phadtare., *et al.* 1999). La hipotermia moderada o TDS que se refiere a la disminución de la temperatura en un rango de 28° a 34°C, donde las células de mamíferos pueden adaptarse, sobrevivir y continuar proliferando, a diferencia de la hipotermia extrema (0-10°C), donde la célula muere vía necrosis debido a la formación de cristales de hielo que provocan daño de membranas (Bedoya, *et al.*, 2017; Hidalgo, M., 2010). Generalmente, las células responden al estrés por frio mediante la sobreexpresión rápida de un selecto grupo de proteínas, las cuales son llamadas proteínas CSPs (**cold-shock proteins**) (Fujita., 1999; Al-Fageeh, *et al.* 2006; Phadtare., *et al.* 1999).

Está bien documentado que la disminución de la temperatura a hipotermia moderada suprime generalmente la síntesis de proteínas en eucariontes y procariontes. Esta supresión de la síntesis de proteínas está asociada con el arresto del crecimiento y la expresión de CSPs requeridas para la adaptación a la hipotermia (Al-Fageeh., & Smales., 2006).

En mamíferos, los reportes sugieren que la respuesta al frío involucra una serie de eventos moleculares y fisiológicos coordinados, los cuales permiten a la célula adaptarse y sobrevivir a la hipotermia moderada (Tabla 5) (Al-Fageeh., & Smales., 2006; Andersen,

et al. 2000; Bedoya, *et al.*, 2017; Cain, *et al.*, 2013; Chuppa, *et al.*, 1997; Hendrick, *et al.*, 2001; Marchant, *et al.*, 2008; Fujita., 1999; Phadtare., *et al.* 1999; Hidalgo., 2010).

Tabla 5. Respuestas coordinadas al estrés por frío en células de mamífero.

Respuesta Molecular	Respuesta Fisiológica
Atenuación de la transcripción causada por la fosforilación de factores de transcripción (Sonna., <i>et al.</i> , 2002). Aumento de los factores de transcripción inducibles Nrf2 y HIF1A (Eskla, <i>et al.</i> , 2018).	Un leve descenso de la temperatura disminuye la apoptosis celular, el metabolismo, la utilización de nutrientes, el consumo de ATP y la acumulación de metabolitos tóxicos (Xu., <i>et al.</i> , 2019)
Inhibición de la traducción (durante la iniciación y elongación). La traducción global de proteínas se reduce (Al-Fageeh, <i>et al.</i> , 2006).	Disminución de la generación de radicales libres (Yoon., <i>et al.</i> 2003).
Aumento de la transcripción de genes específicos (transcripción selectiva) vía elementos en la región promotora (Sonna., <i>et al.</i> , 2002).	Arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 (fase G1 es la fase óptima de síntesis de PR; sobreexpresión de p21 y MDM2, represión de CDK 4/6) y desensamble del citoesqueleto (Al-Fageeh, <i>et al.</i> , 2006; Mason, <i>et al.</i> , 2014).
Reducción asociada en la traducción y el metabolismo de RNAm global junto con una mayor estabilidad de RNAm y degradación reducida (Al-Fageeh, <i>et al.</i> , 2006; Masterton., <i>et al.</i> , 2014).	Aumento de la viabilidad, disminución en la proliferación y disminución de la apoptosis (expresión de <i>Ras</i> , <i>Mst1</i> y <i>NF-kB</i> reprimida, y sobreexpresión de genes inhibidores de muerte celular como Bcl-2)
Procesamiento alternativo del pre-mRNA, internalización de exones sin marcos de lectura correctos (Ars, <i>et al.</i> , 2000)	Reducción de la velocidad específica de crecimiento hasta en un 60% (Yoon., <i>et al.</i> (2003).
Traducción selectiva de mRNA con secuencias IRES (Internal ribosome entry sites) específicos al frío en mRNAs resultando en la traducción preferencial e incrementada de tales mRNAs debió al shock frío (Chappell., <i>et al.</i> 2001).	Aumento de la resistencia al estrés hidrodinámico y reducción en el consumo de oxígeno (Xu., <i>et al.</i> , 2019)
Expresión de proteínas de choque térmico por frío (CSP) (Masterton., <i>et al.</i> , 2014).	Cambios en el plegamiento y el tráfico de proteínas, desmontaje del citoesqueleto celular (Mason, <i>et al.</i> , 2014).

Datos transcriptómicos han sugerido que las células perciben los estímulos de hipotermia moderada a través de canales iónicos tipo Transient Receptor Potencial (TRP), específicamente, las células CHO censan bajas temperaturas por medio de canales de calcio TRPM8 y temperaturas cálidas mayores a 33°C mediante canales iónicos TRPV3 (Bedoya, *et al.*, 2017). Una vez percibido el estímulo, la respuesta a la hipotermia se da mediante la fosforilación de diversos factores de iniciación y elongación como lo son

eIF2a, el cual provoca la disminución de la traducción de mRNA con CAP. Además, son activados mecanismos postranscripcionales del mRNA disminuyendo así la síntesis de proteínas (Al-Fageeh., *et al.*, 2006).

Algunas de las proteínas inducidas por hipotermia moderada son: la proteína disulfuro isomerasa (PDI), vimentina, NDK B, ERP57, fosfoglicerato cinasa, HSP71, HSP90-b, NSR-1 y EF2, entre otras (Al-Fageeh., *et al.*, 2006; Baik., *et al.*, 2006; Kumar., 2007; Phadtare., *et al.*, 1999; Sonna *et al.*, 2002). En condiciones de hipotermia en células de mamífero, hay también una sobreexpresión de proteínas asociadas con la función, metabolismo y regulación de los RNAs, esas proteínas son llamadas “RNA binding proteins” o RBP, las cuales son:

- **Cirp (cold inducible RNA binding protein):** es una proteína ubicua de 18 kDa con un dominio de unión a RNA conservado (CS-RBD) en el extremo amino terminal y un dominio rico en glicinas en el extremo carboxilo terminal; se expresa de forma constitutiva o periódica según el tejido en el que se encuentre; está conservada en ratón, rata, humano y hámster. Esta chaperona que previene la formación de estructura secundaria de los RNA mensajeros dándole así estabilidad (Al-Fageeh, M., & Smales, M., 2006), además se une a la región poliadenilada y a la no codificante 3'UTR de mRNA's susceptibles a la degradación protegiéndolos y restaurando su conformación nativa durante condiciones de estrés (radiación UV, hipoxia). CIRP no se expresa en células sometidas a estrés por calor. La función CIRP se ha relacionado directamente con la detención del crecimiento mediante experimentos knockdown y sobreexpresión (Zhu, X., *et al.*, 2016; Richard., 2005; Al-Fageeh., & Smales., 2006; Andersen, *et al.* 2000; Cain, *et al.*, 2013; Chuppa, *et al.*, 1997; Hendrick, *et al.*, 2001; Marchant, *et al.*, 2008; Fujita, J. 1999; Phadtare., *et al.* 1999;).
- **Rbm3 (RNA binding protein):** se caracteriza por poseer en la región no codificante 5' de su mRNA una secuencia IRES y otras secuencias especializadas que le permiten ser reconocida por el ribosoma independientemente de la estructura CAP, facilitando su transcripción a bajas temperaturas. Interactúa con micro RNAs y la subunidad ribosomal 60s incrementando la síntesis de proteínas y modificando la

degradación del mRNA (Zhu., *et al.*, 2016). Por razones desconocidas, este IRES tiene una actividad 5 veces mayor a 33°C a comparación de su actividad a los 37°C. Una característica sorprendente de la secuencia líder 5' de RBM3 es que contiene muchas similitudes complementarias con el rRNA 18S, lo que lleva a la especulación de que desempeña un papel en la unión directa de las subunidades ribosómicas 40S al interactuar con el rRNA 18S (Zhu., *et al.*, 2016; Richard., 2005; Al-Fageeh., *et al.*, 2006). Esto sugiere que la iniciación interna de la traducción puede ser un componente clave de la respuesta a la hipotermia en mamíferos, lo que permite el alto nivel de traducción de ciertas proteínas en estas condiciones. RBM3 está involucrada en diversas funciones celulares tales como: la proliferación dependiente de citocinas, replicación de Poxvirus, desarrollo de cáncer, regula los niveles de miRNA que participan en el silenciamiento de genes, regula la síntesis global de proteínas y la degradación de su propio mensajero, previene la apoptosis y funciona como chaperona de ciertos mRNA uniéndose a su extremo 5' (Zhu., *et al.*, 2016; Richard., 2005; Al-Fageeh., Smales., 2006; Cain, *et al.*, 2013; Chuppa, *et al.*, 1997; Marchant, *et al.*, 2008; Fujita., 1999; Phadtare., *et al.* 1999).

Es importante mencionar que RBM3 al igual que CIRP están regulados por cambios en los niveles de oxígeno de una manera independiente de HIF-1 y a la mitocondria, lo cual indicaría una conexión entre las respuestas a choque por frío e hipoxia (Wellmann., *et al.* 2003).

2.3.2. La Hipotermia Moderada y su Relación con la Producción de Proteínas Recombinantes Producidas en Células CHO

La TDS ha sido usada como estrategia para incrementar los rendimientos en los cultivos celulares de mamífero, particularmente en los cultivos de células CHO. El cambio a condiciones hipotérmicas moderadas (30-34 °C) se ha convertido en una práctica industrial muy frecuentemente empleada en la producción de PR en líneas celulares CHO (Wulhfard, *et al.*, 2008). En cultivos de células CHO, los cuales inicialmente crecen a 37°C, al ser expuestos a una temperatura de 30°C durante la fase de crecimiento

exponencial, resulta en un incremento entre 1.3 hasta 4.7 veces más en la productividad específica (qp) de proteína recombinante, y un incremento de 1.2 a 3.8 veces en la productividad volumétrica, también hay un incremento de la viabilidad celular de las células crecidas a 30°C con respecto a las obtenidas a 37°C (Tabla 6). No obstante, se ha demostrado que los resultados son variables entre las diferentes líneas celulares, modalidades de cultivo, temperaturas y proteínas de interés, lo cual hace más complicada la explicación al efecto observado y evitando la existencia de un entendimiento claro del fenómeno (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de la hipotermia moderada en la productividad de proteína recombinante en líneas celulares CHO.

Línea Celular	PR	Temp (°C)/ pH/ Gln (nM)	qP	Prod Volumétrica	Comentarios	Referencia
CHO	IgG ₄	37→32	40%↑	S/C	Arresto de células en G ₀ /G ₁	Marchant, <i>et al.</i> , 2008
		37→27	12%↑	28%↓		
	EPO	37→32	3.8x	3.7x	Disminución en la proporción de formas acidas, tetraanténarias y tetrasiliadas	Ahn, <i>et al.</i> , 2008
		37→30	4.8x	3x		
		37→28	4.7x	2.5x		
		37→25	2.6x	1.4x		
	SEAP	37→33	+133%	+135%	Aumento en la siliación y disminución de fucosilación	Nam, <i>et al.</i> , 2008
	IgG	37→33	-	21.5x ↑	Aumento del diámetro y volumen celular, aumento de células en fase G ₀ /G ₁ ciclo celular	Wulhfard, <i>et al.</i> , 2008
		37→31		9.4x ↑		
		37→29		13.9x ↑		
	EPO-Fc	30	1.7x ↑	3.1x ↓	Disminución de la siliación a 30 y 33°C (40 y 30% respectivamente)	Trummer, <i>et al.</i> , 2006
		33	1.4x ↑	1.5x ↓		
		35	S/C	10% ↑	Arresto del ciclo celular en G ₀ /G ₁ . DOT no tiene efecto en la siliación. En este reporte se combina el efecto de la disminución de la temperatura con el cambio en el pH	
		37→32	1.85x ↑	1.3x ↑	Aumento de la proporción de células en G ₀ /G ₁	
		37→30	30% ↑	1.4x ↑		

CHO					Reducción en la siliación, pero si se reduce pH (6.85-7.2) aumenta la proporción de formas ácidas	
	Fv-Fc IL2	30	2.8x ↑	NR	Arresto del 50% de las células en la fase G ₂ /M del ciclo celular	Shi, <i>et al.</i> , 2005
	Interferon γ	32	2x ↑	1.9x ↑	Aumento de células en fase S del ciclo celular	Fox, <i>et al.</i> , 2004 Fox, <i>et al.</i> , 2005
	hGM-CSF	37→33	2.1x ↑	6x ↑	Disminución de la temperatura no afecta el perfil de glicosilación. Misma actividad biológica del hGM-CSF producido a 37°C que el producido a 30°C	Bollati-Fogollin, <i>et al.</i> , 2004
	EPO	32	4-25x ↑	NR	El incremento de la qP de las células rCHO debido a la disminución de la temperatura depende de la clona	Yoon., <i>et al.</i> , 2004
	Anti-4 I-BB	30	S/C	S/C	Arresto del ciclo celular en fase G ₀ /G ₁	Yoon., <i>et al.</i> , 2003
		33	S/C	S/C		
	EPO	33	4x ↑	2.5x ↑	Acumulación de células en fase G ₀ /G ₁ del ciclo celular. No hay cambios en los patrones de isoformas (análisis IEF), el contenido de ácido siálico y actividad biológica <i>in vivo</i> es similar o mayor al de la EPO producida a 37°C	Yoon., <i>et al.</i> , 2004
		30	5.6x ↑	0.86x ↑		
	SEAP	30	1.7x ↑	3.4x ↑	Arresto del ciclo celular en fase G ₀ /G ₁	Kaufmann., <i>et al.</i> , 1999
	C-terminal enzima α-amidante	37→32	2.4x ↑	5.7x ↑	Disminución en el consumo de aminoácidos	Furukawa., & Ohsuye., 1999
		37→34	1.6x ↑	1.6x ↑		
30		2.8x ↑	NR	Mediante el análisis por geles SDS-PAGE y western blot se sugiere que el patrón de glicosilación no cambia	Furukawa., & Ohsuye., 1998	
32		4.1x ↑				
33.5		2.8x ↑				

	INF-γ	30	NR	2.0x \uparrow	Disminución en la siliación	Rodríguez., <i>et al.</i> 2005
	mAbs (IgM, IgG, Eg2-hFc)	36.5 \rightarrow 32	25% \uparrow	NR	Reducción en las concentraciones de donador de azúcar nucleotídico intracelular (NSD) y una proporción disminuida de las estructuras de glicano más procesadas en la región constante de mAb	Sou., <i>et al.</i> 2015 y 2017
37 \rightarrow 38.5		6.90	1.4x \uparrow	1.2x \uparrow	Arresto del ciclo celular en la fase G0/G1, metabolismo reducido. Aproximadamente el 70% de los glicanos totales eran complejos y ocupaban sitios de glicosilación 1-3. En general, no se observó ningún cambio significativo en la distribución de glicanos	Hennicke, <i>et al.</i> , 2019
37 \rightarrow 33.5		6.75	0.5x \downarrow	0.7x \downarrow		
		6.90	0.6x \downarrow	0.7x \downarrow		
		7.05	0.5x \downarrow	0.6x \downarrow		
37 \rightarrow 30		6.75	0.4x \downarrow	0.5x \downarrow		
		7.05	0.5x \downarrow	0.6x \downarrow		
37 \rightarrow 28.5		6.90	0.3x \downarrow	0.5x \downarrow		
37 \rightarrow 33 (EP)		4 mM	0.25 \downarrow	SDSA96h	Cambios en el índice de siliación y galactosilación variables dependiendo de la condición (Gln, así como del tiempo de cultivo y cambio de temperatura). En general, la reducción de la temperatura con respecto 37°C reduce la galactosilación.	Aghamohs eni., <i>et al.</i> 2017
		0 mM	S/C	SDSA96h		
33 (EP)		4 mM	1.25x \uparrow	SDSA96h		
		0 mM	1.08x \uparrow	SDSA96h		
37 \rightarrow 33 (PE)		4 mM	1.5 x \uparrow	SDSA96h		
		0 mM	2 x \uparrow	SDSA96h		
33 (PE)	4 mM	4.1 x \uparrow	SDSA96h			
	0 mM	3.3 x \uparrow	SDSA96h			
rh-tPA	32	1.7x \uparrow	NR	Posible aumento en la manosilación	Hendrick., <i>et al.</i> , 2001	
	33	1.7x \uparrow	NR	-	Vergara., <i>et al.</i> , 2009	
	31	1.5x \uparrow	NR	-	Vergara., <i>et al.</i> , 2012	
	33	1.3x \uparrow	NR	Reducción de la temperatura podría afectar el procesamiento de la	Vergara., <i>et al.</i> , 2015	

					proteína reduciendo la proteína incorrectamente plegada destinada a degradación	
--	--	--	--	--	---	--

Los valores presentados con respecto en número de veces (x) de aumento (↑) o disminución (↓) con respecto al cultivo control a 37°C. SEAP: fosfatasa alcalina humana; hGM CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos; IL-2: interleucina 2; rh-tPA: activador de plasminógeno tisular; EPO: eritropoyetina humana; S/C: sin cambios; NR: no reportado, EP: Crecimiento en la fase exponencial, PE: crecimiento post-fase exponencial, SDSA96 h: Sin diferencias significativas antes de las 96 h de cultivo.

Otra de las ventajas de la disminución de la temperatura en cultivos de células CHO es la disminución de la producción de proteínas de la célula huésped (HCPs) (Dorai y Ganguly, 2014). Uno de los retos en la purificación de proteínas es la remoción de HCPs ya que además de ser potencialmente inmunogénicas para los pacientes, las HCPs pueden causar agregación del producto y fragmentación (Dorai y Ganguly, 2014). Por ejemplo, las chaperonas pueden interactuar con las proteínas recombinantes parcialmente plegadas y no plegadas para formar grandes agregados, los cuales pueden causar que las columnas de cromatografía y filtros sean tapados. Las proteasas y las glicosidasas pueden causar fragmentación y recorte de proteínas recombinantes en medios libres de suero, por lo tanto, reducir el rendimiento general del producto (Dorai y Ganguly, 2014; Gao et al., 2011). La eliminación eficiente de HCP es crucial para (i) garantizar la seguridad del paciente; (ii) reducir el costo de purificación; y (iii) mantener la integridad del producto (Goey., et al., 2017).

En conclusión, la hipotermia moderada o TDS es una estrategia que puede servir para incrementar la qP de diferentes líneas de células CHO productoras de proteínas recombinantes terapéuticas facilitando la purificación de estas al reducir la producción de HCPs en la célula huésped, sin embargo, como se puede ver en la tabla 6, en algunos casos la glicosilación de la PR puede cambiar planteando inquietudes acerca de su calidad, seguridad y eficacia. Al usar la TDS como estrategia de incremento de la productividad, el patrón de glicosilación debe ser caracterizado con el fin de asegurar la calidad y eficacia de la proteína resultante.

2.3.3. Causas del aumento de la productividad con la disminución de la temperatura

La reducción de la temperatura a condiciones de hipotermia moderada causa el incremento en la productividad de proteína recombinante en diferentes líneas celulares CHO. En general, ha sido descritos los mecanismos resumidos en las tablas 7 y 8 para explicar este fenómeno. Para el caso del **arresto en el ciclo celular**, el cultivo en condiciones de TDS conduce a una mayor longevidad del cultivo y a la detención del ciclo celular, y muchas de las investigaciones atribuyeron aumentos en la productividad volumétrica y específica de las células a estas respuestas (Tabla 6). Es probable que el aumento de la productividad específica de la célula durante el arresto del ciclo celular de la fase G1 o S se deba a una competencia reducida entre el ARNm endógeno y recombinante y los polipéptidos para la maquinaria celular requerida para sintetizar, plegar y ensamblar proteína recombinante (Masterton, *et al.*, 2014).

Una serie de estudios más recientes han sugerido que los cambios en las cantidades de ARNm recombinante en células de mamíferos después del cultivo de temperatura subfisiológica leve es un factor clave para mejorar la productividad a tales temperaturas (Tabla 7 y 8) (Yoon., *et al.* 2003; Marchant., *et al.* 2008; Masterton., *et al.*, 2010; Kou., *et al.*, 2011; Fox., *et al.*, 2005)

Tabla 7. Mecanismos propuestos para el incremento en la producción de proteínas recombinantes.

Arresto del ciclo celular		
Arresto en Fase G1	Hay una correlación entre la detención en esta fase y una mayor productividad celular específica en células de mamíferos. Esta fase provoca el retraso de los procesos apoptóticos prolongando la viabilidad y la productiva del cultivo. Las células arrestadas en esta fase son metabólicamente más activas, de mayor tamaño y no “gastan” recursos para generar biomasa, con respecto a las células que no están arrestadas en esta fase	Fussenegger., 2001; Bollati-Fogolin., <i>et al.</i> , 2005; Kaufman., 1999; Yoon., <i>et al.</i> , 2004; Fox., <i>et al.</i> , 2005
Arresto en fase S	Los autores informan que la fase S del ciclo celular es la más productiva en términos de rendimiento de proteína recombinante en células CHO. Durante la fase S, se produce la síntesis de ADN	Fox., <i>et al.</i> 2005; Masterton, <i>et al.</i> , 2014
Arresto en fase G₂/M	Se atribuye en incremento de la productividad a el arresto del 50% de las células en la fase G ₂ /M del ciclo celular	Shi, <i>et al.</i> , 2005;
Cambios en el mRNA de proteínas recombinantes		
Incremento en mRNA de la PR	Durante el cultivo en condiciones de TDS, se ha demostrado que las cantidades de ARNm recombinante presentes son elevadas en comparación con las observadas a 37 ° C. La traducción global se atenúa en condiciones de hipotermia moderada, sin embargo, no se detiene. Entonces aumento de los niveles de ARNm de la proteína recombinante puede deberse a un incremento su traducción debido a una menor "competencia" con los ARNm endógenos para la maquinaria de traducción celular.	Kou., <i>et al.</i> 2011; Fox., <i>et al.</i> 2005; Marchant. <i>et al.</i> 2008; Roobol., <i>et al.</i> , 2009; Masterton, <i>et al.</i> , 2014; Underhill., <i>et al.</i> , 2006;
Incremento de la estabilidad del mRNA de la PR	Esto se ha atribuido a la formación de estructuras secundarias y una reducción en la tasa de degradación y también a cambios en el tiempo de vida media del mRNA (lo cual no se debe a un aumento de la actividad transcripcional). La TDS induce la expresión del CSP CIRBP lo que causa un incremento en la cantidad de mRNA debido a que CIRBP (proteína de unión a ARN) estabiliza directamente los niveles de ARNm recombinante	Fox., <i>et al.</i> , 2005; Roobol., <i>et al.</i> , 2009; Kou., <i>et al.</i> 2011; Tan., <i>et al.</i> 2008; Masterton, <i>et al.</i> , 2014
Retraso en la apoptosis		
Cantidades de Bcl-2 y p21	Esto puede ser debido a un incremento de la Bcl-2 reorganización del citoesqueleto y disminución de p21	Slikker., <i>et al.</i> 2001; Baik., <i>et al.</i> 2006; Yee., <i>et al.</i> , 2009; Masterton, <i>et al.</i> , 2014
Actividad proteolítica del cultivo		
Actividad de proteasas y glicosidasas	Cuando se presenta la muerte celular programada, se expulsan proteasas y glicosidasas al medio de cultivo, provocando la degradación de la proteína o alterando su calidad (glicosilación); en células bajo condiciones de hipotermia moderada, se presenta la disminución de la actividad proteolítica logrando así una menor degradación de la proteína.	Barrón., <i>et al.</i> , 2009; Masterton, <i>et al.</i> , 2014
Redistribución de nutrientes y energía		
Utilización denutrientes y energía	Se ha descrito que, debido a la disminución de la temperatura, los nutrientes y energía son redistribuidos de la producción de biomasa a la producción de proteína recombinante	Gammell, <i>et al.</i> , 2007; Masterton, <i>et al.</i> , 2014

CSP: Cold shock protein

Tabla 8. Ejemplos de estudios que observaron los diferentes mecanismos involucrados en el incremento de proteína recombinante bajo hipotermia moderada en cultivos de células CHO.

Posible Mecanismo	Proteína Recombinante	Referencia
Arresto del Ciclo Celular		
Incremento en el porcentaje de células en G1	SEAP, IgG4 quimérico	Kaufmann., <i>et al.</i> 1999 Moore., <i>et al.</i> 1997
Disminución en la velocidad de crecimiento específica	t-PA, Igl en contra de la glicoproteína del receptor humano de plaquetas	Berríos., <i>et al.</i> 2009 Yoon., <i>et al.</i> 2004
Síntesis de miRNA	SEAP	Barrón., <i>et al.</i> 2011
Retraso de la apoptosis		
Incremento de Bcl-2	No reportado	Slikker., <i>et al.</i> 2001
Disminución de la importina a (y subsecuentemente de p21)	No reportado	Kumar., <i>et al.</i> 2008 Baik., <i>et al.</i> 2006
Reorganización del citoesqueleto	EPO, IgG	Yee., <i>et al.</i> 2009
Incremento en la cantidad y/o estabilidad del mRNA de la proteína recombinante		
Incremento en la cantidad de mRNA de la PR	EPO	Yoon., <i>et al.</i> 2003
Incremento en la estabilidad del mRNA de la PR	TNFR-Fc	Kou., <i>et al.</i> 2011
Cambios en la síntesis de proteínas	INF- γ	Fox., <i>et al.</i> 2005
Sobreexpresión de CIRP	INF- γ	Lee., <i>et al.</i> 2008

2.3.4. La Hipotermia moderada y su efecto en la glicosilación de proteínas en cultivos de células CHO

Los efectos de la hipotermia moderada en los patrones de glicosilación son dependientes de la línea celular, tipo de proteína y temperatura, por lo que no solo se verá afectado por los mecanismos genéticos y moleculares intrínsecos de la célula huésped, sino también por las condiciones de cultivo y el estado metabólico celular, lo cual explica algunas observaciones contradictorias encontradas en la literatura (Ahn., *et al.* 2008; Bollati-Fogolín., *et al.* 2005; Rodríguez., *et al.* 2005; Serrato., *et al.* 2007).

Debido a que la regulación de las enzimas durante el proceso de glicosilación en el RE y en el aparato de Golgi no ha sido completamente descrita, el efecto de la temperatura y la glicosilación resultante no ha sido del todo examinado. La mayoría de los reportes realizados han sido enfocados en el beneficio que tiene la disminución de la temperatura sobre la viabilidad y productividad de proteínas recombinantes, sin embargo, muy pocos

reportes se han enfocado en el efecto que tiene la disminución de la temperatura sobre la glicosilación, estos reportes son mencionados en la tabla 9.

Tabla 9. Reportes del efecto de la disminución de la temperatura sobre la glicosilación de proteínas recombinantes.

Proteína Recombinante	Condiciones de Cultivo	Método de Análisis de Glicosilación	Efecto sobre Glicosilación	Referencia
EPO	37°C → 32, 30, 28, 25 °C (P, Br, SF)	IEF, HPLC, MALDI-TOF	A 25°C aumentan las formas básicas. Debajo de 32°C hay disminución en la proporción de formas ácidas, tetraanténarias y tetrasiladas, incrementan estructuras Man6P. Mismas isoformas en diferente proporción de acuerdo con la temperatura	Ahn, <i>et al.</i> , 2008
SEAP	37°C → 33°C (FB, M, Br, SF)	HPLC MALDI-TOF	Aumento en la siliación y disminución de fucosilación en glicanos neutros, predominan estructuras bianténarias completamente galactosiladas (51%) sin fucosa	Nam, <i>et al.</i> , 2008
EPO-Fc	30, 33 y 33°C (Br, B)	Método enzimático (solo determinan siliación)	Reducción en la siliación (40% a 30°C y 20% a 33°C con respecto a 37°C), pero si se reduce pH (6.85-7.2) aumenta la proporción de formas ácidas	Trummer, <i>et al.</i> , 2006
IgG₄	32°C (P, Sp, SF)	MALDI-MS	Cambios sutiles en la proporción de las estructuras glicosiladas principales	Galbraith., <i>et al.</i> , 2006
IgM	37 → 38.5, 33.5, 30, 28.5 °C	HILIC	Aproximadamente el 70% de los glicanos totales fueron del tipo complejo y ocupaban sitios de glicosilación 1-3. En general, no se observó ningún cambio significativo en la distribución de glicanos.	Hennicke, <i>et al.</i> , 2019
Eg2-hFc	37 → 33 °C 33°C	HILIC	Cambios en el índice de siliación y galactosilación variables dependiendo de la condición (Gln, así como del tiempo de cultivo y cambio de temperatura). En general, la reducción de la temperatura con respecto 37°C reduce la galactosilación.	Aghamohseni., <i>et al.</i> 2017
IgG	36.5 → 32 °C	ProfilerPro Glycan Profiling Kit	Reducción en las concentraciones de donador de azúcar nucleotídico intracelular (NSD) y una proporción disminuida de las estructuras de glicano más procesadas en la región constante de mAb	Sou., <i>et al.</i> 2015 y 2017
hGM- CSF	37°C → 33°C (B, Sp, SB)	HPAEC MALDI/TOF-MS	Cambios ligeros en fracción bianténaria, ácido siálico, pero no son significativos por lo que se concluye que la disminución de la temperatura no tiene efecto en el perfil de glicosilación, incluyendo siliación terminal.	Bollati-Fogollin, <i>et al.</i> , 2004
INF-γ	37°C → 30°C, 30°C (B, Sp/Br, SF)	HPLC	Disminución en la siliación, perfil similar con variación en la proporción de las estructuras	Rodríguez., <i>et al.</i> 2005
EPO	30, 33 y 37°C (B, FT, SB)	IEF	No hay cambios significativos en los patrones de isoformas, el contenido de ácido siálico es similar o mayor al de la EPO producida a 37°C	Yoon, S., <i>et al.</i> , 2003
rh-tPA	37°C → 32°C, 29°C (B, Sp, SF)	Lectinas GNA, MAA y SNA	Disminución en la manosa terminal del rh-tPA y posibles cambios en la cantidad de ácido siálico α (2,3)	Hendrick, <i>et al.</i> , 2001

IEF: Isoelectroenfoque, HPLC: cromatografía líquida de alta resolución de fase normal/reversa, HPAEC: cromatografía de intercambio aniónico de pH alto, P: perfusión, B: batch, FB: fed-batch, Br: biorreactor, Sp: spinner, SF: medio libre se suero, SB: suero fetal bovino, FT: frasco T, M: microacarreador, HILIC: Cromatografía de interacción hidrofílica.

Como se puede observar en la tabla 9, los cambios observados al disminuir la temperatura a hipotermia moderada dependen de la proteína producida y la línea celular productora. Se ha observado que la TDS puede no generar cambios significativos en el patrón de glicosilación (Bollati-Fogollin, *et al.*, 2004; Hennicke, *et al.*, 2019) y también han sido reportados cambios principalmente en los procesos de siliación (Ahn, *et al.*, 2008; Nam, *et al.*, 2008; Trummer, *et al.*, 2006; Aghamohseni., *et al.* 2017; Rodríguez., *et al.* 2005; Yoon., *et al.*, 2003; Hendrick, *et al.*, 2001) aunque también hay reportes de ligeros cambios en la proporción de glicofomas (Galbraith., *et al.*, 2006), en los procesos de galactosilación (Aghamohseni., *et al.* 2017) y fucosilación (Nam, *et al.*, 2008). Existe una gran variedad en las condiciones probadas como lo son la proteína recombinante por estudiar, la línea celular, la temperatura, las condiciones de cultivo, el método de purificación y en método de análisis de glicosilación, por lo que se dificulta la interpretación de resultados para proponer una explicación. De manera general se puede concluir que dada la complejidad de la N-glicosilación, los mecanismos de regulación y debido a que es un proceso enzimático, la disminución de la temperatura afecta el patrón de glicosilación de la proteína recombinante, probablemente debido a un cambio en la expresión y/o actividad de las enzimas de la vía de N-glicosilación, en la disponibilidad de precursores energéticos e incluso el plegamiento adecuado de la proteína recombinante, lo cual se refleja en el aumento de la heterogeneidad de las glicoproteínas (Higgins., 2010; Walsh., & Jefferis., 2006; Palomares., *et al.*, 2006).

2.4. Efecto de la Hipotermia Moderada sobre la Glicosilación del el Activador de Plasminógeno Tisular

2.4.1. Activador de Plasminógeno Tisular

El t-PA es una proteína proteolítica implicada en la disolución de coágulos de la sangre, específicamente, es una serin proteasa que se encuentra en las células endoteliales. El t-PA se relaciona con la regulación de la fibrinólisis (Figura 7) ya que cataliza la conversión de plasminógeno a plasmina, la cual es capaz de degradar fibrina y así poder disolver trombos o coágulos (Kim., *et al.* 2012). El t-PA se secreta por células endoteliales y ejerce su efecto primario en el sistema vascular donde tiene una concentración de 1-100 ng/mL (Andersen., *et al.* 2000). El t-PA es empleado para el tratamiento de isquemia cerebral, infarto de miocardio provocado por coágulos de sangre o tromboembolismo pulmonar. La primera proteína recombinante terapéutica producida en células de mamífero (CHO), fue el t-PA y el cual fue aprobado por la FDA para su uso clínico en 1987 (Rouf., *et al.* 1996).

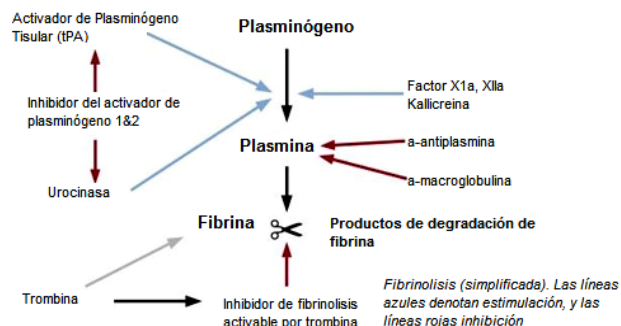


Figura 7. Fibrinólisis. Mecanismo de acción del rh-tPA (Adaptado de Rouf., *et al.* 1996)

Existen dos clases de activadores de plasminógeno humano que han sido reconocidos: el de tipo tisular (tPA) y del tipo uroquinasa (uPA). Estos dos tipos son biológica e inmunológicamente diferentes. La estreptoquinasa producida por varias cepas de *Streptococci* ha sido usado en la práctica clínica. Debido a su origen, su uso se ha asociado con respuestas inmunológicas y reacciones pirogénicas (Rouf., *et al.* 1996). La uroquinasa humana no es antigénica ni pirogénica, pero su extracción de la orina es un proceso costoso y su suministro es limitado para cualquier uso terapéutico extenso. La estreptoquinasa y la uroquinasa activan tanto el plasminógeno, en la circulación, como el

plasminógeno unido a fibrina, llevando a un serio riesgo de hemorragia. El t-PA es mucho más específico en su acción uniéndose a los coágulos de fibrina y activando preferencialmente al plasminógeno atrapado dentro de ellos. El tiempo de vida media en circulación del t-PA es de 2-6 min (Rouf., *et al.* 1996).

El t-PA tiene un peso de 68 kDa, un punto isoeléctrico de 7.6 y está constituido por 527 aminoácidos con una serina en el extremo amino-terminal, 17 puentes disulfuro y 34 cisteínas entre los residuos que contribuyen al doblamiento característico (Collen., & Lijnen., 2004). Aproximadamente el 7% del peso molecular total corresponde a carbohidratos. La acción proteolítica de la plasmina en el medio extracelular escinde la cadena entre la arginina 275 y la isoleucina 276, convirtiéndolo a la forma de doble cadena, en donde las cadenas se unen mediante un solo enlace disulfuro. La forma del t-PA de una y dos cadenas muestran pequeñas diferencias en su actividad fibrinolítica (Rouf., *et al.* 1996).

Existen diferentes regiones en la molécula de t-PA, las cuales son:

- Un dominio de dedo de unión a fibrina cerca del N terminal
- Un dominio de factor de crecimiento epidermal (EGF), dos estructuras tipo “kringle” en bucle disulfuro
- Un dominio serín proteasa carboxilo terminal asociado con la actividad proteolítica.

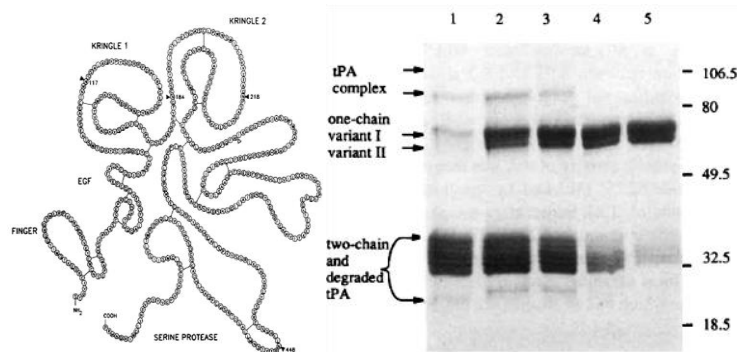


Figura 8. Molécula de t-PA. Los aminoácidos en código de una letra. La punta de flecha abierta indica los sitios potenciales de escisión que generan una molécula de dos cadenas a partir de una molécula de una cadena. Los triángulos sólidos indican los potenciales sitios de glicosilación. Gel SDS-PAGE reductor teñido con azul de Coomassie del t-PA, se puede observar las diferentes bandas características de esta proteína (Adaptada de Rouf., *et al.* 1996 y Lin., *et al.* 1993).

Al inicio, el tPA se extrajo de células de melanoma Bowes humanas, el tPA es muy estable y similar al que se encuentra en tejido humano normal. Esta línea celular puede ser cultivada en suspensión, pero los niveles de producción de t-PA son muy bajos (0.1 mg/L de medio condicionado) para escalamiento en procesos industriales (Rouf., *et al.* 1996).

Tabla 10. Sistemas de producción de rh-tPA reportados.

Sistema productor de rh-tPA	Características	Referencia
Bacterias (<i>Escherichia coli</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - Sin riesgo de producción de proteínas asociadas a tumores ni contaminación por virus animales. - Es un polipéptido de una sola cadena no glicosilado el cual es retenido dentro de la célula como cuerpo de inclusión desnaturalizado e insoluble constituyendo del 5-10% del total de las proteínas celulares. - Producción poco factible debido a la baja recuperación de rh-tPA activo de los cuerpos de inclusión bajo cualquier condición práctica, haciendo la extracción y renaturalización de los cuerpos de inclusión compleja y muy costosa 	Asgari., <i>et al.</i> 2014, Rouf., <i>et al.</i> 1996
Levaduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - Bajo rendimiento - Producto extensivamente hiperglicosilado - Heterogeneidad en el peso molecular - Secreción extracelular no ocurre, por lo que las células deben de ser lisadas para la recuperación del rh-tPA, haciendo más complicado la purificación de los homogenados celulares. 	Darby., <i>et al.</i> , 2012 Vhanmarathi <i>et al.</i> , 2015
Insectos (<i>Drosophila melanogaster</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - La línea celular produce una mezcla del rh-tPA de una y dos cadenas. - Los sitios de glicosilación del rh-tPA producido es consistente con t-PAs recombinantes producidos en mamíferos, y se ha demostrado que este rh-tPA es tan efectivo como el que es producido en células CHO, pero con base en datos farmacocinéticos, el rh-tPA producido en <i>Drosophila</i> se elimina de la circulación más rápido que el producido por células CHO. 	Aflakiyan, <i>et al.</i> , 2013
Plantas (<i>Tabaco</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - Beneficioso para la producción de rh-tPA a bajo costo y a gran escala - Glicosilación distinta a la humana 	Masoumiasl, <i>et al.</i> , 2010; Schiermeyer., <i>et al.</i> , 2005.
Mamíferos	<ul style="list-style-type: none"> - Líneas celulares productoras son: células de fibroblasto de ratón c127 (son complejas, caras y su escalamiento es complicado), células de mieloma de rata y las células CHO (productoras superiores a la mayoría de las células hospederas estudiadas) 	Rouf., <i>et al.</i> 1996

El rh-tPA producido en células CHO ha sido aprobado para su uso clínico en el tratamiento de infarto al miocardio, es un agente trombolítico efectivo con efectos mínimos en los niveles de plasminógeno y fibrinógeno (Spellman, *et al.* 1989).

2.4.2. Glicosilación del Activador del Plasminógeno Tisular

El patrón de glicosilación del tPA humano producido en animales transgénicos es diferente del patrón obtenido cuando el mismo gen se expresa en una línea celular recombinante de ratón. Ambos patrones son a su vez diferentes del patrón humano nativo. La importancia clínica de patrones de glicosilación alterada/microheterogeneidad es mejor determinada por los ensayos clínicos. Si se determina que el producto es seguro y eficaz, se lleva a cabo un análisis de calidad de productos finales de rutina para la microheterogeneidad basada en carbohidratos, con el fin de determinar la consistencia de lote a lote (que es deseable) más que para detectar la microheterogeneidad *per se* (Walsh, 2003).

Se ha reportado en la literatura que la secuencia de aminoácidos del tPA humano contiene 4 sitios de glicosilación potenciales (Asn¹¹⁷, Asn¹⁸⁴, Asn²¹⁸, Asn⁴⁴⁸), de los cuales, solo tres están habitualmente glicosilados (Asn¹¹⁷, Asn¹⁸⁴, Asn⁴⁴⁸), la Asn-184 es de ocupación variable (presente en el tPA de tipo I), esta Asn, así como la Asn-448 (presente en el tPA tipo I y II) están N-glicosilados (estructura de oligosacáridos compleja) y contienen ácido siálico terminal que les protege de la degradación proteolítica y el cual presenta diferencias en la siliación de acuerdo con las condiciones del cultivo celular; el residuo Asn-117 tiene oligomanosilación que es importante en el reconocimiento del tPA por receptores de manosa y galactosa por los hepatocitos para su depuración en el hígado. El sitio Asn-218 no está glicosilado ya que presenta la secuencia Asn-Pro-Ser, donde la prolina, debido a su rotación, interfiere con los procesos de N-glicosilación (Collen., & Lijnen., 2004; Hendrick, *et al.*, 2001). Los complejos de oligosacáridos ligados a N incluyen fucosa, galactosa, N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilneuramínico ligado a $\alpha(2-6)$ o $\alpha(2-3)$, galactosa mientras que los oligosacáridos altos en manosa ligados a N incluyen únicamente manosa terminal $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-6)$ o $\alpha(1-2)$ ligado a manosa (Hendrick, *et al.*, 2001).

El tPA producido en sistemas nativos y recombinantes (rh-tPA) está compuesto por una mezcla de dos glicoproteínas:

- tPA de tipo I: Tiene los tres sitios de glicosilación ocupados (Asn¹¹⁷, Asn¹⁸⁴, Asn⁴⁴⁸).

- tPA de tipo II: Tiene dos sitios glicosilados ocupados (Asn¹¹⁷ y Asn⁴⁴⁸). El tPA de tipo II es 50% más activo que el de tipo I y con una mayor afinidad por la lisina y la fibrina, interfiriendo de este modo con la unión a la lisina del plasminógeno (Bedoya, *et al.*, 2017).

En contraste con el tPA nativo el cual contiene NeuAc α (2-6) ligado a Gal, el t-PA recombinante sintetizado por las células de mamífero en cultivo tiene NeuAc α (2-3) ligado a Gal. Se sugiere que el tPA contiene oligosacáridos ligados a Asn de tipo N-acetilactosamina y altos en manosa (Spellman, *et al.*, 1989). Esta diferencia tiene importancia relativamente baja para la actividad de acuerdo con muchos autores (Spellman, *et al.*, 1989; Parekh, *et al.*, 1989), pero la glicosilación es específica a células, tejidos, estados de diferenciación celular, y es difícil establecer un modelo teórico general para la glicosilación del tPA (Hendrick, *et al.*, 2001)

Tabla 11. Resumen de la Glicosilación del tPA (Adaptada de Borisov, O., *et al.* 2009).

Sitio	Ocupación (%)	Tipo	Formas Mayoritarias
Asn ¹¹⁷	99.6	Alta manosa	Man5:Man6: Man7
Asn ¹⁴²	0.9	Complejo/híbrido	Biantenario
Asn ¹⁸⁴	56.1	Complejo/híbrido	Bi:tri:tetra
Asn ⁴⁴⁸	99.9	Complejo/híbrido	Bi:tri:tetra

2.4.3. Hipotermia moderada y su efecto en la glicosilación del activador de plasminógeno tisular recombinante producido en células CHO

En el caso de la proteína activadora de plasminógeno tisular recombinante (rh-tPA), varios reportes han documentado el incremento tanto de productividad volumétrica, como de la productividad específica (qp) debido a la disminución de la temperatura (TDS, por sus siglas en inglés), como se puede observar algunos ejemplos en la tabla 8. También se ha reportado que la velocidad de crecimiento celular se reduce significativamente (Hendrick, *et al.*, 2001; Bedoya, *et al.*, 2016).

Tabla 12. Efecto de la hipotermia moderada en rh-tPA

Referencia	Temperatura TDS (°C)	PR	Qp (veces)	Prod. Vol. (veces)	Glicosilación
Hendrick., <i>et al.</i> (2001)	37→32	rh-tPA	1.7↑	-	Posible aumento en la mansilación y posibles cambios en la siliación
Vergara., <i>et al.</i> (2009, 2012, 2014)	37→33 37→31 37→33	rh-tPA	1.7↑ 1.5↑ 1.3↑	-	-
Andersen., <i>et al.</i> , 2000	37→33	rh-tPA	-	-	Incremento en la ocupación de sitio (incremento en el rh-tPA de tipo I)
Bedoya., <i>et al.</i> , 2016	37→30	rh-tPA	1.6↑	2.6↑	Cambio en la expresión de genes relacionados con la glicosilación

Bedoya., *et al.*, realizaron un estudio transcriptómico y proteómico de la respuesta de las células CHO TF70R productoras de rh-tPA a la TDS (37°C a 30°C). Las células fueron cultivadas durante 48 h a 37°C en matraces agitados, la mitad de los matraces se continuó a 37°C (control) y la otra mitad se cambió a 30°C (cultivos bifásicos). Lo que se encontró fue que la hipotermia moderada causa que las células en los cultivos bifásicos disminuyan la velocidad máxima de crecimiento, aumenten su viabilidad y la mantengan por un mayor tiempo, se dé un aumento de 2.2 veces en la productividad volumétrica y 1.6 veces en la qp del rh-tPA, se incrementa el consumo de glucosa en un 11%, mientras que la producción de lactato disminuye en un 19% a comparación con los cultivos de células CHO control. El análisis de la respuesta transcriptómica de estas células usando secuenciación de nueva generación logró caracterizar el comportamiento celular asociado a la disminución de 37°C a 30°C. Se tomaron los puntos a las 24 h y 48 h después del cambio de temperatura ya que es donde las células se encontraban próximas a alcanzar el máximo de producción de PR (24 h) y una vez que lo han alcanzado (48 h) antes de que los cultivos comenzaran a disminuir su viabilidad. Lo que se encontró es que varios genes relacionados con la energía el metabolismo central, la evasión de la apoptosis, así como el arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 se encontraban sobre expresados.

El gen que codifica para rh-tPA no se expresó diferencialmente, sin embargo, se observó un incremento en la estabilización del RNA total con respecto a las células control, lo cual sugiere que el aumento del rh-tPA puede ser debido a cambios post transcripcionales como la estabilización del mRNA o por cambios postraduccionales en la vía de secreción. También se detectaron fluctuaciones en los transcritos que codifican las proteínas implicadas en la maquinaria secretora, particularmente en la glicosilación (Bedoya, *et al.*, 2016). Diferentes enzimas que remodelan proteínas en el lumen del retículo endoplasmático participan en la N-glicosilación. Estas enzimas incluyen a la oligosacariltransferasa, glucosidasas I (GIsI) y II (GIsII), y la UDP-Glc: glicoproteín glucosiltransferasa (UGGT1), que es también un sensor plegable en el control de calidad del retículo endoplasmático. Se ha demostrado que después de 24h del tratamiento con hipotermia moderada, el gen *Mogs* (Glucosidasa I) es regulado a la baja; después de 48 h de tratamiento, hay una regulación a la baja del gen que codifica para la UGGT1.

Otros genes relacionados con enzimas que modifican los perfiles de glicosilación son sobreexpresados después de 48 h de tratamiento (como *Neu1* y *Neu2*, los cuales codifican para Sialidasas 1 y 2 que participan en la remoción de residuos de ácido siálico). De manera similar, la hipotermia moderada causa la sobreexpresión de *FucA1*, *Fut1* (relacionado con la fucosilación), así como la represión de *Fut1*, *Galnt1*, *Galnt7*, *Galnt10* y *Galnt13*. El gen *Pmm1*, el cual codifica para una enzima que participa en la síntesis de GDP-manosa y dolicol-fosfato-manosa, esta sobre expresado en condiciones de TDS. Los hallazgos sugieren que el tratamiento con TDS modifica el procesamiento de proteínas pudiendo afectar directamente la producción de rh-tPA, ya que este contiene varios sitios de glicosilación que pueden ser modificados debido a los cambios en la expresión de las proteínas ya mencionadas (Bedoya, *et al.*, 2016).

Los datos del análisis transcriptómico indican que la TDS puede causar cambios en los patrones de glicosilación del rh-tPA (Bedoya, *et al.*, 2016).

Andersen, *et al.* en el 2000, realizó un estudio con respecto a la modificación de la macro heterogeneidad del rh-tPA en respuesta al tratamiento con TDS.

En este reporte, se describe el efecto de la TDS en la ocupación del sitio Asn-184 del rh-tPA producido en células CHO, para esto, las células CHO DUKX transfectadas establemente para producir rh-tPA se inocularon ya sea en matraces agitados de 250 mL o en frascos T de 25 cm² y se incubaron a 33°C o a 37°C. Lo que se observó fue que debido al tratamiento con TDS, hay un incremento en la ocupación de sitio (incremento en el rh-tPA de tipo I) tanto en el rh-tPA producido en matraces agitados a 33°C, como en el rh-tPA producido en frascos T de 25 cm² a comparación de las células en el cultivo control a 37°C. Este trabajo demuestra que la N-glicosilación/ocupación de sitio del rh-tPA es dependiente del estado de crecimiento del cultivo. El cambio en la temperatura a 30°C en cultivos en batch de células CHO incrementan dramáticamente la fracción de células en fase G₀/G₁ (Andersen., *et al.* 2000).

El grupo de Hendrick trabajó con la línea CHO TF70R. Las células fueron expuestas a hipotermia moderada (37°C a 32°C); primero, se cultivaron las células en frascos agitados durante 72h, posteriormente, la mitad del volumen de estos frascos se continuó creciendo a 37°C (control) y la otra mitad se cambió a 32°C (cultivos bifásicos), ambas condiciones se continuaron hasta las 168h y se tomaron muestras cada 24h.

Se determinaron los cambios en la viabilidad celular, producción de rh-tPA intra y extracelular, la actividad del rh-tPA, así como la diferencia en el patrón de glicosilación del rh-tPA. Lo que se observó fue que las células CHO-TF70R en los cultivos bifásicos presentaban una menor concentración de células viables, una mayor concentración de rh-tPA extracelular y un incremento significativo, pero transitorio (a las 96 h de cultivo incrementa y disminuye a las 120 h) en la cantidad de rh-tPA intracelular a comparación con las células CHO-TF70R control (mantenidas a 37°C durante las 168 h).

Se reportó la presencia de dos tipos de rh-tPA, el rh-tPA de cadena sencilla (sc rh-tPA) y el rh-tPA de cadena doble (dc rh-tPA) formado mediante la escisión proteolítica del sc-rh-tPA y unido mediante un puente disulfuro, ambos tipos de rh-tPA presentan actividad biológica tanto en los cultivos control, como en los cultivos bifásicos, lo cual indica una buena calidad proteica.

El patrón de glicosilación del rh-tPA fue analizado mediante el uso de lectinas conjugadas con digoxigenina. Se utilizó la lectina GNA (*Galanthus nivalis agglutinin lectin*) la cual

reconoce específicamente estructuras con manosa, la lectina MAA (*Maackia amurensis agglutinina*) que reconoce específicamente el ácido N-acetilneuramínico unido a galactosa en la posición α (2-3) y la lectina SNA (*Sambucus nigra agglutinin lectin*) reconoce específicamente el ácido N-acetilneuramínico unido a galactosa en la posición α (2-6). De manera breve, lo que fue sugerido es que el *cambio* de temperatura podría causar que en las células en los cultivos bifásicos haya una disminución en la cantidad de manosa en el sc rh-tPA a las 24-48 h después del cambio de temperatura, mientras que el contenido de ácido siálico se mantiene “sin cambios” de acuerdo con los autores. El efecto de la hipotermia sobre el patrón de glicosilación debe ser estudiado mediante otras herramientas que permitan determinar las diferencias en la glicosilación de manera más precisa (Hendrick, *et al.*, 2001).

A pesar de que en el estudio de Hendrick no se observan cambios en el ácido N-acetilneuramínico, en el artículo de Bedoya se menciona que el gen que codifica para las sialiltransferasas a 2-3 (*ST3Gal1*) no cambia su expresión en el análisis transcriptómico, pero los genes *Neu 1* y *2* (los cuales codifican para las sialidasas 1 y 2 respectivamente) están sobre expresados, lo cual podría estar relacionado con el contenido de ácido siálico (Bedoya, *et al.*, 2016; Hendrick, *et al.*, 2001).

Con estos antecedentes, en este proyecto se pretende evaluar cómo es que la hipotermia moderada afecta la producción del rh-tPA, además se determinará el patrón de glicosilación de este y cómo es que se ve afectado por las modificaciones en la temperatura (TDS) en un modelo de células CHO TF70R productoras de rh-tPA.

3. HIPÓTESIS

La hipotermia moderada afecta la micro heterogeneidad de la glicosilación del activador de plasminógeno tisular humano recombinante (rh-tPA) en cultivos de células CHO TF70R.

4. OBJETIVOS

4.1 *Objetivo General*

- Evaluar el efecto que tiene la hipotermia moderada sobre la micro heterogeneidad de la glicosilación del rh-tPA producido en la línea celular CHO TF70R.

4.2 *Objetivos Específicos*

- Determinar el efecto de la hipotermia moderada (cambio de temperatura de 37°C a 30°C a las 48 h de cultivo) sobre los comportamientos cinéticos, productividad específica y volumétrica de rh-tPA, así como los parámetros de consumo/producción de glucosa, lactato, glutamina, glutamato y pH entre el cultivo a 37°C (control) y el cultivo bifásico.
- Determinar el efecto de la hipotermia moderada sobre las diferencias en la heterogeneidad de la glicosilación del rh-tPA en el cultivo a 37°C y el cultivo bifásico a 30°C

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Línea celular y medio: Se usó la línea celular CHO TF70R que expresa la proteína recombinante rh-tPA. Las células se cultivaron a 37°C y una atmosfera con 5% de CO₂ utilizando medio químicamente definido ActiPro HyClone™ (GE Healthcare) libre de componentes derivados de animales y suplementado con L-Glutamina 6 mM, insulina 4 µg/MI (Humulin, Eli Lill), metrotexato 0.4 mg/mL (Pfizer) y PowerFeedA al 10% (Sartorius).

Cultivos Celulares: Las células se incubaron en frascos T de 75 cm² a 37°C y 5% de CO₂. Se crecieron los inóculos en frascos T de 75 cm² a 37°C y 5% de CO₂ y posteriormente se inocularon los matraces Erlenmeyer de 250 mL (Corning®) 0.35x10⁶ células/mL con una viabilidad >90% en un volumen final de 40 mL a 80 rpm. Los cultivos bifásicos se mantuvieron a 37°C durante 48 h y posteriormente se cambiaron a 30°C, mientras que los cultivos control se continuaron a 37°C. Para el caso de la cinética de crecimiento, se realizaron triplicados de ambas condiciones y se continuo la cinética hasta que los cultivos alcanzaron una viabilidad <60%, se tomaron muestras dos veces al día durante toda la cinética para la cuantificación de células viables y metabolitos celulares. Para el caso de la cinética para purificación de rh-tPA, se continuaron los cultivos hasta las 96 h y se colocaron 13 matraces para cada condición, las muestras se tomaron dos veces al día durante toda la cinética para la cuantificación de células viables y metabolitos celulares.

Concentración y Viabilidad Celular: Se determinó la cantidad de células y la viabilidad de estas mediante el conteo en cámara Neubauer y azul de tripano (Strober, 2001).

Cuantificación de metabolitos por BioProfile® FLEX2: Se determinó la concentración de glucosa, glutamina, glutamato, lactato, amonio, Ca²⁺, K⁺, Na⁺ y pH del medio mediante el equipo BioProfile® FLEX2 (Nova Biomedical). Las mediciones se realizaron a las muestras tomadas en cada condición por triplicado. Todos los metabolitos son cuantificados mediante el uso de biosensores (electrodos amperométricos que tienen enzimas movilizadas en sus membranas, en presencia de oxígeno y el sustrato a medir, estas membranas producen H₂O₂ el cual se oxida en un ánodo de platino mantenido a un potencial constante; el flujo resultante de electrones y el cambio de corriente es

proporcional a la concentración de muestra), el pH es cuantificado mediante electrodos potenciométricos.

Medición del oxígeno disuelto (DO): Las mediciones de oxígeno disuelto en los cultivos de células CHO fueron monitoreados en línea usando el lector óptico Fibox 3 con el sensor PSt3 y el software OxyView PST3v602 (PreSens, Regensburg, Germany). El parche del sensor óptico fue adherido al fondo de cada matraz, que se colocó sobre una base específicamente diseñada para que el dispositivo que transmite la señal y el sensor se sobrepusieran a menos de 2 mm de distancia en la agitadora. El contacto del sensor óptico y la fase líquida depende de la posición del parche dentro del matraz, por lo que los parches se colocaron al fondo del matraz alejados del centro del matraz a una distancia de 19 mm (matraz de 250 mL). Se tuvo cuidado de que el sensor mantuviera contacto con el líquido durante las mediciones, las cuales se realizaron por duplicado para cada condición. El sensor óptico se calibró para leer 0% de saturación con aire con una solución de Na_2SO_3 (0.3M) y CoCl_2 ($\leq 5 \times 10^{-7}$ M); y el 100% con agua aireada y saturada en el sistema de agitación correspondiente (según el protocolo de PreSens, Regensburg, Germany) (Reynoso., 2016; Garcia-Ochoa., & Gomez., 2009; Hansen, *et al.*, 2011).

Cuantificación del rh-tPA: Se determinó la concentración y se calculó la productividad del rh-tPA en el sobrenadante mediante la técnica de ELISA, usando anticuerpo monoclonal de ratón anti-tPA humano (Genetex GTX79604) y anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (HRP). La reacción se reveló con el reactivo OPC (o-phenylenediamine dihydrochloride) y se midió a 450 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific).

Calculos: La velocidad específica de crecimiento (μ) se calculó de la pendiente obtenida al graficar el Ln de la concentración de células viables contra el tiempo en horas durante la fase exponencial del cultivo (en el caso de las células en el cultivo bifásico, este parámetro se obtuvo en la fase exponencial después del cambio de temperatura).

Por otra parte, para el caso del cálculo de productividad/consumos específicos se usó el método de CHvol (abajo se describe el motivo por el cual se usó este método).

La productividad específica (qP) ha sido calculada por diversos autores al menos en tres formas diferentes (Dutton *et al.*, 1998) haciendo difícil la comparación de los valores de qP entre diferentes trabajos.

La primera forma de calcular la qP es a partir de la concentración máxima de producto por hora de cultivo y normalizar con respecto a la concentración media de células. Este cálculo se basa en la suposición de que todas las células se encuentran en un estado fisiológico idéntico en todo el cultivo por lotes (es decir, una población celular homogénea, invariante en el tiempo), aunque esto es biológicamente irrazonable; las células en crecimiento son obviamente fisiológicamente distintas de las células que están muriendo lo que sugiere que cambia a medida que cambia la composición fisiológica de la población celular (Bushell *et al.*, 1993 y Dutton *et al.*, 1998).

$$qPI = \frac{P_{max}}{(X_{avq})(t_f)}$$

La segunda forma de calcular la productividad específica en cultivos en lote es mediante la división de la concentración de proteína recombinante producida entre la concentración de células viables (como lo describe Hayter *et al.*, 1992). Esta forma de calcular suele indicar que la productividad aumenta durante la fase de declive cuando el número de células viables es muy bajo y está disminuyendo, sin embargo, no existe una justificación biológica para esta tasa de producción aparentemente muy alta a partir de tan pocas células que se encuentran en estado de muerte. Más bien, este fenómeno aparente es un artefacto que surge de comparar la producción acumulada de proteína recombinante con la medición instantánea de la capacidad biológica de producción (es decir, el número de células).

$$qPII = \left(\sum_{i=i}^f \left(\frac{(P_{j+i} - P_j)}{(X_{vj+1} - X_v)} \right) \right) * \frac{\mu}{n} \quad qP = \frac{(P1-P0)*\mu}{(X1-X0)}$$

Una tercera forma de calcular la qP es mediante el uso del Índice de Viabilidad (VI por sus siglas en inglés, propuesta por Luan *et al.*, 1987), el cual está definido como: "El número de células viables en cada recuento integrado durante la duración del experimento". Sus datos ilustraron "una muy buena correlación directa entre el índice de

viabilidad y la concentración acumulativa de proteína recombinante durante todo el curso de un cultivo de hibridoma por lote".

$$qP_{III} = \frac{\text{Concentración de proteína (o metabolito)}}{VI}$$

$VI = \text{Integral de células viables}$

Dado que la síntesis y secreción de proteínas es una propiedad espaciotemporal de las células vivas, la expresión de la producción como la integral de las células viables (es decir, el período acumulativo de tiempo que las células vivas han estado presentes en el cultivo en lote) por unidad de volumen es un enfoque útil. Sin embargo, el índice de viabilidad es un término vago, y Dutton *et al.*, 1998 propuso reemplazar este por el término "cumulative volumetric cellhours" o CHvol.

CHvol esta definido como el número acumulado de horas pasadas en el medio por todas las células viables. Con respecto a la productividad, CHvol representa la vida útil acumulativa productiva de las células en el medio (biorreactor). Es fundamental reconocer que una célula tiene el potencial de producir tanta proteína recombinante en diez horas como diez células pueden producir en una hora. En ambos casos, el número total de horas de producción es idéntico. El uso del parámetro CHvol permite evaluar la productividad y la capacidad biológica de producción sobre la misma base (acumulativa).

En este trabajo los parámetros de la productividad especifican y consumo/producción específico de glucosa, lactato, glutamina, amonio y glutamato (según corresponda) se evaluaron sobre la misma base (acumulativa, como describe Dutton *et al.*, 1998 y 1999 y De Alwis, *et al.*, 2007). Las CHvol es una medida del tiempo acumulado que pasan en el cultivo todas las células viables. Este parámetro es la transformación de la densidad celular viable en la capacidad biológica acumulada de producción (una célula tiene el potencial de producir tanta proteína en diez horas como diez células pueden producir en una hora) y es calculada de la siguiente manera:

$$CH_{vol} = \left(\sum_{i=i}^f \left(\frac{(X_{Vj+i} - X_{Vj})}{\ln(X_{vj+1}/X_{vj})} \right) \right) * (t_{j+1} - t_j)$$

La productividad específica de proteína qP_{rh-tPA} (o consumo/producción de metabolitos), se calculó como la pendiente al hacer la regresión lineal de la grafica de la concentración acumulativa de rh-tPA (o metabolitos) contra las horas celulares volumétricas acumuladas (CH_{vol}) durante la fase de producción o consumo:

$$qP_{rh-tPA} = \frac{\text{Concentración de proteína (o metabolito)}}{CH_{vol}}$$

Donde:

qP= Productividad/consumo específico según corresponda

t_{j+1}= Tiempo n

t_j=Tiempo inicial

X_{vj+i}= Concentración de células viables al tiempo n

X_{vj}= Concentración de células viables al tiempo inicial

Extracción de Proteínas: Las muestras colectadas a las 96 h de cultivo se centrifugaron a 1000 rpm por 5 min y se separó el sobrenadante del concentrado celular (pellet). A ambas muestras se les adicionó inhibidor de proteasas (Complete® Sigma Aldrich) y se guardaron a -80°C (Clokic., 2018).

Las muestras se cuantificaron mediante Nanodrop (A280 1 Abs= 1 mg/mL) y mediante el método de Bradford en placas de 96 pozos en un lector de microplacas a 600 nm. Las muestras fueron guardadas a -80°C hasta su análisis (Simon., & Hofmann, 2018).

Identificación del rh-tPA en geles de electroforesis SDS-PAGE Western Blot: Se identificó el rh-tPA obtenido del sobrenadante mediante geles desnaturalizantes SDS-PAGE al 12% teñidos con azul de Coomassie. Para la detección por Western Blot, se usaron membranas de PVDF y anticuerpo monoclonal de ratón anti-tPA humano (Genetex GTX79604) dilución 1:2000 por 1h a temperatura ambiente y anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (HRP) dilución 1:2000 por 2h a temperatura ambiente. Se revelaron las membranas mediante quimioluminiscencia (Rapley., 2018).

Purificación rh-tPA: Se utilizó cromatografía de afinidad Lysine Hyper D (Pall), ya que la lisina se une a la región Kringle 2 del rh-tPA. Las muestras en los sobrenadantes fueron descongeladas en un baño de agua a 37°C, filtradas a través de una membrana de 0.22 µm y cargadas en una columna empacada de Lysine Hyper D usando un FPLC (Bio-Rad) pre-equilibrada con un buffer con 50 mM de fosfato de sodio y 0.01% de polisorbato 80 a pH 7.5. Después de cargar la muestra, los contaminantes fueron removidos con 3 lavados: el primero con el buffer de equilibrio (50 mM de fosfato de sodio y 0.01% de polisorbato 80 a pH 7.5), el segundo con un buffer con 40 mM Tris, 800 mM NaCl, 10 mM de arginina y 0.08% de polisorbato 80 a pH 8.0 y finalmente con un lavado con el buffer de equilibrio. El rh-tPA fue eluido con un buffer de 500 mM de L-arginina y guardado a -80 °C. La pureza e identidad del rh-tPA de las muestras fueron analizadas mediante de electroforesis SDS-PAGE, western blot y HPLC.

Para este último, la muestra purificada obtenida del cultivo en matraces Erlenmeyer de 250 mL 37°C y de los cultivos bifásicos a 30°C por 96 h se compararon con el rh-tPA estándar (rh-tPA comercial Acetylse de Boehringer Ingelheim).

Primeramente, todas las muestras se filtraron por 0.22 µm y se inyectaron directamente en el equipo de HPLC Shimadzu, con una columna VARIAN Pursuit 5 C18, 150x 4.6 mm, con un flujo 0.8 mL/min, a 50°C, la fase móvil: solvente A (0.1% TFA en H₂O) y solvente B (0.1% TFA en acetonitrilo) y elución de 0-60% del solvente B. La detección se realizó a 226 y 280 nm (Xu., & Cacia., 2000; Gillmeister., *et al.* 2009).

Tiempo (min)	%Concentración de Solvente B (0.1% TFA en acetonitrilo)
0-5	0%
5-65	0-60%

Análisis de la expresión génica por RT-qPCR: Se tomaron muestras por triplicado a las 48 h cultivo (37°C, cultivo control) y a las 96 h de cultivo (48 h a 37°C y 48 h a 30°C, cultivos bifásicos). De estas muestras se realizó la extracción de RNA total usando el kit RNAeasy Mini Kit (quiagen, Hilden, Germany) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración de RNA se determinó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260/280 en un NanoDrop y la integridad y pureza del RNA se determinó con la relación 260/280 y corriendo 2 µL integridad mediante geles de agarosa al 2% (preparado con agua libre de RNAsas, buffer TBE 1x y 1 mg/mL de bromuro de etidio) a 80V por 30 min.

El DNA complementario (cDNA) fue sintetizado usando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit con oligo dT (Thermo Scientific, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el siguiente protocolo de PCR: 25°C 1 min, 42°C 60 min, 70°C 5 min (Rapley., 2018).

El cDNA se cuantificó por absorbancia a 260/280 y se realizaron diluciones con agua libre de nucleasas para tener una concentración de reacción de cDNA de 50 ng/μL (concentración comprobada por nanodrop midiendo absorbancia 260/280 nm ssDNA). Se hicieron reacciones de 12 μL con 100 ng/μL de cDNA, SYBR Green Máster Mix, y 420 nM de oligonucleotido sentido y antisentido QuantiNova® SYBR® Green RT-PCR Kit. Las condiciones de amplificación se realizaron en un termociclador Thermo Scientific™ PikoReal™ y consistieron en un paso inicial de 2 min a 95°C, posteriormente 40 ciclos de 95°C 15s y 64°C 1 min (la temperatura de alineamiento se estableció a 64°C pues se observó que las temperaturas de fusión T_m de todos los oligos oscilaban entre los 64 y los 70°C, además de que la presencia y eficiencia de amplificación de los mismos fueron previamente demostradas por Hidalgo., 2010 (Anexo 1), 60°C por 30s.

La especificidad de las reacciones de amplificación fue confirmada en línea analizando la curva de disociación. Los datos fueron analizados en el software PikoReal 2.1™ (Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA) usando el método de 2 ΔΔC_q y normalizando con respecto al gen control GAPDH (housekeeping).

Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y se incluyeron controles negativos. Previamente, fue reportado por Brown., 2018 que para la línea CHO TF70R en condiciones de hipotermia, GAPDH es uno de los mejores genes de referencia, además de que en este trabajo se evaluó que la expresión de este gen no cambiara en ambas condiciones de temperatura.

$$r = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

ΔΔC_q está dado por:

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq, cp - \Delta Cq, cc$$

cp es la condición problema (cultivos bifásicos) y cc en la condición de temperatura control a 37°C

A su vez, dichas diferencias (ΔC_q) están dadas por:

$$\Delta C_{q,x} = C_{q,i} - C_{q,hx}$$

Dónde:

$C_{q,i}$ es el ciclo umbral para la amplificación de cada gen problema

$C_{q,h,k}$ es el ciclo umbral para la amplificación del gen de referencia

$\Delta C_{q,x}$ es la diferencia de C_q para x condición (problema o control)

Análisis del Patrón de Glicosilación del rh-tPA: El rh-tPA purificado de cada condición (100 μ g) fue desnaturalizado con 2% de SDS y 1M de 2- β -mercaptoetanol y los N-glicanos fueron liberados por una digestión con 1U PNGasa F (*Chryseobacterium meningosepticum*) por 18h a 37°C.

Los glicanos fueron marcados con 2-aminobenzamida con el kit signal 2AB y separados mediante HPLC con una columna GlycoSep N utilizando un gradiente de acetonitrilo a 25 o 250 nM de formato de amonio, pH 4.4 como es descrito por Guile *et al.*, (1996). Los glicanos fueron detectados con un detector de fluorescencia. Un homopolímero estándar de glucosa fue utilizado para asignar las unidades de glucosa a los tiempos de elución mediante datos procedentes de un cromatograma estándar a una ecuación polinomial como es descrito por Guile *et al.*, 1997).

Los cromatogramas fueron integrados utilizando el software Milenium 32. La cantidad de glicanos fue reportada como el total de cantidad detectada. Las estructuras fueron propuestas para cada pico basadas en su migración en unidades de glucosa y su susceptibilidad a digestiones individuales con exoglicosidasas.

Los glicanos obtenidos de 3 μ g de proteína purificada fueron digeridos por 18 h a 37°C. Las exoglicosidasas utilizadas fueron α -manosidasa, β -galactosidasa, β -N-acetylhexosaminidasa, α -fucosidasa, y sialidasa I.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La hipotermia moderada afecta el crecimiento celular, la viabilidad, el consumo/producción de metabolitos, el consumo de oxígeno y la producción de rh-tPA en las Células CHO TF70R

Efecto de la TDS sobre el crecimiento y viabilidad celular

Se cultivó la línea celular CHO TF70R que expresa la proteína recombinante rh-tPA en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Primero, se preparó el inóculo, para lo cual, se descongeló la línea celular CHOTF70R y se colocó en frascos T de 25 cm² a 37°C, 5% de CO₂ con un volumen final de 10 mL de medio ActiPro HyClone (libre de componentes derivados de animales y suplementado con L-Glutamina 6 mM, insulina 4 µg/mL, metrotexato 0.4 mg/ml y PowerFeedA al 10%).

Al alcanzar una densidad celular de aproximadamente 3x10⁶ cel/mL, se pasaron las células a frascos T de 75 cm², 37°C, 5% de CO₂ y se agregó 30 mL de medio ActiPro HyClone (libre de componentes derivados de animales y suplementado con L-Glutamina 6 mM, insulina 4 µg/mL, metrotexato 0.4 mg/ml y powerFeedA al 10%) a una concentración celular final de 0.35x10⁶ cel/mL.

Las células se dejaron crecer en dichos frascos T de 75 cm² hasta alcanzar la concentración celular requerida para inocular los matraces Erlenmeyer de 250 mL con una concentración inicial de 0.35x10⁶ células/mL (viabilidad >90%) en un volumen final de 40 mL de medio. Los cultivos en los matraces Erlenmeyer fueron crecidos por triplicado a 37°C, 5% CO₂ con una agitación de 80 rpm. Las células control a 37°C se mantuvieron en las mismas condiciones y se continuó el cultivo hasta que alcanzaron una viabilidad menor al 60%. Las células de los cultivos bifásicos se dejaron crecer durante 48 h a 37°C y posteriormente se les cambió la temperatura a 30°C y se continuó el cultivo hasta que alcanzaron una viabilidad menor al 60%. Las muestras se tomaron cada 12 h durante todo el tiempo de cultivo y se realizaron triplicados de los cultivos para cada condición de temperatura.

Para obtener la muestra necesaria para la posterior purificación de rh-tPA, las células se cultivaron de la misma manera descrita, pero se inocularon 13 matraces por condición

de temperatura para obtener un volumen final de 520 mL; los cultivos se colectaron a las 96 h para ambas condiciones de temperatura (control y TDS).

Los resultados obtenidos mostraron que para las células cultivadas a 37°C (control), la concentración celular máxima alcanzada al día de cultivo 7 (166 h) fue de $13.18 \pm 0.44 \times 10^6$ células/mL con viabilidad por arriba del 90% durante este tiempo. La μ (calculada durante la fase exponencial) fue de $0.030 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$ (Figura 9A y Tabla 13).

Para el caso del cultivo bifásico (TDS), la concentración celular máxima viable alcanzada al día de cultivo 12 (287h) fue de $2.82 \pm 0.06 \times 10^6$ células/mL y la viabilidad celular se mantuvo por arriba del 95% durante 14 días de cultivo (334 h, el doble de tiempo que las células control). La μ calculada (durante la fase exponencial después del cambio de temperatura) fue de $0.005 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$ (Figura 9B y Tabla 13).

Tabla 13. Parámetros obtenidos de la cinética de las células cultivadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL (Corning®) con 40 mL de medio ActiPro suplementado, a 37°C (control) y el cultivo bifásico (37°C a 30°C).

Parámetros	Control 37°C	Bifásico (37-30°C)
Concentración Max Células Viables (10^6 células/mL)	13.18±0.44	2.82±0.06
Viabilidad (%)	97.45±1.06	97.0±0.98
μ (h-1)	0.030±0.001	0.005±0.001

* después del cambio de temperatura.

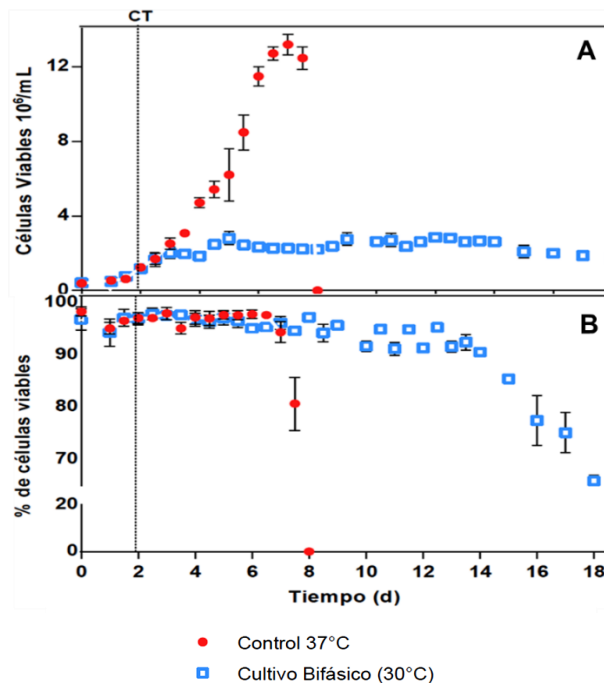


Figura 9. Efecto de la hipotermia moderada sobre la concentración y viabilidad celular. En esta Figura se pueden observar las gráficas de: **A)** Concentración celular en millones de células por mL, **B)** la viabilidad celular de las células CHO TF70R cultivadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL en condiciones control a 37°C (círculos rojos, círculos negros) y los cultivos bajo hipotermia moderada (bifásico, cambio de temperatura a las 48h de cultivo) a 30°C (cuadros azules, cuadros negros) por triplicado. Bajo condiciones de hipotermia moderada, los cultivos bifásicos muestran una disminución en el crecimiento celular y el mantenimiento de la viabilidad celular (> 90%) por un mayor tiempo. **CT:** Cambio de temperatura **d:** días

En la tabla 14, se muestra la concentración celular máxima, la viabilidad, μ y productividad alcanzada por diferentes autores que cultivaron la línea celular CHOTF70R productora de rh-tPA en condiciones de hipotermia moderada.

La concentración celular máxima de células alcanzada en este trabajo fue de 3.5 a 8.7 veces mayor (para el caso de los cultivos control) y la viabilidad se mantuvo por arriba del 90% por hasta el doble del tiempo (para ambas condiciones de cultivo) que los valores reportados previamente (Hendrick., *et al.*, 2001, Vergara., *et al.*, 2012 y 2014, Avello., *et al.*, 2017, Barrón *et al.*, 2019 y Bedoya, *et al.*, 2016) y esto se puede atribuir al medio de cultivo usado y a la adición de suplementos (PowerFeedA). Por ejemplo, para el caso de la línea celular CHO DP-12 productora de un anticuerpo anti IL-8 cultivada en lote con el medio de cultivo CHOMACS se reportó la concentración de 12-13.6x10⁶ células/mL alcanzada a los 8 días de cultivo en frascos agitados de 250 mL

(Wippermann., *et al.*, 2017) y de acuerdo con los autores, esto se debió al medio de cultivo usado.

Pérez-Rodríguez., *et al.*, (2020) reportó los efectos de la adición del suplemento PowerFeedA sobre la cinética de crecimiento, la productividad y el metabolismo celular de dos líneas celulares CHO productoras de un anticuerpo monoclonal en un cultivo discontinuo. Se reportó que los cultivos suplementados aumentaron la concentración celular máxima en un 69% y la longevidad celular más allá de las 36 h, manteniendo la viabilidad por encima del 90%. La concentración de anticuerpo (Mab) producido aumentó hasta 2,5 veces y se redujo 10 veces la acumulación de lactato. Los autores concluyen que la suplementación del medio de cultivo de producción podría favorecer las vías anapleróticas de TCA y superar las limitaciones de lípidos, lo que resulta en efectos favorables observados durante la producción de MAb.

En el mismo sentido, en este trabajo, el suplemento PowerFeedA fue utilizado y la mejora en el crecimiento y viabilidad de los cultivos a comparación de reportes previos (Tabla 14) se puede atribuir al uso de este.

Tabla 14. Tabla comparativa de valores de concentración celular máxima, viabilidad, μ , productividad volumétrica y específica reportados y obtenidos en este trabajo para la línea celular CHO TF70R productora de rh-tPA en cultivos tipo lote (batch).

Línea Celular rh-tPA	Modo de Cultivo/Medio	Temp (°C)	Con Celular Max (10 ⁶ cel/mL)/ día	Viabilidad Celular (%) / día	μ (h ⁻¹)	Producción Volumétrica (mg/L)/ q rh-tPA	Referencia	
CHO TF70R	Lote/- Cambio T a 72h	37	1.5 / 5	-	-	7 μ g/mL/-	Hendrick., <i>et al.</i> 2001	
		32	1/ 5	-	-	14 μ g/mL/-		
CHO TF70R	Lote/BIOPRO1	Gluc	37	-	>85% / 7	0.012	-/36.2 ng/10 ⁶ *h	Vergara., <i>et al.</i> 2012
			34	-	>85% / 8	0.0094	-/47.8 ng/10 ⁶ *h	
			31	-	>85% / 13	0.0078	-/56.1 ng/10 ⁶ *h	
		Gal	37	-	>85% / 7	0.0090	-/34.4 ng/10 ⁶ *h	
			34	-	>85% / 7	0.0089	-/42.4 ng/10 ⁶ *h	
			31	-	>85% / 11	0.0024	-/14.5 ng/10 ⁶ *h	
CHO TF70R	Lote/HyClone SFM4CHO	37	1.5/ 1	>95%/ 1	-	~40 ng/mL/~22 ng/10 ⁶ *h	Vergara., <i>et al.</i> 2015	
		33	1.1/ 1	>95%/ 1	-	~25 ng/mL/~29 ng/10 ⁶ *h		
CHO TF70R	Lote/CD-OptiCHO Cambio T a 48h	37	2.7± 0.15/ 4	>85%/ 4	0.021±0.02	4.60± 1.20 mg/L/ 0.53± 0.02 pg/cel*d	Bedoya., <i>et al.</i> 2016	
		30	2.67± 0.10/ 8	>75%/ 10	0.005±0.001	11.15± 0.40 mg/L / 0.82± 0.03 pg/cel*d		
CHO TF70R	Lote/HyClone SFM4CHO	37	3.6/ 6	>95%/ 6	0.025±0.001	70 ng/mL/1.70±0.06 ng/10 ⁶ *h	Avello., <i>et al.</i> 2017	
		33	2.5/ 6	>95%/ 6	0.019±0.0009	110 ng/mL/2.14± 0.04 ng/10 ⁶ *h		
CHO TF70R	Lote/CDM4CHO Cambio T a 48h	37	1.81/	>90%/ 6	0.0154	4.17 mg/L / 2.49 pg/cel*d	Barrón., <i>et al.</i> 2009	
		30	1.17/7	>80%/ 9	0.0065	11.4 mg/L / 1.44 pg/cel*d		
CHO TF70R (ME)	Lote/ActiPro HyClone + 10%PowerFeedA	37	13.18± 0.55/7	>90%/ 7	0.031±0.001	8.61± 0.32 mg/L / 0.69± 0.02 pg/cel*d	El presente documento	
		30	2.85± 0.12/12	>95%/ 14	0.014±0.002	8.49± 0.49 mg/L / 0.99± 0.01 pg/cel*d		

Con respecto a los valores de la μ calculados, estos son muy similares a los reportados para la línea celular CHO TF70R por Avello *et al*, tanto para los cultivos control a 37°C, como para los cultivos bifásicos a 30°C en los matraces Erlenmeyer de 250 mL. Por otra parte, si comparamos la μ obtenida en el caso de los cultivos control, con la μ obtenida en los cultivos bifásicos, se puede observar una disminución del valor de μ cuando la temperatura disminuye. Este comportamiento ya ha sido reportado para la línea celular CHO TF70R como se puede observar en la tabla 14 (Hendrick., *et al.*, 2001, Vergara., *et al.*, 2012 y 2014, Avello., *et al.*, 2017, Barrón *et al.*, 2019 y Bedoya, *et al.*, 2016).

Por otra parte, cuando comparamos la concentración celular máxima alcanzada y la viabilidad entre el cultivo control y el cultivo bifásico, se puede notar que, en el caso del primer parámetro, este es aproximadamente 4.6 veces menor, mientras que la viabilidad celular se mantiene el doble de tiempo en un porcentaje mayor al 95% para el caso del cultivo bifásico (Figura 9). Esto corresponde al comportamiento ampliamente reportado en la literatura para diferentes líneas celulares CHO (Ver tabla 6) y para la línea celular CHOTF70R productora de rh-tPA (Tabla 14 Hendrick., *et al.*, 2001, Vergara., *et al.*, 2012 y 2014, Avello., *et al.*, 2017, Barrón *et al.*, 2019 y Bedoya, *et al.*, 2016).

Los mecanismos a los cuales se ha asociado este comportamiento son principalmente el arresto del ciclo celular (Fussenegger., 2001; Bollati-Fogolin., *et al.*, 2005; Kaufman., 1999; Yoon., *et al.*, 2004; Fox., *et al.*, 2005; Masterton, *et al.*, 2014) y retraso en la apoptosis (Slikker., *et al.* 2001; Baik., *et al.* 2006; Yee., *et al.*, 2009; Masterton, *et al.*, 2014) como se describió en las Tablas 7 y 8.

En esta sección, de manera breve se puede concluir que la hipotermia moderada disminuye la concentración celular máxima alcanzada en el cultivo y mantiene la viabilidad de estos por arriba del 90% un tiempo mayor a comparación de los cultivos crecidos a una temperatura de 37°C.

Efecto de la Hipotermia Moderada en el consumo/producción de metabolitos y consumo de oxígeno en células CHO TF70R productoras de rh-tPA

Se realizó la medición de glucosa (Gluc), lactato (Lac), glutamina (Gln), glutamato (Glu), amonio (NH_4^+) y pH mediante el uso del equipo Bioprofile FLEX 2 (Nova Biomedical, ver materiales y métodos).

En la Figura 10 y tabla 15 se puede observar los efectos reportados para las células sometidas a hipotermia moderada, como lo es: disminución en el consumo de glucosa (Gluc) y disminución en la producción de metabolitos tóxicos como el amonio (NH_4^+) y lactato (Lac) (Bedoya, *et al.*, 2016; Vergara, *et al.*, 2012, 2014; Barrón, 2009). También, se ha reportado que la producción y consumo de metabolitos puede afectar la glicosilación de las proteínas recombinantes producidas por células CHO (Butler., 2006; Altamirano., *et al.* 2012; Altamirano, *et al.*, 2001; Duarte., *et al.*, 2014., Ha., & Lee., 2015; Barrón., 2009; Lie., *et al.*, 2019; Chen, *et al.*, 2006), por lo que en este trabajo no se espera que las concentraciones de Gluc, Lac, Gln, Glu y NH_4^+ (como se discute más adelante) afecten el rh-tPA producido en ambas condiciones de cultivo atribuyendo las posibles variaciones en la microheterogeneidad del rh-tPA únicamente al cambio de la temperatura.

Glucosa

Los cultivos en ambas condiciones de temperatura comenzaron con una concentración aproximada de 6 g/L de glucosa. En los cultivos a 37°C, la glucosa fue consumida casi completamente al día 8 de cultivo (remanente de 0.03 ± 0.01 g/L). En los cultivos bifásicos se consume la glucosa hasta llegar a una concentración de 0.3 ± 0.1 g/L al día 18 de cultivo. El consumo específico de glucosa (q_{gluc}) fue de 181.5 ± 2.85 nmol/ 10^6 cel*h para los cultivos a 37°C y 165.4 ± 2.31 nmol/ 10^6 cel*h para los cultivos en TDS. Los datos obtenidos concuerdan con lo publicado por Bedoya, *et al.*, 2016, es decir, los cultivos bifásicos exhibieron menor q_{gluc} que los cultivos a 37°C (Tabla 15).

También es importante mencionar que la caída abrupta en el crecimiento celular, como la observada al día 7 de cultivo a 37°C, no puede atribuirse a los niveles de lactato o

amonio, ni a la depleción de cualquier aminoácido esencial, sino más bien se debe al agotamiento de la glucosa (Altamirano, *et al*, 2006).

Está reportado que la depleción de glucosa podría resultar en un estado de agotamiento o escasez de precursores de glicanos intracelulares derivados de la glucosa. De hecho, niveles por debajo de 0.7 mM de glucosa resultan en la disminución de la siliación y un incremento en los glicanos de tipo alta manosa e híbridos, así como la disminución en la ocupación de sitio de N-glicanos (Butler., 2006). En este caso, a las 96 h de cultivo, donde se recolectaron las muestras para análisis de glicosilación, en ninguna de las dos condiciones de temperatura se observó la depleción de glucosa.

Lactato

Para el caso de lactato, la concentración de lactato máxima alcanzada en los cultivos bifásicos fue de 16.10 ± 0.22 mM y de 19.76 ± 0.00 mM en las células en los cultivos control a 37°C. Es 1.28 veces menor la velocidad de producción de lactato por las células en los cultivos bifásicos (q_{lac} 67.65 ± 2.06 nmol/ 10^6 cell*h) que producido por las células en los cultivos control a 37°C (q_{lac} 164.71 ± 5.15 nmol/ 10^6 cell*h).

El lactato se acumula en ambas condiciones de cultivo, pero en el caso de las células en los cultivos bifásicos, este metabolito se produce en menor cantidad que el producido por las células en los cultivos control (aproximadamente 21.89% menos). En los cultivos bifásicos, el consumo de lactato se observa a partir del día 8 de cultivo, mientras que para el caso de los cultivos control a 37°C, el consumo de lactato ocurre a partir del día de cultivo 6, lo cual coincide con el agotamiento de la glucosa.

Este efecto ya ha sido previamente reportado por Altamirano *et al*, 2006, el consumo de lactato se ha relacionado con el mantenimiento del metabolismo de la célula en ausencia de glucosa. De acuerdo con el estudio realizado por Altamirano, la reacción reversible de la lactato deshidrogenasa produciría piruvato que a su vez se incorporaría al ciclo del TCA para metabolismo oxidativo, dando así energía a la célula con el subsecuente consumo de oxígeno o como otra alternativa, también se podría usar una vía de descarboxilación no oxidativa de piruvato (usando acetaldehído activado producido a

partir de piruvato y generando acetoina como producto de degradación, teoría que requiere la medición experimental de acetoina).

En ambas condiciones de cultivo, la concentración de lactato máxima alcanzada mostró valores menores a 20 mM. Una concentración de entre 20 y 40 mM (3.6 g/L) ha mostrado tener un efecto inhibitorio del crecimiento celular y la disminución de la producción de proteínas recombinantes, lo cual se debe a que la acumulación de lactato en el medio disminuye el pH y cambia la osmolaridad, reduciendo así el crecimiento celular debido a la acidificación (Altamirano, *et al.* 2012; Pereira, *et al.* 2018). En este caso, la concentración de lactato se mantuvo por debajo de 20 mM y el pH del medio no se acidificó en los cultivos control a 37°C ni en los cultivos bifásicos a 30°C, por lo que el efecto dañino del lactato puede ser descartado. Por otra parte, en la literatura no se sugiere que la concentración de lactato pueda afectar la glicosilación.

Glutamina

La glutamina no solo es una fuente de nitrógeno, precursora de pirimidinas, purinas, NAD⁺, sino también es un metabolito anaplerótico que alimenta la biosíntesis y la generación de energía. 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 (Duarte., *et al.*, 2014., Ha., & Lee., 2015; Barrón., 2009).

La glutamina se consume a una mayor velocidad en los cultivos a 37°C a comparación con los cultivos bifásicos a 30°C, llegando a terminarse al día 6 de cultivo para los cultivos control. Para el caso de los cultivos bifásicos, esta no se consume totalmente durante los 18 días de cultivo, a partir del día 6, se puede observar un consumo “constante” (ver Figura 15). La velocidad específica de consumo de glutamina (q_{gln}) para el cultivo a 37°C fue de 73.30 ± 0.54 nmol/10⁶ cel*h mientras que para el cultivo bifásico fue de 69.0 ± 0.85 nmol/10⁶ cell*h (1.06 veces menor que la del cultivo a 37°C)

En cuanto al consumo de glutamina, a diferencia de lo reportado previamente por Bedoya, *et al.*, 2016 donde no se encontraron diferencias en el consumo de este aminoácido en ambas condiciones de cultivo, en este trabajo se encontró que las células

en los cultivos bifásicos consumen menos glutamina que las células en los cultivos a 37°C. La glutamina es la principal fuente de nitrógeno de las células para la síntesis de aminoácidos y se relaciona con la producción de proteínas recombinantes (Altamirano, *et al.*, 2001; Duarte., *et al.*, 2014., Ha., & Lee., 2015; Barrón., 2009), y en este caso, debido a que las células que tienen una mayor producción específica de rh-tPA son las células en los cultivos bifásicos, se esperaba que fueran estas las que presentaran un mayor consumo de glutamina, pero esto no fue así, por lo que el aumento de la proteína recombinante puede deberse al consumo más eficiente de glucosa (Duarte., *et al.*, 2014., Ha., & Lee., 2015) o a la utilización de otros aminoácidos contenidos en el suplemento como fuente de nitrógeno para la producción de proteína recombinante.

Amonio y Glutamato

La glucólisis y la glutaminólisis son los principales mecanismos de producción de ATP, lo que significa que la glucosa y la glutamina son nutrientes cruciales. El metabolismo de la glutamina genera amonio y glutamato mediante la glutaminólisis, una molécula de glutamina se convierte a glutamato mediante la acción de la glutaminasa generando una molécula de amonio, posteriormente, por acción de la glutamato deshidrogenasa se genera α -cetoglutarato y otra molécula de amonio a partir del glutamato (Ha., & Lee., 2015).

La velocidad de producción de amonio fue 1.43 veces menor para el caso de los cultivos bifásicos a comparación de los cultivos control. Ambas condiciones de cultivo presentan una concentración inicial de 2 mM de NH_4^+ (0.04 g/L), y esta concentración se va incrementando conforme transcurre el tiempo de cultivo. Para el caso del cultivo control, la concentración de amonio aumenta hasta llegar a una concentración máxima de 5.8 ± 0.06 mM (0.106 ± 0.001 g/L) y al día 6 se observa la disminución en la concentración (consumo de amonio). Para el caso de los cultivos bifásicos, la concentración máxima de amonio alcanzada fue de 6.4 ± 0.14 mM (0.116 ± 0.002 g/L) al día 8 de cultivo, posteriormente se observa la disminución en la concentración de amonio producido (consumo de amonio), hasta el día 14 de cultivo, donde nuevamente se reanuda la producción de amonio, lo cual coincide con un aumento en la concentración de glutamato y un cese en el consumo de oxígeno.

Como se puede observar en los resultados de la Figura 10, la concentración de glutamato se mantiene constante para ambas condiciones de cultivo independientemente de la temperatura, en el caso de este metabolito, no se encontraron diferencias significativas entre ambas condiciones de temperatura. Al final de ambos cultivos se puede observar un aumento en la concentración de glutamato, lo cual puede deberse al metabolismo de la glutamina (Pereira, *et al.* 2018).

El amonio se puede utilizar como una fuente de nitrógeno alternativa a la glutamina (o en un entorno con deficiencia de glutamina) para apoyar la proliferación celular. Este efecto puede explicarse debido al efecto de la glutamina sintetasa y su habilidad para reducir la acumulación de amonio (Lie., *et al.*, 2019; McAtee., *et al.* 2014). La línea celular CHO TF70R cuenta con la actividad de esta enzima (Altamirano., *et al.*, 2000) y, por consiguiente, tiene la capacidad de consumir glutamato y amonio para generar glutamina, lo cual puede explicar el aumento de glutamina observado a partir del día 16 para los cultivos bifásicos y en el día 6 para las células en los cultivos control (Figura 10).

Por otro lado, se ha reportado previamente que el amonio afecta el crecimiento celular y la productividad de la proteína recombinante. Altas concentraciones de amonio de hasta 20 mM (dependiendo de la línea celular) (Ha., & Lee., 2015) pueden inhibir la acción de galactosiltransferasas y sialiltransferasas y, por lo tanto, interferir con la siliación terminal (Chen, *et al.*, 2006; Altamirano., *et al.* 2012; McAtee., *et al.* 2014).

De acuerdo con Borys., *et al.* 1994, el efecto de amonio en la glicosilación es altamente dependiente del pH extracelular. Los autores han hipotetizado que las especies no protonadas de amonio (NH_3) son las responsables de los efectos inhibitorios observados. Mientras que las especies protonadas (NH_4^+) tienen solo un pequeño efecto ya que el ion amonio debe ser transportado a través de sistemas transportadores de iones en las membranas celulares, mientras que la especie no protonada difunde libremente. El equilibrio ion amonio/amoniaco es dependiente del pH, y a un pH mayor a 7.6 hay una inhibición significativa de la glicosilación (Borys., *et al.* 1994).

En este trabajo las muestras se colectaron al día de cultivo 4 (96 h) donde la concentración de amonio fue 5.89 ± 0.06 mM para 37°C y 5.44 ± 0.07 mM para el bifásico a 30°C (pH del medio se mantiene por debajo de 7.5 para ambos cultivos). Según lo

reportado por Ha., & Lee., 2015, para que la concentración de amonio pueda ocasionar la disminución en la expresión de las enzimas relacionadas con la glicosilación α 2,3-ST, β 1,4-GT y CMP-SAT en células CHO productoras de rh-tPA, se debe alcanzar la concentración de 10 mM, y en este trabajo, el amonio acumulado no rebasa la concentración de 6mM, por lo que se espera que no exista un daño significativo en la glicosilación del rh-tPA debido al amonio producido en el medio de cultivo.

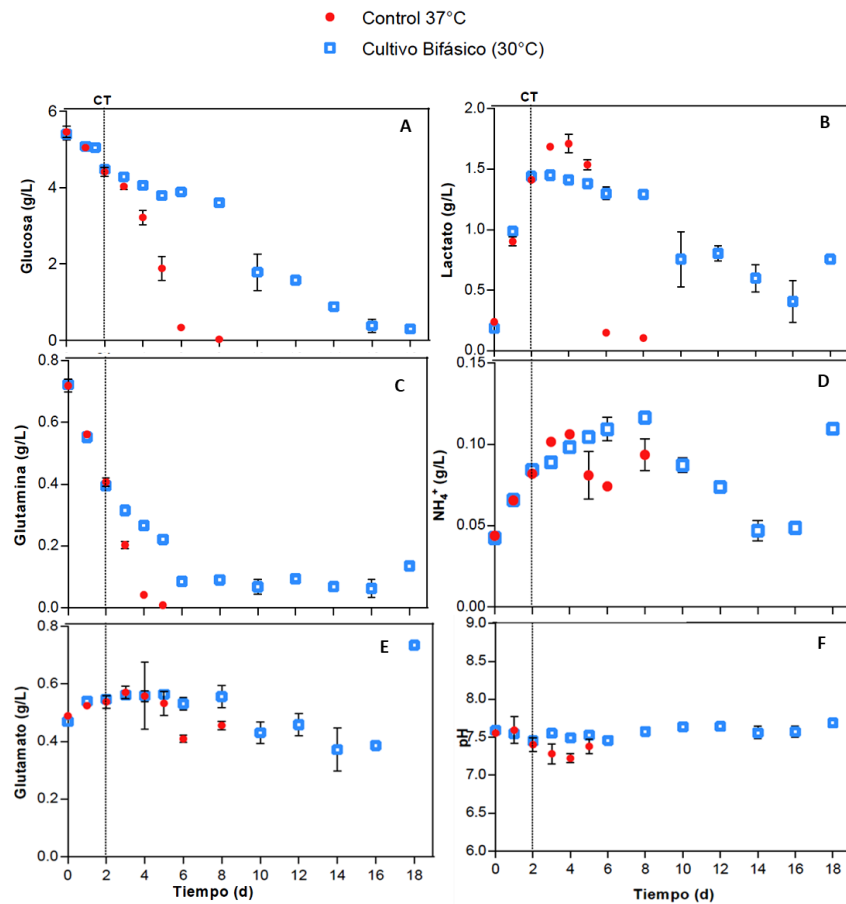


Figura 10. Efecto de la Hipotermia Moderada en el consumo/producción de metabolitos en células CHO TF70R productoras de rh-tPA. En esta Figura se observan los graficos comparativos de consumo de **A)** glucosa y **C)** glutamina y producción de **B)** lactato y **D)** amonio, concentración de **E)** glutamato, así como **F)** pH de los cultivos de células CHO TF70R en matraces Erlenmeyer de 250 mL (con 40 mL de medio ActiPro y PowerFeedA) a 37°C (puntos rojos) y los cultivos bajo hipotermia moderada (bifásico) a 30°C (cuadrados azules). Las mediciones fueron realizadss por triplicado. **CT:** Cambio de temperatura, **d:** días

Tabla 15. Producción/consumos específicos de metabolitos por las células cultivadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL a 37°C (control) y el cultivo bifásico (37°C a 30°C).

Parámetros	Control 37°C	Bifásico (37-30°C)	Cambios
qgluc (nmol/10 ⁶ cell/h)	181.5±2.85	165.4±2.31	1.1 veces menor velocidad de consumo por parte de las células en los cultivos bifásicos
qlac (nmol/10 ⁶ cell/h)	164.71±5.15	67.65±2.06	2.43* veces menor velocidad de producción por parte de las células en los cultivos bifásicos
Ylac/gluc (mol/mol)	0.91±0.03	0.41±0.31	2.32* veces mayor por parte de las células en los cultivos bifásicos
qgln (nmol/10 ⁶ cell/h)	73.3±0.54	69.0±0.85	1.06 veces menor velocidad de consumo por parte de las células en los cultivos bifásicos
qNH₄ (nmol/10 ⁶ cell/h)	143.7±0.12	134.2±0.32	1.07 veces menor velocidad de producción por parte de las células en los cultivos bifásicos
YNH₄/gln (mol/mol)	1.96±0.83	1.94±0.31	1.01 veces mayor parte de las células en los cultivos bifásicos
qglu (nmol/10 ⁶ cell/h)	126.0±1.11	140.0±0.38	0.90 veces menor velocidad de producción por parte de las células en los cultivos bifásicos

*Datos del cultivo bifásico con diferencias estadísticamente significativas del cultivo control (37°C). Se usó el test t-student con una $p < 0.05$

Oxígeno

En la Figura 11 se muestra el perfil de oxígeno disuelto obtenido para las células en los cultivos a 37°C y las células en los cultivos bifásicos. A las 96 h, tiempo de recolección de muestras para realizar el análisis de glicosilación, el valor de OD (% de saturación de oxígeno) fue de 55.13 ± 5.78 para el caso de las células CHO TF70R cultivadas a 37°C (control) y de 80.99 ± 1.36 para el caso de las células en los cultivos bifásicos.

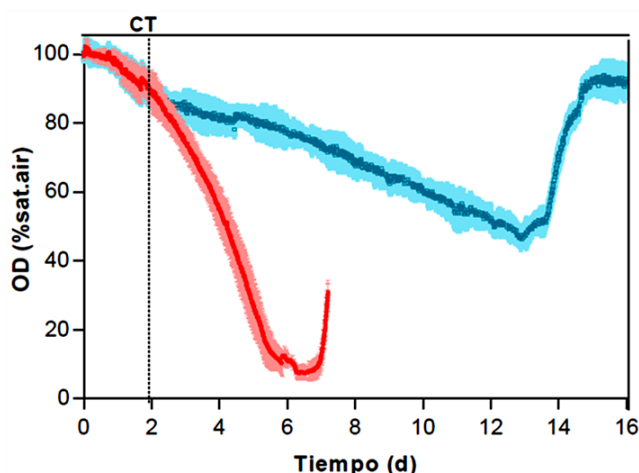


Figura 11. Efecto de la Hipotermia Moderada en el consumo de oxígeno en células CHO TF70R productoras de rh-tPA. En la gráfica se puede observar el perfil de oxígeno disuelto de los cultivos de células CHO TF70R en matraces Erlenmeyer de 250 mL (con 40 mL de medio ActiPro y PowerFeedA) a

37°C (color rojo) y los cultivos bajo hipotermia moderada (bifásico) a 30°C (color azul). Los experimentos fueron realizados por duplicado. **CT**: Cambio de temperatura, **d**: días.

El efecto de la variación de la tensión de oxígeno disuelto (DOT) en el crecimiento de células animales y su metabolismo ha sido investigado por Butler & Jenkins, (1989), se ha reportado que un crecimiento celular pobre ocurre a baja DOT (~5% saturación de oxígeno) y también se pueden observar efectos tóxicos a altos valores de DOT. Sin embargo, existe una variación considerable en los valores óptimos reportados para las células de mamífero en cultivo (Butler & Jenkins, 1989). Boraston, *et al.* 1984 demostró que, para un cultivo de hibridoma murino, un intervalo de 8-100% de saturación de oxígeno como resultado rendimientos celulares máximos. Gómez., *et al.* 2010, reportaron que concentraciones de oxígeno (5-80% de saturación de O₂) pueden modular la producción de GSH en una línea celular CHO, la reducción del nivel de DO al 5% de saturación de oxígeno disminuye la viabilidad celular, aumenta la concentración de lactato y disminuye la producción de proteína recombinante.

En este trabajo, se realizó la medición de la variación del oxígeno disuelto en matraces Erlenmeyer. En la Figura 11 se puede observar que ambos cultivos celulares consumen oxígeno a lo largo de cultivo. Para el caso de las células en los cultivos control, el oxígeno se consume hasta el día 7, y posteriormente hay un incremento en el valor de OD, lo cual coincide con la disminución de la viabilidad hasta que el cultivo muere. Para el caso de las células en los cultivos bifásicos, también se observa la disminución en la concentración del oxígeno disuelto. Sin embargo, a diferencia de los cultivos control, este se consume más lentamente a lo largo del cultivo y deja de consumirse en el día 14, cuando la viabilidad aún se encuentra por arriba del 80%.

Debido al aumento del número de células en el cultivo control, se observó como la concentración de oxígeno disuelto disminuye, sin ser limitante, posiblemente en conjunto con el agotamiento de la glucosa (Figura 11). El cese del crecimiento y el consumo de oxígeno puede ser debido al aumento en la síntesis de glutamina, y el consumo de glutamato, evitando que este sea utilizado para la producción de α -cetoglutarato. Aunado al agotamiento de la glucosa y, por ende, disminución de piruvato, podría acompañarse con el empobrecimiento de otros aminoácidos como serina y asparagina (hipótesis que requerirá de la medición experimental de estos aminoácidos) (Duarte., *et al.*, 2014).

Estos efectos en su conjunto generarían cambios en el ciclo de Krebs (catabolismo de aminoácidos para reemplazar intermediarios del ciclo) disminuyendo la concentración de NADH y FADH₂, los cuales ya no podrían ser utilizados en la fosforilación oxidativa (etapa final de la respiración celular, donde el O₂ es reducido a H₂O gracias a los electrones cedidos por el NADH y FADH₂) disminuyendo, por lo tanto, el consumo de O₂.

La variación de oxígeno disuelto (OD) también tiene un efecto en la glicosilación de proteínas recombinantes producidas en células CHO y este depende de la línea celular y proteína producida (Kunkel, *et al.*, 1998; Butler., 2006; Chotigeat., *et al.* 1994) por lo que el control de este es importante para mantener el metabolismo óptimo, el crecimiento de células productoras y una glicosilación consistente.

Por ejemplo, se reportó que una TOD oscilante de entre 800, 1,600, 6,400 y 12,800 s, con un eje de oscilación predeterminado del 7% y una amplitud de F 7%, provocó la disminución de la concentración máxima de células, los intervalos del crecimiento celular y viabilidad (Serrato., *et al.* 2004). Sin embargo, los gradientes de DOT en valores mayores a las esperados en gran larga escala no afectaron significativamente la concentración de un anticuerpo monoclonal IgG1, producido en células de mamífero, aunque se observó el incremento de la cantidad de glicanos siliados y triantenarios en el perfil de glicosilación del anticuerpo monoclonal producido (Serrato., *et al.* 2004).

Para el caso de rh-tPA producido en células CHO, únicamente se ha reportado por Lin., *et al.*, 1993, que bajo condiciones de hipoxia moderada (40-60% reducción en O₂) no se ve afectada la velocidad de crecimiento celular, la concentración máxima de células, la velocidad de producción de rh-tPA, o la calidad de rh-tPA (glicosilación). Únicamente bajo condiciones de anoxia (>99% reducción en O₂), se reportó que disminuye en un 80% la producción de rh-tPA sin afectar su calidad (verificada por análisis en geles SDS page y Western blot).

Los resultados obtenidos muestran que la TOD se mantienen por arriba del 60% en ambas condiciones de temperatura, tanto la concentración celular máxima de células viables como la producción de rh-tPA no disminuye, por lo que no se espera que existan cambios significativos en la glicosilación del rh-tPA debido a los cambios en la OD al momento de la recolección de muestras para el análisis de glicosilación.

Efecto de la TDS sobre la productividad volumétrica y específica del rh-tPA

En cuanto a la producción de rh-tPA, se determinó la concentración y se calculó productividad volumétrica y específica rh-tPA en el sobrenadante de los cultivos en matraces Erlenmeyer control a 37°C y bifásicos. La producción volumétrica máxima alcanzada en los cultivos control fue al día 3 de cultivo con un valor de 8.61 ± 0.32 mg/L mientras que la productividad específica fue de 1.61 ± 0.02 pg/cel/día. Para el caso de los cultivos bifásicos, la producción volumétrica máxima alcanzada al día 8 de cultivo fue de 8.49 ± 0.49 mg/L y la producción específica en este caso fue de 1.89 ± 0.01 pg/cel/día (Tabla 16, Figura 12).

Las muestras para el estudio de glicosilación se colectaron al día 4 de cultivo, en este día se observó una producción volumétrica de 7.19 ± 0.49 mg/L y 6.57 ± 0.64 mg/L para los cultivos bifásicos

Tabla 16. Producción volumétrica y específica de rh-tPA de las células cultivadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL a 37°C (control) y el cultivo bifásico (37°C a 30°C).

Parámetros	Control 37°C	Bifásico (37-30°C)	Cambios
<i>rh-tPA max (mg/L)</i>	8.61 ± 0.32	8.49 ± 0.49	18% mayor producción por parte de las células en los cultivos bifásicos
<i>Q_{rh-tPA} (pg/cel/día)</i>	1.61 ± 0.02	1.89 ± 0.01	

- Control 37°C
- Cultivo Bifásico (30°C)

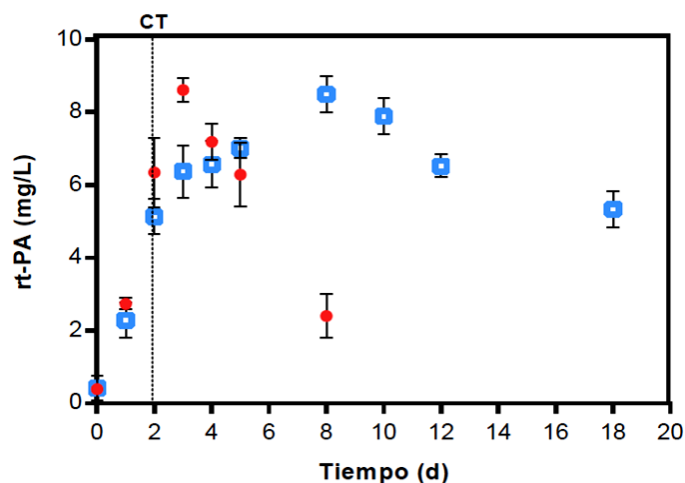


Figura 12. Efecto de la hipotermia moderada sobre la productividad volumétrica del rh-tPA. En la gráfica se puede observar la acumulación de rh-tPA en mg/L en los cultivos control a 37°C y los cultivos bajo hipotermia moderada (bifásico) a 30°C. **CT:** Cambio de temperatura, **d:** días.

En relación con lo observado en este trabajo, se ha reportado que, al cambiar la temperatura a hipotermia moderada, las células aumentan la producción específica de proteína recombinante particularmente en células CHO (ejemplos descritos en la tabla 6). Estos cambios también han sido reportados para el caso de la línea celular CHOTF70R usada en este trabajo, como se pudo observar en la Tabla 12 (Hendrick, *et al.*, 2001 y Bedoya, *et al.*, 2016). Los reportes publicados 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 de células alcanzada en los cultivos mono-térmicos (Tabla 6), por lo que la implementación de cultivos bifásicos, como el de este trabajo, donde inicialmente se promueve el crecimiento y posteriormente se disminuye la temperatura, logran mejorar el desempeño en la productividad.

El tiempo óptimo para el cambio de temperatura depende de la línea celular y las condiciones previas al cambio de la temperatura (concentración celular, concentración de sustratos y factores de crecimiento, viabilidad y estado metabólico) (Barrón., 2009).

De acuerdo con Barrón *et al.*, en la línea celular CHOTF70R productora de rh-tPA, la producción de proteína recombinante a 37°C esta asociada al crecimiento, ya que en el momento en que las células dejan de crecer, el rh-tPA se deja de producir. En cambio,

para el caso de las células en hipotermia moderada, aunque las células dejen de crecer, el rh-tPA continúa produciéndose.

En el trabajo de Barrón., 2009, se evaluó el cambio de temperatura a 30°C después de 24, 48, 72, 96 y 120h de cultivo a 37°C (modalidad bifásica). De manera general, la viabilidad del cultivo disminuyó primero en los cultivos a 37°C a comparación de los cultivos bifásicos, el cultivo que mantuvo la mayor viabilidad fue aquel con el cambio de temperatura a las 24h. La mayor productividad específica y la concentración de rh-TPA máxima fue observada en las células en los cultivos bifásicos con cambio a las 24.

Bedoya, *et al.*, 2016 reportó el cambio de temperatura de 37°C a 30°C a las 48 h de cultivo para la línea celular CHOTF70R productora de rh-tPA, es en este momento donde observó que las células se encontraban en fase exponencial y tenían una mayor producción de proteína recombinante (productividad volumétrica y específica) antes de que los cultivos comenzaran a disminuir su viabilidad (a comparación con los cultivos a 37°C). Además de las diferencias en la productividad, los ensayos transcriptómicos mostraron diferencias en las enzimas relacionadas con la glicosilación cuando el cambio de temperatura se realizó a las 48h.

En este trabajo, el cambio de temperatura a 30°C se realizó a las 48h de cultivo a 37°C para poder evaluar el efecto de la disminución de la temperatura sobre la glicosilación con base en lo reportado previamente.

Se observaron valores similares en la concentración máxima de rh-tPA, 8.61 ± 0.32 mg/L (al día 3 de cultivo) para el caso de los cultivos control y 8.49 ± 0.49 mg/L (al día 8) para el caso de los cultivos bifásicos (no fue evidenciado una diferencia en la concentración de rt-PA máxima alcanzada en ambas condiciones). Al analizar la productividad específica, hubo un incremento de **18%** en la producción de rh-tPA por parte de las células en los cultivos bifásicos (2.10×10^6 cel/mL en los cultivos bifásicos producen la misma cantidad de rh-tPA que la producida por 3.1×10^6 cel/mL en los cultivos control).

Con base en lo reportado por Barrón., 2009, el tiempo óptimo para el cambio de temperatura depende de las condiciones previas al cambio de la temperatura (concentración celular, concentración de sustratos y factores de crecimiento, viabilidad y

estado metabólico), por lo que se infiere que, si el cambio de temperatura se hubiera realizado posteriormente, por ejemplo a las 72h de cultivo, se hubiera promovido el crecimiento celular evidenciando así una mejora en la productividad volumétrica por parte de los cultivos bifásicos (Hendrick, *et al.* 2001; Vergara, *et al.* 2012 y 2014; Bedoya, *et al.* 2016; Avello, *et al.* 2017, Barrón., 2009).

La disminución en la cantidad de rh-tPA acumulado conforme avanza el tiempo de cultivo puede deberse a que proteasas y glicosidasas son secretadas por las células viables y liberadas de las células lisadas acumulándose extracelularmente en los cultivos de células CHO perjudicando la calidad del producto (Park., *et al.*, 2017). En este trabajo, las muestras se colectaron en el día 4 de cultivo donde no se observó disminución en la viabilidad celular en ninguna de las condiciones de cultivo.

El incremento en la productividad específica de las células en los cultivos bifásicos puede ser atribuido a los mecanismos resumidos en la tabla 7 y 8, estos incluyen; el arresto del ciclo celular ya que esto ocasiona el incremento en el porcentaje de células en G1 (considerada una de las fases metabólicamente más activas) (Fussenegger., 2001; Bollati-Fogolin., *et al.*, 2005; Kaufman., 1999; Yoon., *et al.*, 2004; Fox., *et al.*, 2005). Así como, la disminución en la velocidad de crecimiento específica (Berríos., *et al.* 2009; Yoon., *et al.* 2004), el retraso de la apoptosis (Slikker., *et al.* 2001; Baik., *et al.* 2006; Yee., *et al.*, 2009; Masterton, *et al.*, 2014), cambios en la actividad proteolítica del cultivo (Barrón., 2009; Masterton, *et al.*, 2014) y principalmente el incremento en la cantidad y/o estabilidad del mRNA de la proteína recombinante (Kou., *et al.* 2011; Fox., *et al.* 2005; Marchant. *et al.* 2008; Roobol., *et al.*, 2009; Masterton, *et al.*, 2014; Underhill., *et al.*, 2006) (Tabla 7 y 8).

Purificación de rh-tPA mediante cromatografía de afinidad L-lisina

Diferentes técnicas de purificación para la obtención del rh-tPA como el uso de columnas de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía con hidroxiapatita, entre otras han sido descritas (Davami, *et al.* 2010; Nimtz, *et al.* 1990; Parekh, *et al.* 1989; etc). Dada la baja cantidad de rh-tPA presente en

las muestras, se realizó la purificación mediante cromatografía de afinidad. La purificación se realizó por duplicado para la muestra control y las muestras de los cultivos bifásicos. En la Figura 13 se muestra el perfil característico del rh-tPA comercial en electroforesis y Western Blot y en la Figura 14 se muestra el cromatograma obtenido durante el proceso de purificación del rh-tPA con L-Lisina. En el primer componente se observa la carga de la muestra en la columna, el segundo componente muestra la elución de impurezas de la muestra al pasar por la columna el buffer de lavado. Por último, se muestra el componente corresponde al rh-tPA que fue eluido, recuperado y concentrado en tubos amicon de 30 kDa hasta un volumen final de 400 μ L. Para confirmar la presencia del rh-tPA durante la cromatografía de afinidad, los diferentes componentes fueron separados en un gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie, e inmunodetectado mediante un Western blot (Figura 15).

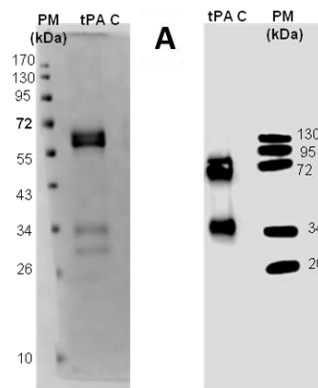


Figura 13. Perfil del rh-tPA comercial en electroforesis y Western Blot. En esta Figura se puede observar el **A)** Gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie y **B)** Western blot del rh-tPA comercial Acetylse de Boehringer Ingelheim. Volumen de muestra cargado: 10 μ L. Se puede identificar la presencia de las diferentes variantes del rh-tPA reportadas previamente por Lin., *et al.* 1993: i) De una cadena, variante tipo I y II, ii) De dos cadenas, iii) De tipo complejo, iv) rh-tPA degradado. **PM:** marcado de peso molecular en kDa, **tPA c:** rh-tPA comercial Acetylse de Boehringer Ingelheim.

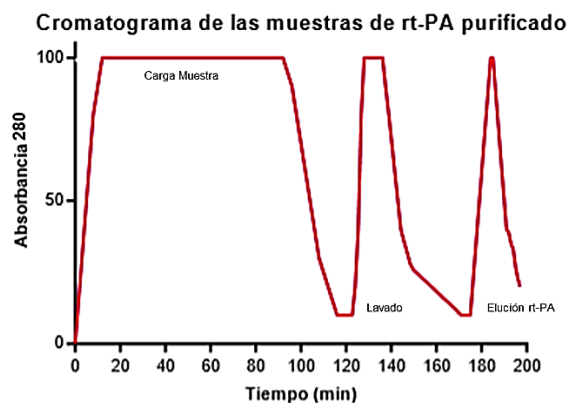


Figura 14. Cromatograma de las muestras de rh-tPA purificado mediante cromatografía de afinidad. Se usó una columna empacada de Lysine Hyper D (Pall) usando un FPLC (Bio-Rad) pre-equilibrada con un buffer con 50 mM de fosfato de sodio y 0.01% de polisorbato 80 a pH 7.5. Se realizaron 3 lavados (materiales y métodos) y el con rh-tPA fue eluido con un buffer de 500 mM de L-arginina a una velocidad de elución de 2 mL/min.

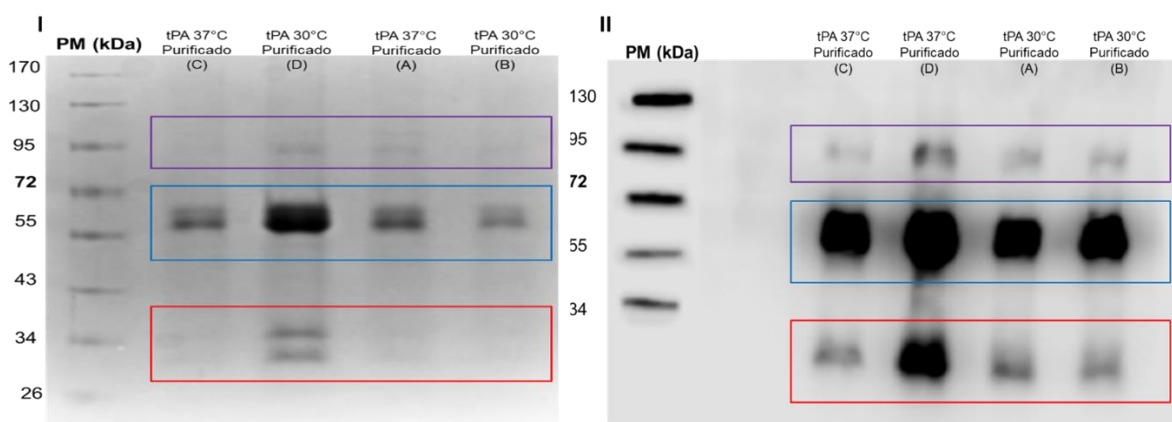


Figura 15. Perfil del rh-tPA purificado en electroforesis y Western Blot. En esta Figura se puede ver el I) gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie y II) Western blot de las muestras de rh-tPA purificado de los cultivos control a 37°C y los cultivos bifásicos a 30°C. Volumen de muestra cargado por muestra: 20 μ L. Se puede identificar la presencia de las diferentes variantes del rth-PA: Una cadena, variante tipo I y II (Recuadro azul), Dos cadenas (Recuadro rojo), rth-PA de tipo complejo (recuadro morado). La purificación se realizó por duplicado. Las letras **A** y **C** corresponden al rh-tPA purificado de los cultivos control a 37°C y las letras **B** y **D** corresponden al rh-tPA purificado de los cultivos bifásicos a 30°C **PM**: marcado de peso molecular en kDa.

El rh-tPA recuperado se analizó mediante geles SDS-PAGE y WB (Figura 15). Se observó un perfil característico del rh-tPA formado por la presencia de bandas a ~95 kDa que corresponde a un complejo de rh-tPA, una banda a ~72 kDa que corresponde a la variante I y II del rh-tPA de una cadena, así como bandas a ~32 kDa que corresponden al rh-tPA de dos cadenas y rh-tPA degradado. Este perfil es comparable con el del rh-tPA comercial Acetilyse de Boehringer Ingelheim (la única banda que no presenta el rh-tPA comercial es la del rh-tPA complejo, enmarcada por un rectángulo morado en la Figura 15) observado en la Figura 13. Las dos variantes de rh-tPA ya han sido reportadas (Rouf, *et al.* 1996; Hendrick, *et al.* 2001; Kimura., & Miller., 1997, Lin., *et al.* 1993), las cuales son formadas debido a la escisión proteolítica del rh-tPA de doble cadena unida por un puente disulfuro, corte al cual es susceptible. Según Hendrick, *et al.* 2001 y Rouf, *et al.* 1996, no existen diferencias significativas en la actividad del rh-tPA de una cadena con el rh-tPA de dos cadenas. Los datos de purificación se pueden observar en la tabla 17.

Tabla 17. Concentración de rh-tPA en las condiciones control a 37°C y los cultivos bifásicos (de 37°C a 30°C a las 48 h) obtenido en cada paso de purificación

PURIFICACIÓN 37°C		PURIFICACIÓN 30°C	
Paso	tPA (mg)	Paso	tPA (mg)
Columna de Afinidad L-lisina y concentrado AMICON 30 kDa(A)	0.220	Columna de Afinidad L-lisina y concentrado AMICON 30 kDa(B)	0.250
Columna de Afinidad L-lisina y concentrado AMICON 30 kDa(C)	0.280	Columna de Afinidad L-lisina y concentrado AMICON 30 kDa(D)	0.430
Desviación estándar entre duplicados	±0.04	Desviación estándar entre duplicados	±0.13

Para confirmar la identidad y pureza del rh-tPA, este fue analizado mediante cromatografía en fase reversa en HPLC. La muestra purificada obtenida del cultivo en matraces Erlenmeyer de 250 mL 37°C y de los cultivos bifásicos a 30°C por 96 h se compararon con el rh-tPA estándar (rh-tPA comercial Acetilyse de Boehringer Ingelheim) y como se puede ver en la Figura 15, los perfiles de elución obtenidos para las muestras purificadas son muy similares al rh-tPA comercial (diferiendo únicamente en el componente E y F, los cuales no están presentes en el rh-tPA comercial. Posteriormente, se cargaron los picos A-H eluidos en un gel SDS page al 12% y se realizó un WB (Figura

16). En el Western blot se pudo identificar el rh-tPA en las fracciones B-G comprobando así que los componentes eluidos corresponden al rh-tPA purificado.

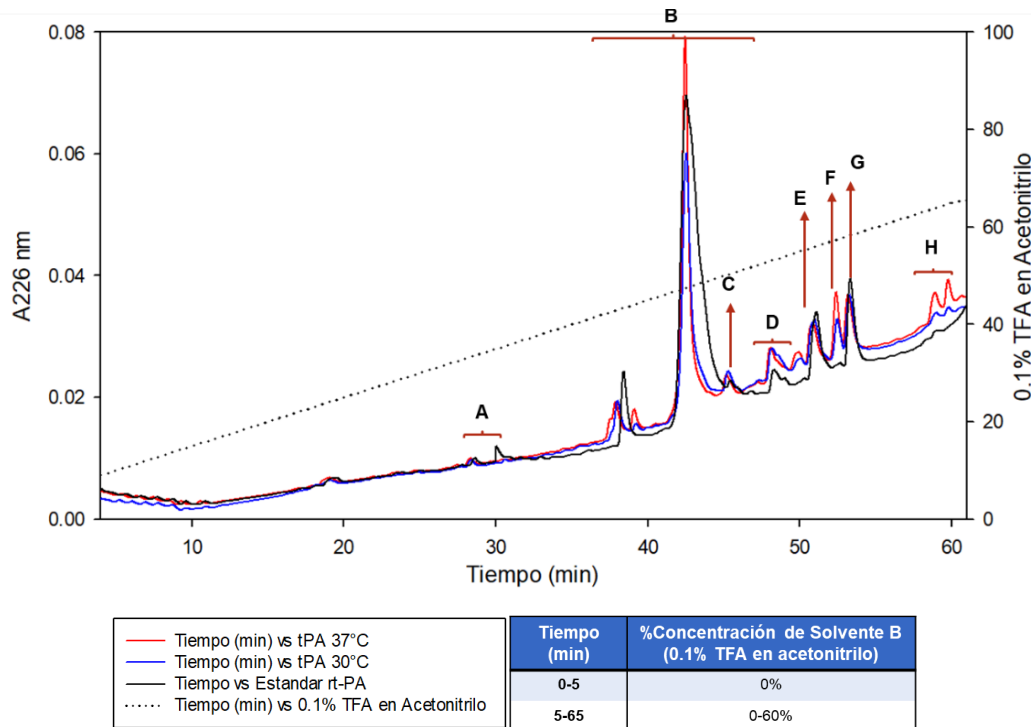


Figura 16. Cromatograma comparativo de las de las muestras de rh-tPA purificado de los cultivos control a 37°C (línea roja), los cultivos bifásicos a 30°C (línea azul), y el rh-tPA comercial Acetilyse de Boehringer Ingelheim (línea negra), obtenido mediante cromatografía en HPLC fase reversa. En este cromatograma se observa que las muestras purificadas presentan un perfil muy similar entre ellas y el perfil del rh-tPA comercial.

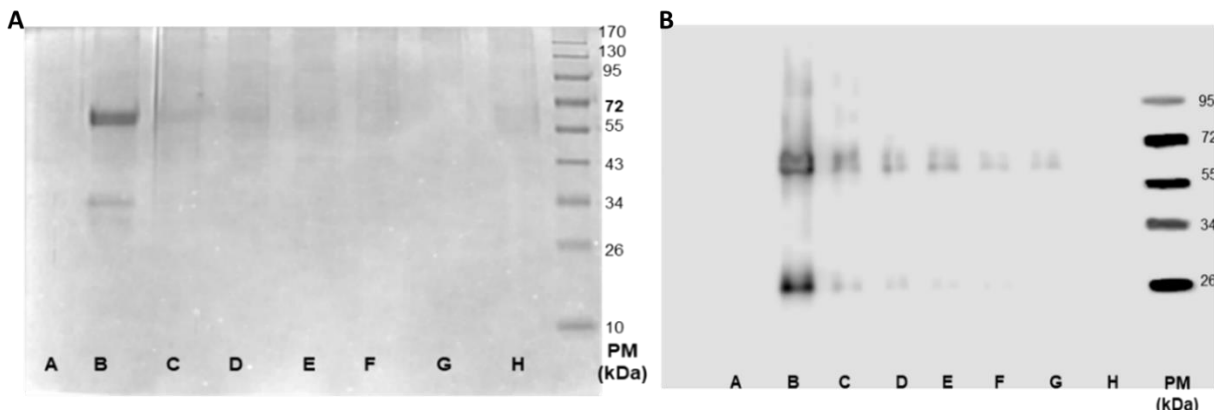


Figura 17. Perfil del rh-tPA purificado (colectado de la separación mediante RP-HPLC) en electroforesis y Western Blot. En esta Figura se puede observar el **A)** Gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie y **B)** Western blot de las muestras de rh-tPA

purificado de los cultivos bifásicos a 30°C recuperados de la cromatografía de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). Se puede identificar la presencia del rh-tPA en las diferentes fracciones eluidas (B-G). **PM:** marcador de peso molecular.

En la Figura 18 se puede observar una comparación mediante geles de electroforesis y Western blot las muestras de sobrenadante a 37°C y de los cultivos bifásicos antes y después de la purificación. Como se puede observar, a diferencia de las muestras de sobrenadante previa purificación, las muestras purificadas únicamente presentan las bandas características del rh-tPA mencionadas por Lin., *et al.* 1993: Una cadena, variante tipo I y II (Recuadro azul); Dos cadenas (Recuadro rojo); rh-tPA de tipo complejo (recuadro morado).

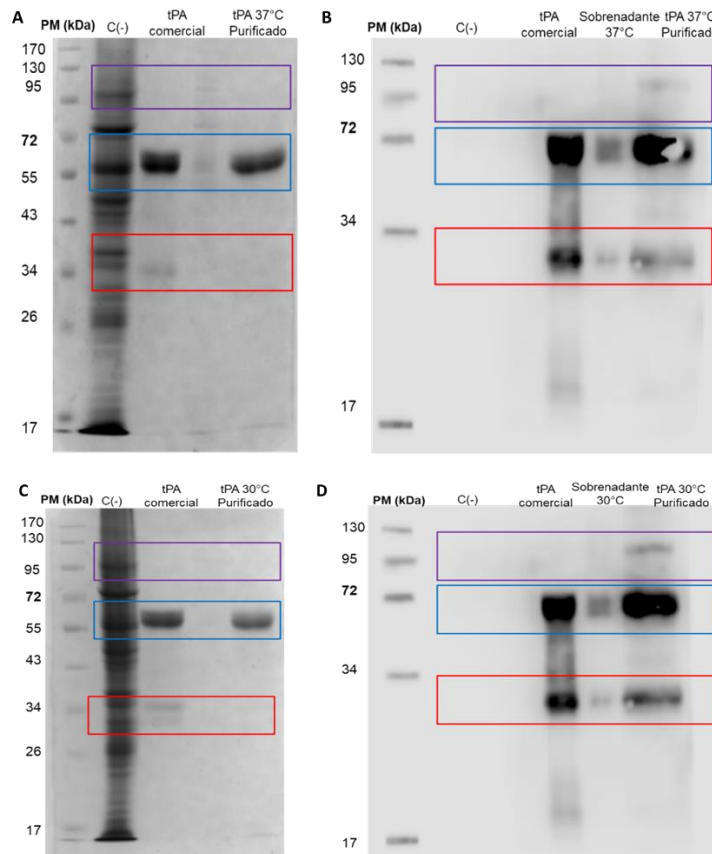


Figura 18. Perfil comparativo rh-tPA purificado de ambas condiciones de temperatura, rh-tPA comercial y sobrenadante sin purificar mediante electroforesis y Western Blot. En esta Figura se puede observar el gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie y Western blot de las muestras de rh-tPA comercial, rh-tPA del sobrenadante y rh-tPA purificado de los cultivos control a 37°C (A y B respectivamente) y cultivos bifásicos a

30°C (C y D respectivamente). Se puede identificar la presencia del rh-tPA puro, las diferentes variantes del rh-tPA: Una cadena, variante tipo I y II (Recuadro azul), Dos cadenas (Recuadro rojo), rh-tPA de tipo complejo (recuadro morado). **PM**: marcado de peso molecular en kDA.

La hipotermia moderada afecta la expresión de genes relacionados con las vías de N-glicosilación, chaperonas del RE, CIRP, RBM3 y rh-tPA

Aproximadamente el 8% de las secuencias de RNAm reportadas en GeneBank (NCBI) corresponde a genes involucrados en la glicosilación, estos genes codifican en glicosidasas, glicosiltransferasas, enzimas que sintetizan precursores lipídicos y transportadores de azúcares activados, siendo este último grupo en el cual los 5 azúcares principales representados son: fucosa, manosa, N-acetil glucosamina, galactosa y ácido siálico (Varki., *et al.*, 2009 y 2017; Radhakrishnan, *et al.*, 2018).

Para este análisis se debe evitar la amplificación del DNA genómico en la reacción de qPCR, por lo que el diseño de los oligonucleótidos fue realizado sobre la intersección de splicing exón-exón. Todos los oligonucleótidos utilizados generan únicamente un amplicon de 91 pb en una reacción de qPCR (diseñados por el grupo Hidalgo., 2010). Se realizó la extracción de RNAm según la metodología.

Debido a que la determinación de la integridad y pureza de las muestras de RNAm es crítica para los análisis de la expresión génica, la calidad, integridad y pureza del RNAm se confirmó con la relación A260/280 en el nanodrop y mediante geles de agarosa. Se observaron dos bandas correspondientes al RNA_r 28s y 18s, sin barrido y con una relación 2:1 (28s:18s) así como la ausencia de DNA genómico sobre la banda correspondiente al RNA_r 28s, revelando la ausencia de degradación en las muestras. Las bandas correspondientes al RNA_r 28s y 18s son empleadas como referencia para determinar la integridad ya que estas representan del 70 al 90% del RNA celular total (Ochoa., *et al.*, 2006).

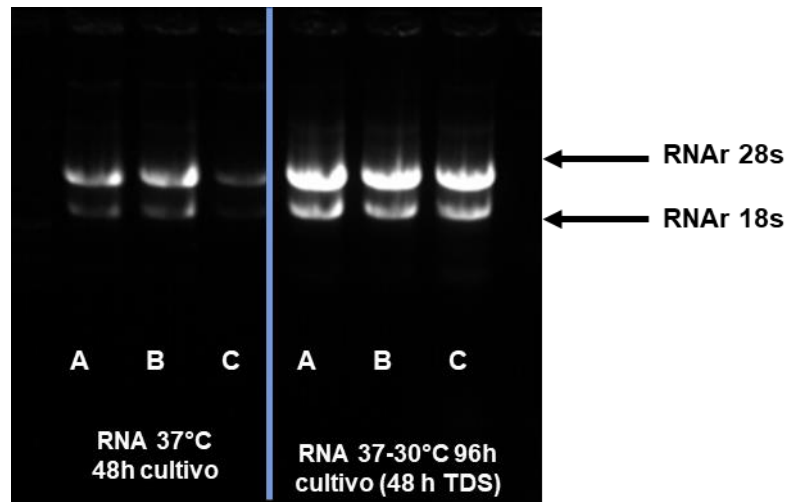


Figura 19. Integridad y pureza del RNA_{tot}. Gel de agarosa al 2% cargado con 2 μ L de RNA_{tot} por pozo. A la izquierda se pueden observar por triplicado (A, B y C) de las extracciones de RNA de los cultivos a 37°C y a la derecha (A, B y C) se pueden observar por triplicado las extracciones de RNA de los cultivos bifásicos (cambio de 37°C a 30°C a las 48 h de cultivo). La presencia de bandas correspondientes de rRNA de 28 y 18s confirmó la integridad de la muestra.

Durante todos los experimentos de RT-qPCR, se confirmó que para todos los genes evaluados solo se observara la presencia de un pico en la curva de disociación de primers asegurando así la ausencia de dímeros (previamente, la eficiencia de amplificación de los primers utilizados fue demostrada por Hidalgo., y su grupo de investigación en el 2010). El gen de normalización ocupado fue *Gapdh* (Bedoya *et al.*, 2016). En la tabla 18 se presentan las veces de cambio en la expresión de los genes estudiados en los cultivos bifásicos comparados con los cultivos control.

Tabla 18. Veces de cambio de los genes diferencialmente expresados debido a la respuesta al cambio de temperatura (de 37°C a 30°C a las 48 h) determinada por RT-qPCR. Se uso un termociclador Thermo Scientific™ Piko Real™ Thermal (Thermo Fischer Scientific), los experimentos se realizaron por triplicado biologico y triplicado técnico.

Función	Gen (Proteína)	Veces de cambio después del cambio de temperatura (48h TDS)
Choque Frio	Cirbp (Proteína de unión a ARN inducible por frío)	9.87±0.81*
	Rbm3 (Proteína 3 de unión a ARN)	9.50±0.84*
Glicosiltransferasas	B4galt1 (Beta-1,4-galactosiltransferasa 1)	4.31±0.19*
	St3gal4 (Alfa 2,3-sialiltransferasa IV)	2.35±0.13*
Glicosidasas	Neu2 (Sialidasa-2)	-1.81±0.32*
	Glb1 (Beta-galactosidasa)	-1.80±0.17*
	Man1A2 (Alfa-1,2-manosidasa IB)	7.43±0.61*
Transportadores	Slc35a1 (Transportador de CMP-ácido siálico)	-1.14±0.05
	Slc35a2 (Transportador de UDP-galactosa)	4.12±0.31*
rh-tPA	PLAT (activador del plasminógeno de tipo tisular)	1.12±0.05

*Datos del cultivo bifásico con diferencias estadísticamente significativas del cultivo control (37°C). Se usó t-student con una p<0.05

El incremento en el nivel relativo de mRNA de diversas proteínas recombinantes debido a la disminución de la temperatura, como se puede observar en la tabla 5, ya ha sido previamente reportado (Rodríguez., *et al.* 2005, Hendrick., *et al.*, 2001, Vergara., *et al.*, 2015. etc) y una de las explicaciones a esto es que puede deberse al incremento en la cantidad y/o estabilidad del mRNA de la proteína recombinante (Tabla 7 y 8, Yoon., *et al.* 2003, Kou., *et al.* 2011; Fox., *et al.* 2005, Lee., *et al.* 2008). Para determinar si el incremento de la productividad específica a baja temperatura correspondía con un incremento en la transcripción del rh-tPA, su expresión génica fue cuantificada por RT-qPCR. Como se puede observar en la tabla 18, en el cultivo bifásico, la expresión del gen codificante para el rh-tPA aumentó 1.12±0.05, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa por lo que el incremento en la productividad específica no puede ser atribuido a cambios en la expresión del mRNA.

También fueron analizados los cambios en la expresión de los marcadores moleculares del cambio de temperatura, RBM3 (proteína con motivos de unión a RNA) y CIRP

(proteína de unión a RNA inducible por frío). Como ya se describió, CIRP y RBM3 son dos chaperonas las cuales se encargan de favorecer la traducción y estabilizar ciertos mRNAs, estas son consideradas como las principales moduladoras de la expresión genética en condiciones de hipotermia moderada (Richard. 2005; Al-Fageeh., & Smales., 2006; Andersen, *et al.* 2000; Bedoya, *et al.*, 2017; Cain, *et al.*, 2013; Chuppa, *et al.*, 1997; Hidalgo., 2010).

En la tabla 18, se puede observar que hubo un incremento en la expresión de CIRP y RBM3 de 9.87 ± 0.81 y 9.50 ± 0.84 veces respectivamente, comportamiento que corresponde a lo reportado para la expresión estos dos genes en condiciones de hipotermia moderada (Richard., 2005; Al-Fageeh., & Smales., 2006; Andersen, *et al.* 2000; Bedoya, *et al.*, 2016; Cain, *et al.*, 2013; Chuppa, *et al.*, 1997; Hidalgo., 2010). De acuerdo con Zhu., *et al.* (2016), en células de mamíferos, los niveles de expresión tanto de CIRP como de RBM3 (evolutivamente conservadas de acuerdo con Al-Fageeh, *et al.*, 2009) alcanzan sus picos en la hipotermia leve a moderada (28–34°C). Tanto CIRP como RBM3 están involucrados en la modulación de la transcripción y la traducción funcionando como chaperonas de RNA. CIRP mejora la productividad de proteína recombinante y puede arrestar el crecimiento celular de manera línea celular específico, mientras que RBM3 facilita la síntesis de proteína CAP- independiente a baja temperatura. RBM3 también interactúa y bloquea parcialmente la actividad de miRNAs a baja temperatura. La expresión alterada de miRNA seguida del cambio de temperatura ha sido reportado como importante de la regulación de la expresión proteica y el comportamiento celular (Kumar., *et al.*, 2008).

Con esto, se podría suponer que el aumento en la productividad específica puede deberse a la posible estabilización del mRNA del rh-tPA por CIRP y RBM3.

Por último, se analizó la expresión de genes relacionados con vías de la N-glicosilación debido al cambio de temperatura. Se tienen dos grupos para analizar la información, los cuales son: a) transportadores de azúcares activados y b) glicosiltransferasas y glicosidasas. En la Figura 20 se puede observar las enzimas evaluadas y el paso sobre el cual actúan durante la glicosilación de una proteína.

Se puede asumir que el incremento en la expresión de algún transportador de azúcar activado implica por consecuencia un aumento en la actividad de la enzima glicosiltransferasa que está asociada. Sin embargo, es necesario determinar el nivel de expresión de la transferasa asociada al patrón de glicosilación de la proteína para poder concluir al respecto.

Para el caso de las glicosiltransferasas se evaluó la expresión de la $\beta(1,4)$ -galactosa transferasa (B4GALT1) y de la $\alpha(2,3)$ -sialiltransferasa IV (ST3GAL4), a las 48 h después del cambio de temperatura de 37°C a 30°C, la expresión de la B4GALT1 aumentó 4.31 ± 0.19 veces y para el caso de ST3GAL4, su expresión aumentó 2.35 ± 0.13 con respecto a los cultivos control a 30°C.

La expresión de las glicosidasas: sialidasa (NEU 2), galactosidasa (GLB1) y la α 1,2-manosidasa (Man1A2/MANEA) mostró que para el caso de NEU2 y GLB1, hubo una disminución de 1.81 ± 0.32 y 1.80 ± 0.17 veces respectivamente. La expresión de Man1A2 aumentó 7.43 ± 0.61 veces con respecto al control, este último cambio podría reflejar la disminución en la manosilación de la proteína.

La elongación y remodelación de los N-glicanos que se unen a la cadena peptídica dependen de la actividad de las glicosidasas y glicosiltransferasas que se encuentran localizadas a lo largo de la vía secretoria (RE-Golgi), estas enzimas son finamente reguladas y su expresión es altamente dependiente de las condiciones de cultivo.

Los cambios en la expresión de los genes relacionados con las glicosiltransferasas pueden reflejarse en la actividad enzimática en el aparato de Golgi y el hecho de que la extensión de la cadena de N-glicanos es secuencial, la disminución o el aumento de las enzimas relacionadas con la glicosilación sugiere una alteración en el patrón final.

El aumento en la expresión del transportador de galactosa, la B4GALT1 y la disminución en la expresión de GLB1 sugieren cambios en la galactosilación de proteínas en los cultivos bifásicos a 30°C. Debido a la secuencialidad de las reacciones de N-glicosilación, lo anterior podría sugerir un aumento en los procesos de siliación, por lo que también se evaluó la expresión de enzimas relacionadas con este proceso (sialiltransferasas y neuraminidasas).

Cualquier intento de maximizar el contenido de ácido siálico de una proteína terapéutica también debe considerar la actividad de la sialidasa porque las glicoproteínas están sujetas a la desialilación y degradación durante el cultivo celular prolongado (Wang., *et al.*, 2017). Las sialidasas (neuraminidasas) son exoglucosidasas que catalizan la eliminación hidrolítica del ácido siálico. El producto de asialoglicoproteína resultante se eliminaría rápidamente del plasma por los receptores de asialoglicoproteína en el hígado. Hay cuatro sialidasas identificadas en células CHO (Neu1 y 4 lisosomal, Neu2 citosólica, Neu3 en membrana plasmática). En las células CHO, es deseable reducir la actividad de sialidasa celular para garantizar la calidad y la consistencia del producto para las glicoproteínas bioterapéuticas secretadas (Wang., *et al.*, 2017). En este trabajo, se observó la disminución en la expresión de Neu2. Se ha reportado que la NEU2 es una enzima responsable por la degradación de N-glicanos ya que es capaz de hidrolizar una gran cantidad de glicoproteínas y oligosacáridos a un pH neutro (Miyagi, *et al.*, 2012), por lo que su disminución indicaría una posible mejora en la calidad del rh-tPA producido al evitar la desialilación de la misma.

Como se puede observar en la Tabla 18, la disminución de Neu2 y el aumento en la expresión de la transferasa ST3GAL4 podría sugerir un aumento en la sialilación de la proteína rh-tPA.

No obstante, todas las suposiciones basadas únicamente en la expresión de genes relacionados con la glicosilación deben ser confirmadas mediante el análisis del patrón de glicosilación, ya que no necesariamente los cambios en la expresión de enzimas se reflejan en el patrón de glicosilación final de la proteína.

La micro heterogeneidad del rh-tPA aparentemente no presenta cambios relevantes en la glicosilación debido al efecto de la hipotermia moderada

Análisis de glicosilación del rh-tPA mediante HILIC

La recolección de muestras para realizar el análisis de glicosilación se realizó a las 96 h de cultivo para ambas condiciones de temperatura (37°C y el cultivo bifásico a 30°C 48 h TDS), en este tiempo se había observado el pico de producción específica de proteína (Bedoya, *et al.*, 2016) y cambios en la expresión de genes relacionados con hipotermia moderada (la expresión de CIRP, RBM3, manosidasa y galactosiltransferasa incrementa mientras que la expresión de la sialidasa y galactosidasa disminuye a comparación de los cultivos a 37°C). También han sido sugeridos cambios en la glicosilación de esta proteína (evaluados mediante lectin blots) como lo es la siliación y manosilación (Hendrick, *et al.*, 2001). Otra razón por la cual se recolectaron las muestras a las 48 h después del cambio de temperatura fue para evitar que los cambios en el perfil de glicosilación se debieran a la progresión del cultivo de la fase exponencial a la estacionaria y a la fase de muerte (se ha reportado que hay un incremento de las formas con una menor cantidad de ácido siálico hasta en un 30% por lo que el perfil de glicosilación se modifica debido los cambios en las fases de crecimiento celular de acuerdo con Wong., *et al.* 2010) en vez de atribuirse a la hipotermia moderada.

En la Tabla 19 se puede observar las estructuras propuestas de oligosacáridos ligados a N del rh-tPA producido bajo diferentes condiciones de temperatura (Control 37°C y cultivo bifásico a 30°C). Los tiempos de elución fueron transformados a unidades de glucosa (GU) y las estructuras propuestas fueron basadas en sus tiempos de retención en GU y las digestiones con exoglicosidasas (Guile *et al.*, 1996). Se ha reportado que diferentes estructuras de glicanos pueden eluir a los mismos valores de GU (Guile., *et al.*, 1997). Los glicanos fueron separados utilizando formato de amonio 250 mM, lo cual facilita la separación de glicanos neutros de los glicanos cargados o siliados. Se identificaron 14 estructuras tanto para el rh-tPA producido a 37°C como para el producido en los cultivos bifásicos a 30°C. Las estructuras propuestas se pueden observar en la Figura 22.

Para facilitar el análisis, las estructuras de glicanos se clasificaron como: altos en manosa, biantenarios, triantenarios, tetraantenarios, siliados y fucosilados. Los porcentajes de cada grupo son listados en la Tabla 20. Las diferencias en estos porcentajes fueron menores a 1.8% en todos los casos al comparar la glicosilación de las células en los cultivos bifásicos con las células en los cultivos control a 37°C.

Una búsqueda en la literatura con respecto al análisis y cambios en el patrón de glicosilación de la proteína rh-tPA en condiciones de hipotermia moderada no arrojó ningún resultado además de lo descrito en los antecedentes, por lo que en este trabajo se muestran los primeros resultados de micro heterogeneidad para esta condición en la línea celular CHOTF70R. El análisis de glicosilación mostró que en general, las estructuras de glicanos producidas en la condición control (37°C) fueron las típicas reportadas en la literatura para el rh-tPA, con la diferencia de tres estructuras (A2G2S2, A1G1S1M4 y A1G1S1M5) reportadas previamente (Spellman., *et al.* 1989 y Parekh., *et al.*, 1989, Figura 22.C) y que no se detectaron tanto en las muestras de 37°C, como en las muestras en los cultivos bifásicos a 30°C.

Para el caso de las diferencias en el porcentaje de abundancia relativa entre las estructuras de glicanos, el rh-tPA producido en los cultivos bifásicos mostro la disminución del 2.89% en la estructura A2FG2S1 y un aumento del 2.66% en la estructura A2FG2S2 a comparación con los cultivos control a 37°C.

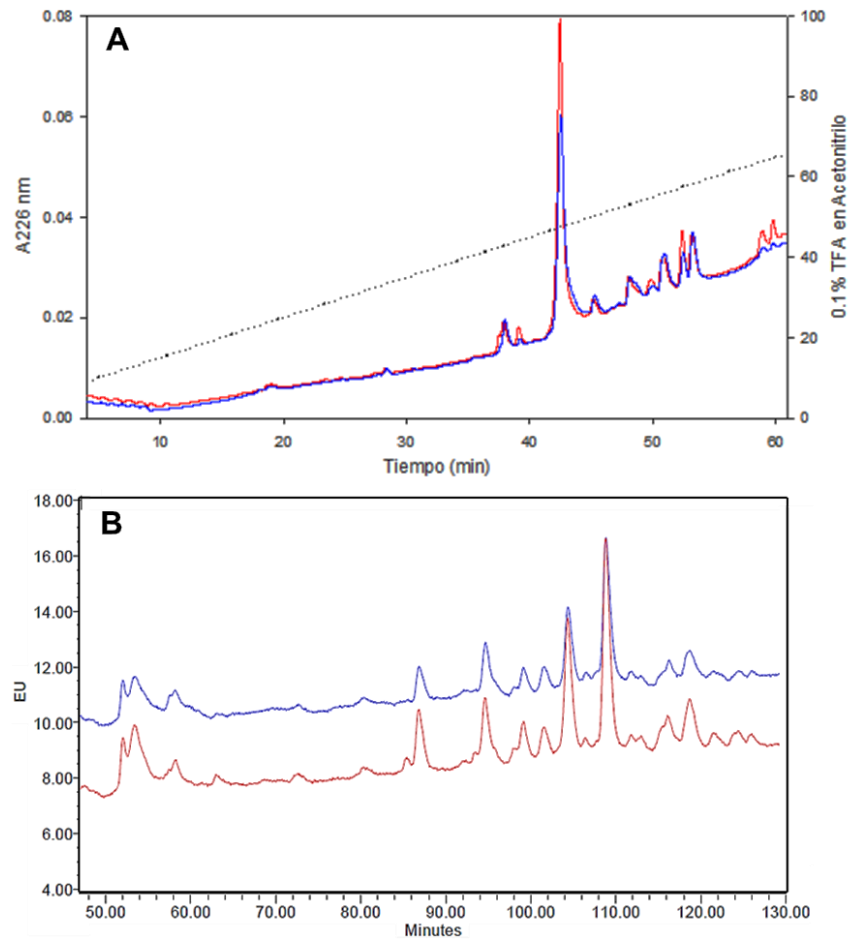


Figura 21. Cromatograma comparativo de las muestras de rh-tPA de los cultivos control a 37°C y los cultivos bifásicos a 30°C. En ambos casos, la línea roja representa el rh-tPA obtenido a 37°C y la línea azul el rh-tPA de los cultivos bifásicos. A) Cromatograma obtenido mediante HPLC en fase reversa, como se puede observar, el perfil obtenido es prácticamente idéntico entre ambas muestras. B) Cromatograma obtenido mediante HILIC con columna GlycoSep N, se observa el mismo perfil para ambas muestras (Realizado por la Mtra. Vanessa Hernández Rodríguez).

Tabla 19. Estructuras propuestas de oligosacáridos ligados a N a rh-tPA producido bajo diferentes condiciones de temperatura (Control 37°C y cultivo bifásico a 30°C). Estructuras con la misma composición, pero diferentes tiempos de retención son isómeros.

Migración UG	Estructura propuesta	% de estructuras de glicanos de rh-tPA en diferentes condiciones de temperatura	
		rh-tPA 37°C	rh-tPA 30°C
		Abundancia Relativa %	
6.31	M5	7.49	6.23
7.20	M6	6.48	7.94
7.27	M6	2.13	1.59
8.11	M7	4.51	3.48
8.51	A2FG2S1	18.01	15.12
8.82	M8	1.71	2.31
9.03	A3G3S2	1.02	2.27
9.19	A2FG2S2	26.03	28.69
9.68	A3FG3S2	2.22	2.58
9.88	A2FG2S2	1.51	1.43
10.34	A4G4S1	1.08	1.60
10.43	A4G4S2	3.46	3.99
10.90	A3FG3S3	7.16	7.45
11.45	A4FG4S4	1.12	1.73

M: Manosa, **N:** N-acetilglucosamina, **F:** Núcleo de fucosa, **G:** Galactosa, **S:** Ácido siálico, **A:** Número de antenas ligadas al núcleo N2M3, **G#** o **S#:** Indica el número de galactosa o ácido siálico unidos al oligosacárido. M5, M6 etc et corresponden a estructuras de glicanos presentados en la Figura 22.

Tabla 20. Porcentaje relativo de estructuras propuestas por grupos característicos del rh-tPA producido a 37°C y en los cultivos bifásicos de 37 a 30°C.

Grupos	% de estructuras de glicanos de rT-PA en diferentes condiciones de temperatura	
	rh-tPA 37°C	rh-tPA Bifásico 30°C
	Abundancia Relativa %	
Alta manosa	26.59	24.94
Biantenarios	54.27	52.36
Triantenarios	12.39	14.23
Tetraantenarios	6.74	8.47
Sialidados	73.41	75.06
Fucosilados	66.78	65.96

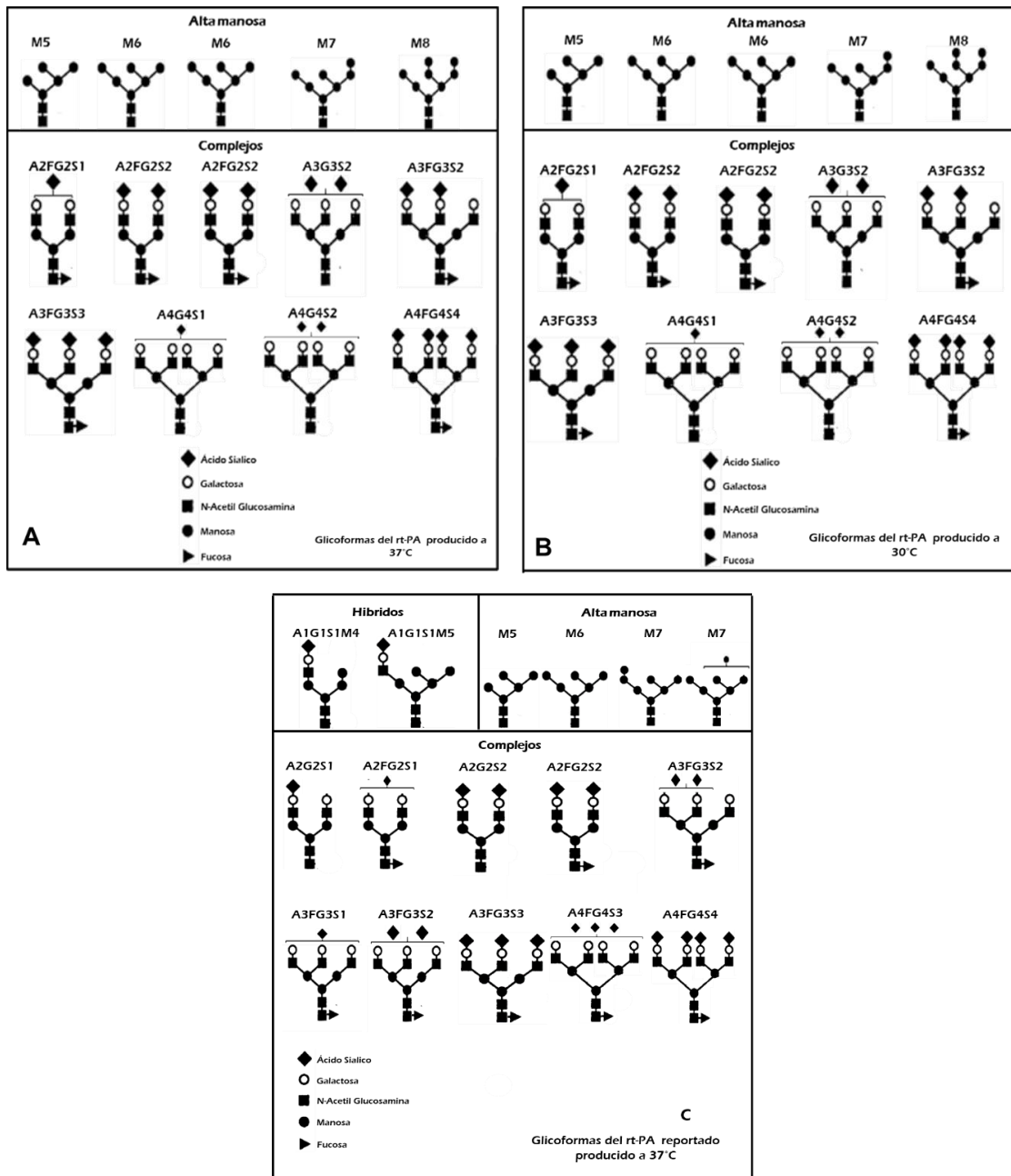


Figura 22. Representación de las estructuras propuestas en la tabla 19. Se pueden observar las estructuras reportadas para el **C**) rh-tPA en la literatura (Spellman, *et al.*, 1989), así como las estructuras determinadas para el **A**) rh-tPA producido en las células CHO TF70R a 37°C (Control) y en **B**) los cultivos bifásicos (37 a 30°C a las 48 h de cultivo). Las estructuras con misma composición, pero diferente tiempo de migración son isómeros. Los glicanos fueron agrupados con base en su composición y están basadas en (Guile., *et al.*, 1997).

La actividad enzimática de una proteína está determinada por la estructura de la misma, mientras que las propiedades farmacocinéticas, farmacodistribución, solubilidad, estabilidad, incremento de la función del efector y unión al receptor dependen de la glicosilación. Las proteínas hiperglicosiladas presentan un mayor tiempo de vida media en suero, son menos sensibles a la proteólisis y más estables al calor a comparación de las formas no glicosiladas. En particular, el ácido siálico puede extender el tiempo de vida media de las proteínas terapéuticas. Si se añaden mas sitios de N-glicosilación a la estructura, es posible que las proteínas muestren un tiempo de vida media prolongado y un incremento de la actividad biológica (Werner., *et al.*, 2007).

En el caso del rh-tPA se ha reportado que esta serin proteasa posee 3 sitios posibles de glicosilación, el tipo I, el cual tiene los 3 posibles de glicosilación (Asn-117, Asn 184 Asn-448) ocupados y el tipo II, el cual posee 2 sitios glicosilados (Asn-117 y Asn-448) y es hasta un 50% mas activo que el rh-tPA del tipo I (Spellman, *et al.* 1989). La glicosilación de está proteína provee de estabilidad proteolitica y contribuye a la farmacocinética de la molécula (Andreasen., *et al.*, 1994 y Werner., *et al.*, 2007). Los oligosacaridos del sitio Asn 117 altos en manosa son los responsables de unirse al receptor específico en el hígado donde es eliminado parcialmente a través del receptor de manosa, en las células endoteliales y en las células de Kopper, lo cual también contribuye al tiempo de vida media corto del rh-tPA (Andreasen., *et al.*, 1994 y Werner., *et al.*, 2007).

Con esta información presente, se puede inferir que cualquier cambio en el contenido de ácido siálico y manosa del rh-tPA afectaría directamente el tiempo de vida media de la proteína y, por consiguiente, su actividad terapéutica.

En el caso de los resultados obtenidos en este trabajo, debido a la hipotermia moderada los cultivos bifásicos a diferencia de los cultivos control, presentaron un incremento en la expresión de la sialiltransferasa y una disminución en la neuraminidasa 2, sin embargo, esto no afectó de manera importante el porcentaje de formas siliadas en la proteína final entre las dos condiciones de temperatura, como pudo ser verificado en el análisis de glicosilación (solo se observó un incremento de 1.65% en la abundancia relativa de los grupos siliados en el rh-tPA producido en los cultivos bifásicos, ver tabla 20).

La galactosilación, como parte del procesamiento de N-glicanos es conducida por un set de beta-1,4-galactosiltransferasas (B4GALTs), donde la B4GALT1 es la enzima dominante de esta reacción además de ser indispensable para la galactosilación de los N-glicanos (Bydlinski., *et al.*, 2018). Se ha reportado que el aumento único de la actividad de la B4GALT1 resulta en un incremento del hasta el 15.21% de las estructuras completamente galactosiladas de la EPO (Bydlinski., *et al.*, 2018 y Geisler., *et al.*, 2015). Por otra parte, estudios han demostrado una correlación entre los niveles de actividad intracelular de B4GALT1 y los N-glicanos galactosilados terminalmente, la ramificación de N-glicanos, la aparición de estructuras híbridas y la fucosilación del núcleo reducida (Geisler., 2015). Además de que, en un contexto más amplio, la enzima B4GALT1 presenta un posible cuello de botella en la sialilación de los N-glicanos, ya que esta enzima es requerida para la producción de N-glicanos siliados (Geisler., 2015). Esto es funcionalmente significativo, ya que la sialilación de N-glicanos mejora la vida media circulatoria de las glicoproteínas, incluidas las glicoproteínas terapéuticas. Por lo tanto, es deseable tener altos niveles de actividad B4GALT1 en cualquier sistema utilizado para producir glicoproteínas recombinantes para aplicaciones terapéuticas (Bydlinski., *et al.*, 2018 y Geisler., *et al.*, 2015).

En este trabajo se encontró un aumento de la expresión del gen de la B4GALT1 debido a la disminución de la temperatura, pero, la proporción de glicanos triantenarios y tetraantenarios no presento cambios importantes (se observó un incremento en su abundancia relativa de 1.84 y 1.73% respectivamente en el rh-tPA producido en los cultivos bifásicos, ver tabla 20).

En este trabajo, además de la disminución del 2.89% en la estructura A2FG2S1 y un aumento del 2.66% en la estructura A2FG2S2 a comparación con los cultivos control a 37°C, no se observaron diferencias en el porcentaje de abundancia relativa de las diferentes glicofomas encontradas en ambas condiciones de temperatura. Sí consideramos que el perfil cromatográfico observado en la Figura 21, es similar, tanto por cromatografía HPLC en fase reversa, como por HILIC entre ambas condiciones de temperatura se puede asumir que la glicosilación del rh-tPA final fue similar en ambas condiciones de temperatura.

La separación y el perfil de los glicanos liberados utilizando HILIC junto con un detector de fluorescencia y en combinación con una escalera de dextrano para normalizar los datos a unidades de glucosa ha sido una de las técnicas estándar durante décadas ya que es sencilla, relativamente barata, muy robusta, permite la caracterización y perfilación de glicanos comparativamente y cuantitativamente en múltiples ejecuciones y sistemas, además de que se puede obtener la mayor cantidad de información posible con el mínimo de muestra. HILIC también es una forma invaluable de abordar el análisis estructural detallado e incluso brindar información sobre estructuras isoméricas las cuales no se pueden distinguir en MS debido a que tienen M/Z idénticas (Thaysen-Andersen, 2010; Mariño, *et al.*, 2010). Una de las desventajas de esta técnica es que está limitada por una resolución y un rendimiento deficientes en comparación con la detección de MS (Thaysen-Andersen, 2010; Mariño, *et al.*, 2010). Cuanto mayor sea la resolución de la tecnología, más útil será para revelar diferencias entre los perfiles que se generan.

En este caso, en ninguna de las condiciones evaluadas, fueron detectadas las estructuras A2G2S2, A1G1S1M4 y A1G1S1M5 reportadas previamente por Spellman *et al.* 1989 (los autores hicieron uso de una combinación de las siguientes técnicas analíticas: cromatografía HPAE, análisis del enlace glicosídico, GLC-MS y espectroscopia H-NMR) y esto puede ser atribuido que la baja presencia de estas glicofomas (con base en lo reportado por Spellman., *et al.*, el porcentaje relativo es de A2G2S2 1.0%, A1G1S1M4 2.5% y A1G1S1M5 1.4%) no pudo ser identificada mediante HILIC (durante el análisis, hubo 3 estructuras que no pudieron ser determinadas).

En el caso de la inmunogenicidad de la proteína recombinante, se ha descrito que las líneas celulares de mamíferos, como las células CHO, pueden producir estructuras glicosiladas que son antigénicas en humanos como lo es el caso de el ácido N-glicolilneuraminico (Neu5Gc) (Butler, & Spearman, 2014). Para el caso del rh-tPA, este tipo de ácido siálico no fue detectado, sin embargo, este tipo ácido sialico tampoco ha sido reportado por Spellman., *et al.* 1989 y Parekh., *et al.*, 1989 en el rh-tPA.

Para el caso de los grupos fucosilados, la abundancia relativa no presento cambios, unicamente, se observó la disminución en la glicofoma A2FG2S1 en el rh-tPA producido

en los cultivos bifásicos. Hasta el momento, no ha sido descrito que cambios en la fucosilación de la proteína afecte tanto su actividad como su inmunogenicidad.

Considerando lo anteriormente descrito, en este trabajo se describió un análisis inicial de la glicosilación del rh-tPA entre ambas condiciones de temperatura, sin embargo, es importante volver a realizar el análisis con una muestra mayor de rh-tPA y una combinación de metodologías que permitan un análisis más detallado de la glicosilación (por ejemplo, confirmar que el Neu5Gc no se encuentra presente), ya que una de las limitantes de este trabajo fue que la línea CHO TF70R no produce una alta concentración de rh-tPA y la muestra obtenida fue apenas suficiente para llevar a cabo el análisis por HILIC (100 µg).

Debido a que la alta actividad de rh-tPA en sangre conduce a hiperfibrinólisis y causa sangrado excesivo; mientras que la baja actividad de rh-tPA conduce a hipofibrinólisis, una condición que aumenta los riesgos del paciente de sufrir una trombosis arterial es importante realizar un análisis de actividad de la proteína para evaluar posibles cambios en la actividad del rh-tPA producido bajo condiciones de hipotermia moderada.

En resumen, en este trabajo se alcanzó un incremento en la productividad específica mediante el cultivo de células CHOTF70R productoras de rh-tPA en un modo bifásico: a 37°C en la fase de crecimiento y a 30°C en la fase de producción. El cambio de temperatura demostró tener ventajas importantes las cuales benefician directamente la calidad del producto (disminución de metabolitos tóxicos que podrían haber afectado potencialmente la productividad y calidad del rh-tPA), y como pudo ser demostrado, el patrón de glicosilación aparentemente no fue modificado, por lo que esta estrategia de cultivo representa un procedimiento útil para mejorar el proceso de producción de rh-tPA sin que se vea comprometida la calidad de la proteína.

7. CONCLUSIONES

- En este trabajo se demostró que a baja temperatura (cultivos bifásicos a 30°C) la línea celular TF70R incrementa la productividad específica del rh-tPA y presentan un metabolismo disminuido (menor consumo de glucosa y glutamina, así como una disminución en la producción de metabolitos tóxicos como lactato y amonio) a comparación con los cultivos control a 37°C.
- Se presentó un método de purificación del rh-tPA mediante el uso de cromatografía de afinidad con L-lisina con el cual se puede obtener el rh-tPA purificado con el perfil característico reportado incluyendo las posibles glicofomas de la proteína.
- Los cambios presentados en la expresión de genes relacionados con la glicosilación como el aumento en la galactosiltransferasa y la silaliltransferasa así como la disminución de la beta galactosidasa y neuraminidasa sugirieron una afectación en los procesos de galactosilación y siliación, sin embargo, no se observaron cambios relevantes en el patrón de glicosilación final del rh-tPA entre ambas condiciones de temperatura.
- La disminución de la temperatura, en general, no mostró diferencias importantes en el porcentaje de abundancia relativa de las diferentes glicofomas encontradas, por lo que puede considerarse que el patrón de glicosilación aparentemente es similar en ambas condiciones de temperatura.
- El cambio de temperatura demostró tener ventajas importantes las cuales benefician directamente la productividad específica sin alterar patrón de glicosilación del rh-tPA (calidad), representando así a la hipotermia moderada como un procedimiento útil en el proceso de producción de rh-tPA.

8. PERSPECTIVAS

1. Repetir el cultivo en biorreactores evaluando el cambio de temperatura a los 3 días y obtener al menos 1L de muestra por condición para poder purificar una concentración mayor de rh-tPA.
2. Analizar posibles cambios en la actividad del rh-tPA debido al cambio de temperatura mediante ensayos de actividad amidolítica utilizando, por ejemplo, el sustrato cromogénico sintético S-2288.
3. Repetir el análisis de glicosilación separando las variantes tipo I y II del rh-tPA y haciendo uso de técnicas como WAX (para separación de las formas cargadas previo análisis por HILIC) y HILIC-MS para poder confirmar, con una mayor resolución, que no existan cambios en la glicosilación de la proteína.

9. REFERENCIAS

- Aflakiyan, S., Sadeghi, H. M. M., Shokrgozar, M., Rabbani, M., Bouzari, S., & Jahanian-Najafabadi, A. (2013). Expression of the recombinant plasminogen activator (reteplase) by a non-lytic insect cell expression system. *Research in pharmaceutical sciences*, 8(1), 9.
- Al-Fageeh, M. & Smales, M. (2006). Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochem. J.*, Vol. 397, pp. 247–259.
- Al-Fageeh, M. B., & Smales, C. M. (2009). Cold-inducible RNA binding protein (CIRP) expression is modulated by alternative mRNAs. *Rna*, 15(6), 1164-1176.
- Al-Fageeh, M., *et al.* (2005). The Cold-Shock Response in Cultured Mammalian Cells: Harnessing the Response for the Improvement of Recombinant Protein Production. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 93, No. 5. pp. 829-835.
- Aghamohseni, H., *et al.* (2017). A semi-empirical glycosylation model of a camelid monoclonal antibody under hypothermia cell culture conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol*, Vol. 44, pp. 1005-1020.
- Ahn, W. *et al.* (2008). Effect of Culture Temperature on Erythropoietin Production and Glycosylation in a Perfusion Culture of Recombinant CHO Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 101, No. 6, pp. 1234-1244.
- Altamirano, *et al.* (2006). Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *Journal of Biotechnology*, Vol. 125, pp. 547-556.
- Altamirano, C., *et al.* (2012). Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 17, pp. 2-14.
- Andersen, D., *et al.* (2000). Multiple Cell Culture Factors Can Affect the Glycosylation of Asn 184 in CHO-Produced Tissue-Type Plasminogen Activator. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 70, pp. 25-31.
- Andreasen, P. A., Sottrup-Jensen, L., Kjøller, L., Nykjær, A., Moestrup, S. K., Petersen, C. M., & Gliemann, J. (1994). Receptor-mediated endocytosis of plasminogen activators and activator/inhibitor complexes. *Febs Letters*, 338(3), 239-245.
- Applied Biosystems (2010). Relative Quantitation Using Comparative CT Getting Started Guide. Disponible en: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_053412.pdf
- Ars, E., Serra, E., de la Luna, S., Estivill, X., & Lázaro, C. (2000). Cold shock induces the insertion of a cryptic exon in the neurofibromatosis type 1 (NF1) mRNA. *Nucleic acids research*, 28(6), 1307-1312.
- Asgari, M., *et al.* (2014). Production of Human Tissue Plasminogen Activator (tPA) in *Cucumis sativus*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, Vol. 44, pp. 182-192.
- ATCC (2016). CHO-K1 (ATCC® CCL-61™) 25/Enero/2017, de ATCC Sitio web: <https://www.atcc.org/Products/All/CCL-61.aspx>.

Avello, V., *et al.* (2017). Impact of sodium butyrate and mild hypothermia on metabolic and physiological behaviour of CHO TF 70R cells. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol.27, pp. 55-62.

Baranowski, J., *et al.* (2003). HPLC Analysis of Plasminogen and Tissue Plasminogen Activator. *Chem. Anal. (Warsaw)*, Vol. 48, pp. 1-6.

Barrón Castillo Mauricio (2009). Estudio de la temperatura subfisiológica en cultivos de células CHO recombinantes: efectos sobre el metabolismo, ciclo y muerte celular. Tesis de maestría, México, Cuernavaca Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 100pp.

Baik, J. Y., Lee, M. S., An, S. R., Yoon, S. K., Joo, E. J., Kim, Y. H., ... & Lee, G. M. (2006). Initial transcriptome and proteome analyses of low culture temperature-induced expression in CHO cells producing erythropoietin. *Biotechnology and bioengineering*, 93(2), 361-371.

Barnes, L. & Dickson, A. (2006). Mammalian cell factories for efficient and stable protein expression. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 17, pp. 381–386.

Barta, A. *et al.* The expression of a nopaline synthase human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol. Biol*, Vol. 6, 347–357 (1986).

Becerra S., *et al.* (2012). Exploring the effect of mild hypothermia on CHO cell productivity. *Biochemical Engineering Journal*, Vol.60, pp.1-8.

Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G., & Frank, J. (1997). Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science*, 278(5346), 2123-2126

Bedoya, A., *et al.* (2016). Effect of Temperature Downshift on the Transcriptomic Responses of Chinese Hamster Ovary Cells Using Recombinant Human Tissue Plasminogen Activator Production Culture. *PLoS ONE* 11(3): e0151529. Doi: 10.1371/journal.pone.0151529.

Bedoya, A., (2017). *Estudio Transcriptómico y Proteómico de Células CHO Productoras de Glicoproteínas Recombinantes: Hipotermia Moderada* (Tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX.

Berg, P., Baltimore, D., Brenner, S., Roblin, R. O., & Singer, M. F. (1975). Summary statement of the Asilomar conference on recombinant DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(6) 1981.

Berg, E. A., Platts-Mills, T. A., & Commins, S. P. (2014). Drug allergens and food—the cetuximab and galactose- α -1, 3-galactose story. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 112(2), 97-101.

Bollati-Fogolín, M., *et al.* (2005). Temperature Reduction in Cultures of hGM-CSF-expressing CHO Cells: Effect on Productivity and Product Quality. *Biotechnol. Prog.* Vol.21, pp. 17-21.

Borisov, O. V., Field, M., Ling, V. T., & Harris, R. J. (2009). Characterization of oligosaccharides in recombinant tissue plasminogen activator produced in Chinese hamster ovary cells: two decades of analytical technology development. *Analytical chemistry*, 81(23), 9744-9754.

Borys, M., *et al.* (1994). Ammonia Affects the Glycosylation Patterns of Recombinant Mouse Placental Lactogen-I by Chinese Hamster Ovary Cells in a pH-Dependent Manner. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.43, pp. 505-514.

Bosques, C. J., Collins, B. E., Meador, J. W., Sarvaiya, H., Murphy, J. L., DelloRusso, G., ... & Myette, J. R. (2010). Chinese hamster ovary cells can produce galactose- α -1, 3-galactose antigens on proteins. *Nature biotechnology*, 28(11), 1153-1156.

Braunger, K., Pfeffer, S., Shrimal, S., Gilmore, R., Berninghausen, O., Mandon, E. C., ... & Beckmann, R. (2018). Structural basis for coupling protein transport and N-glycosylation at the mammalian endoplasmic reticulum. *Science*, 360(6385), 215-219.

Brooks, S. A. (2006). Protein glycosylation in diverse cell systems: implications for modification and analysis of recombinant proteins. *Expert review of proteomics*, 3(3), 345-359.

Brown, A.J., Gibson, S.J., Hatton, D., & James, D.R. (2018). Transcriptome-Based Identification of the Optimal Reference CHO Genes for Normalisation of qPCR Data. *Biotechnology journal*, 13 1.

Butler, M. (2006). Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology*, Vol. 50, pp. 57–76.

Butler, M. & Meneses A. (2012). Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 96, pp. 885-894.

Butler, M. (2005). Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 68, pp.283–291.

Butler, M., & Jenkins, H. (1989). Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture . *Journal of Biotechnology*, Vol.12, pp.97-110.

Butler, M., & Spearman, M. (2014). The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Current opinion in biotechnology*, 30, 107-112.

Bydlinski, N., Maresch, D., Schmieder, V., Klanert, G., Strasser, R., & Borth, N. (2018). The contributions of individual galactosyltransferases to protein specific N-glycan processing in Chinese Hamster Ovary cells. *Journal of biotechnology*, 282, 101-110.

Cain K., *et al.* 2013. A CHO cell line engineered to express XBP1 and ERO1- α has increased levels of transient protein expression. *Biotechnol Prog* Vol. 29: No.3. pp.697–706.

Caligur, V., *et al.* (2008). *Glycobiology Analysis Manual, 2nd Edition*. U.S.A: Sigma-Aldrich.

Chappell, S., *et al.* (2001). A 5' Leader of Rbm3, a Cold Stress-induced mRNA, Mediates Internal Initiation of Translation with Increased Efficiency under Conditions of Mild Hypothermia. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Vol. 276, No. 40, pp. 36917–36922.

Chen, P., & Harcum, S. (2006). Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in CHO cells. *Metabolic Engineering*, Vol.8, pp. 123–132.

Chotigeat, W., *et al.* (1994). Role of environmental conditions on the expression levels, glycoform pattern and levels of sialyltransferase for hFSH produced by recombinant CHO cells. *Cytotechnology*, Vol. 15, pp. 217-221.

Chuppa S., *et al.* (1997). Fermentor temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* Vol. 55 No.2. pp.328–338.

Clark, K., *et al.* (2004). Temperature Effects on Product-Quality-Related Enzymes in Batch CHO Cell Cultures Producing Recombinant tPA. *Biotechnol. Prog*, Vol. 20, pp. 1888–1892.

Clokie, S. (2018). Preparative Protein Biochemistry. In A. Hofmann & S. Clokie (Eds.), *Wilson and Walker's Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* (pp. 179-218). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/9781316677056.007

Collen, D., & Lijnen, H. R. (2004). Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2(4), 541-546.

Darby, R. A., Cartwright, S. P., Dilworth, M. V., & Bill, R. M. (2012). Which yeast species shall I choose? *Saccharomyces cerevisiae* versus *Pichia pastoris*. In *Recombinant Protein Production in Yeast* (pp. 11-23). Humana Press.

Davami, F., *et al.* (2010). Expression of a Novel Chimeric Truncated t-PA in CHO Cells Based on in Silico Experiments. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Vol. 2010, pp. 1-9.

De Alwis, D. M., Dutton, R. L., Scharer, J., & Moo-Young, M. (2007). Statistical methods in media optimization for batch and fed-batch animal cell culture. *Bioprocess and biosystems engineering*, 30(2), 107-113.

Dinnis, D., & James, D. (2005). Engineering Mammalian Cell Factories for Improved Recombinant Monoclonal Antibody Production: Lessons From Nature?. *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 91, No. 2, pp.180-189.

Diao J, Michalak TI. Composition, antigenic properties and hepatocyte surface expression of the woodchuck asialoglycoprotein receptor. *J Recept Signal Transduct Res* 1996;16:243–71.

Dorai, H., & Ganguly, S. (2014). Mammalian cell-produced therapeutic proteins: heterogeneity derived from protein degradation. *Current opinion in biotechnology*, 30, 198-204.

Drago, M., & Sainz, T. (2006). Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, Vol 37. No.1, pp. 1-8.

Dresios, J., *et al.* (2005). Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *PNAS*, Vol.102, No.6, pp.1865–1870.

Duarte, T. M., Carinhas, N., Barreiro, L. C., Carrondo, M. J., Alves, P. M., & Teixeira, A. P. (2014). Metabolic responses of CHO cells to limitation of key amino acids. *Biotechnology and bioengineering*, 111(10), 2095-2106.

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

- Dutton, R. L., Scharer, J. M., & Moo-Young, M. (1998). Descriptive parameter evaluation in mammalian cell culture. *Cytotechnology*, 26(2), 139-152.
- Dutton, R. L., Scharer, J. M., & Moo-Young, M. (1999). Hybridoma growth and productivity: effects of conditioned medium and of inoculum size. *Cytotechnology*, 29(1), 1-10.
- Eskla, K. L., Porosk, R., Reimets, R., Visnapuu, T., Vasar, E., Hundahl, C. A., & Luuk, H. (2018). Hypothermia augments stress response in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 121, 157-168.
- EUROPEAN PATENT APPLICATION (1988). Purification of tPA. EP0294132A3.
- Fann, CH., *et al.* (1999). Limitations to the Amplification and Stability of Human Tissue-Type Plasminogen Activator Expression by Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 69. No.2, pp. 204-212.
- Ferris, S. P., Kodali, V. K., & Kaufman, R. J. (2014). Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases. *Disease models & mechanisms*, 7(3), 331-341.
- Fox, S., *et al.* (2005). Active hypothermic growth: a novel means for increasing total interferon- γ production by Chinese-hamster ovary cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, Vol. 41, pp. 265–272.
- Fox, S., *et al.* (2005). A detailed understanding of the enhanced hypothermic productivity of interferon- γ by Chinese-hamster ovary cells. *Biotechnol. Appl. Biochem*, Vol.41, pp.255–264.
- Fujita, J. (1999). Cold Shock Response in Mammalian Cells. J , Vol. 1 No.2. pp. 243-255.
- Furukawa, K., & Ohsuye, K.. (1998). Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a Cterminal amidating enzyme. *Cytotechnology* , Vol. 26, pp. 153–164.
- Furukawa, K., & Ohsuye, K. (1999). Enhancement of productivity of recombinant -amidating enzyme by low temperature culture. *Cytotechnology*, Vol.31, pp. 85–94.
- Fussenegger, M., Bailey, J. (1998). Molecular Regulation of Cell-Cycle Progression and Apoptosis in Mammalian Cells: Implications for Biotechnology. *Biotechnol. Prog*, Vol.14, pp. 807-833.
- Fussenegger, M. (2001). The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies. *Biotechnology Progress*, 17(1), 1-51.
- Gammell, P., Barron, N., Kumar, N., & Clynes, M. (2007). Initial identification of low temperature and culture stage induction of miRNA expression in suspension CHO-K1 cells. *Journal of Biotechnology*, 130, 213–218.
- García. D. (2010). Plantas como Fábricas de Proteínas Recombinantes Humanas. *Cultura del Cuidado Enfermería*, Vol. 7 No.2, pp. 39-50.
- García, J.L. (2004). Ingeniería genética y biotecnología. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, Monografía XV: Nuevos avances en medicamentos*, pp. 199-236.

- Garcia-Ochoa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnology advances*, 27(2), 153-176.
- Geisler, C., Mabashi-Asazuma, H., Kuo, C. W., Khoo, K. H., & Jarvis, D. L. (2015). Engineering β 1, 4-galactosyltransferase I to reduce secretion and enhance N-glycan elongation in insect cells. *Journal of biotechnology*, 193, 52-65.
- Gillmeister, M., *et al.* (2009). An HPLC-MALDI MS method for N-glycan analyses using smaller size samples: Application to monitor glycan modulation by medium conditions. *Glycoconj J*, Vol. 26, pp. 1135-1149.
- Gómez, N., *et al.* (2010). Effect of Temperature, pH, Dissolved Oxygen, and Hydrolysate on the Formation of Triple Light Chain Antibodies in Cell Culture. *Biotechnol. Prog*, Vol.26, No.5, pp. 1438-1445.
- Goey, C. H., Tsang, J. M., Bell, D., & Kontoravdi, C. (2017). Cascading effect in bioprocessing—The impact of mild hypothermia on CHO cell behavior and host cell protein composition. *Biotechnology and bioengineering*, 114(12), 2771-2781.
- Gemmill TR, Trimble RB (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta* 1426:227–37.
- Gibson, B., Wilson, D. J., Feil, E., & Eyre-Walker, A. (2018). The distribution of bacterial doubling times in the wild. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1880), 20180789.
- Guile, G. R., Rudd, P. M., Wing, D. R., & Dwek, R. A. (1997). HPLC strategies for profiling and sequencing oligosaccharides. In *A laboratory guide to glycoconjugate analysis* (pp. 199-234). Birkhäuser Basel.
- Gupta, S. K., & Shukla, P. (2018). Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(24), 10457-10468.
- Ha, T., & Lee, G. (2015). Glutamine substitution: the role it can play to enhance therapeutic protein production. *Pharm. Bioprocess*, Vol. 3, No.3, pp. 249–261.
- Hansen, S., Kensy, F., Käser, A., & Büchs, J. (2011). Potential errors in conventional DOT measurement techniques in shake flasks and verification using a rotating flexitube optical sensor. *BMC biotechnology*, 11(1), 49.
- Haynes, P. A. (1998). Phosphoglycosylation: A new structural class of glycosylation?. *Glycobiology*, 8(1), 1-5.
- Helenius, A, & Aebi, M. (2001). Intracellular Functions of N-Linked Glycans. *SCIENCE*, Vol.291, pp. 2364-2369
- Hendrick, V., *et al.* (2001). Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phase's analysis. *Cytotechnology*, Vol. 36, pp. 71-83.
- Hennicke, J., Reinhart, D., Altmann, F., & Kunert, R. (2019). Impact of temperature and pH on recombinant human IgM quality attributes and productivity. *New biotechnology*, 50, 20-26.
- Herbert, D. *et al.* (2005). The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *TRENDS in Cell Biology*, Vol.15 No.7, pp. 364-370.

Hidalgo, M., (2010). *Estudio transcripcional de las vías de N-glicosilación en células de ovario de hámster chino (CHO) cultivadas en condiciones de hipotermia moderada (tesis de maestría)*. Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

Higel, F., Sandl, T., Kao, C. Y., Pechinger, N., Sörgel, F., Friess, W., ... & Seidl, A. (2019). N-glycans of complex glycosylated biopharmaceuticals and their impact on protein clearance. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 139, 123-131.

Hilger, C., Fischer, J., Wölbing, F., & Biedermann, T. (2019). Role and mechanism of galactose- α -1, 3-galactose in the elicitation of delayed anaphylactic reactions to red meat. *Current allergy and asthma reports*, 19(1), 3.

Higgins, E. (2010). Carbohydrate analysis throughout the development of a protein therapeutic. *Glycoconj J*, Vol. 27, pp. 211–225.

Hong Li., *et al.* (2017). Understanding protein glycosylation pathways in bacteria. *Future Microbiol*, Vol. 12, pp.59-72.

Hossler, P., Khattak, S., & Jian Li, Z. (2009). Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology*, Vol. 19, pp. 936–949.

Hunter, M., Yuan, P., Vavilala, D., & Fox, M. (2019). Optimization of protein expression in mammalian cells. *Current protocols in protein science*, 95(1), e77.

Ikezawa, H. (2002). Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 25(4), 409-417.

Ikonomou, L., Schneider, Y. J., & Agathos, S. N. (2003). Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 62(1), 1-20.

Ivarsson, M., Villiger, T. K., Morbidelli, M., & Soos, M. (2014). Evaluating the impact of cell culture process parameters on monoclonal antibody N-glycosylation. *Journal of biotechnology*, 188, 88-96.

Jayapal, K., *et al.* (2008). Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells- 20 Years and Counting. *CHO Consortium. SBE Special Section*, 1, pp. 40-47.

Jayaprakash, N. G., & Surolia, A. (2017). Role of glycosylation in nucleating protein folding and stability. *Biochemical Journal*, 474(14), 2333-2347

Jenkins, N., *et al.* (1996). Getting the Glycosylation Right: Implication for the Biotechnology Industry. *Nature Biotechnology*, Vol. 14, pp. 975-961.

Jenkins, N., & Curling, M. (1994). Glycosylation of recombinant proteins: Problems and prospects. *Enzyme Microb. Technol*, Vol.16, pp. 354-364.

Jiang, R., Chen, H., & Xu, S. (2018). pH excursions impact CHO cell culture performance and antibody N-linked glycosylation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 41(12), 1731-1741.

Jozala, A., *et al.* (2016). Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol 47s, pp. 51-63.

Julian, K., *et al.* (2003). The Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins in Plants. *Nature Reviews*, Vol. 4, pp. 795- 805.

Kaufmann, H., *et al.* (1999). Influence of Low Temperature on Productivity, Proteome and Protein Phosphorylation of CHO Cells. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, Vol. 63, No. 5, pp. 574-582.

Kawasaki, N., *et al.* (2009). The Significance of Glycosylation Analysis in Development of Biopharmaceuticals. *Biol. Pharm. Bull*, Vol. 32, pp. 796-800.

Keller, N., *et al.* (2007). Classification of organism: cell lines (draft). The Swiss Agency for the Environment, forests and Landscape (SAEFL), Berne 12 pp., Federal Office for the Environment (FOEN), Disponible en: <https://www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology.html>

Kellokumpu, S. (2019). Golgi pH, ion and redox homeostasis: How much do they really matter?. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 93.

Kim, J., *et al.* (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 93, pp. 917–930.

Kimura, R. and Miller, W. M. (1996), Effects of elevated pCO₂ and/or osmolality on the growth and recombinant tPA production of CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 52: 152–160.

Kimura, R., & Miller, W. (1997). Glycosylation of CHO-Derived Recombinant tPA Produced under Elevated pCO₂. *Biotechnol. Prog.*, Vol. 13, pp. 311-317.

Kildegaard, H. F., Baycin-Hizal, D., Lewis, N. E., & Betenbaugh, M. J. (2013). The emerging CHO systems biology era: harnessing the 'omics revolution for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 24(6), 1102-1107.

Kretzmer, G. (2002). Industrial processes with animal cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(2-3), 135-142.

Krištić, J., Zoldoš, V., & Lauc, G. (2014). Complex genetics of protein N-glycosylation. In *Glycoscience: biology and medicine*. Springer Japan.

Kou, T., *et al.* (2011). Increasing the Productivity of TNFR-Fc in GS-CHO Cells at Reduced Culture Temperatures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, Vol.16, pp. 136-143.

Kou, T. C., Fan, L., Zhou, Y., Ye, Z. Y., Liu, X. P., Zhao, L., & Tan, W. S. (2011). Detailed understanding of enhanced specific productivity in Chinese hamster ovary cells at low culture temperature. *Journal of bioscience and bioengineering*, 111(3), 365-369.

Kodati, B., Dorbha, S., & Kunaparaju, R. K. (2016). Heterologous Protein Expression in Different Host Systems. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(4), 1068-1074.

Kumar, N., *et al.* (2007). Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. *Cytotechnology*, Vol. 53, pp. 33–46.

Kumar, N., Gammell, P., Meleady, P., Henry, M., & Clynes, M. (2008). Differential protein expression following low temperature culture of suspension CHO-K1 cells. *BMC biotechnology*, 8(1), 42.

Kunkel, J. P., Jan, D. C., Jamieson, J. C., & Butler, M. (1998). Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *Journal of biotechnology*, 62(1), 55-71.

Kunert, R., & Reinhart, D. (2016). Advances in recombinant antibody manufacturing. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(8), 3451-3461.

Lattova, E., *et al.* (2006). Method for Investigation of Oligosaccharides from Glycopeptides: Direct Determination of Glycosylation Sites in Proteins. *Anal. Chem*, 78, pp. 2977-2984.

Lalonde, M. E., & Durocher, Y. (2017). Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *Journal of biotechnology*, 251, 128-140.

Lee, J. S., Park, H. J., Kim, Y. H., & Lee, G. M. (2010). Protein reference mapping of dihydrofolate reductase-deficient CHO DG44 cell lines using 2-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, 10(12), 2292-2302.

Lepeniez, B., & Seeberger, P. (2014). Simply better glycoproteins. Reducing the glycan heterogeneity of recombinant proteins may improve the efficacy of biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology*, Vol.32 No.5, pp. 442-445.

Liao, H., Ma, J., Yao, H., & Liu, X. W. (2018). Recent progress of C-glycosylation methods in the total synthesis of natural products and pharmaceuticals. *Organic & biomolecular chemistry*, 16(11), 1791-1806.

Lim, Y., Wong, N. S., Lee, Y. Y., Ku, S. C., Wong, D. C., & Yap, M. G. (2010). Engineering mammalian cells in bioprocessing—current achievements and future perspectives. *Biotechnology and applied biochemistry*, 55(4), 175-189.

Lin, A., *et al.* (1993). Production of tPA in Recombinant CHO Cells Under Oxygen-Limited Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 42, pp. 339-350.

Lie, S., Wang, T., Forbes, B., Proud, C. G., & Petersen, J. (2019). The ability to utilise ammonia as nitrogen source is cell type specific and intricately linked to GDH, AMPK and mTORC1. *Scientific reports*, 9(1), 1-15.

Lombard, J. (2016). The multiple evolutionary origins of the eukaryotic N-glycosylation pathway. *Biology direct*, 11(1), 36.

Marchant R., *et al.* (2008). Metabolic rates, growth phase, and mRNA levels influence cell-specific antibody production levels from in vitro-cultured mammalian cells at sub-physiological temperatures. *Mol Biotechnol*. Vol 39. No.1. pp. 69–77.

Mariño, K., Bones, J., Kattla, J. J., & Rudd, P. M. (2010). A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nature chemical biology*, 6(10), 713-723.

Martinez-Duncker, I., Mollicone, R., Codogno, P., & Oriol, R. (2003). The nucleotide-sugar transporter family: a phylogenetic approach. *Biochimie*, 85(3-4), 245-260.

- Masoumiasl, A., Jalali-Javaran, M., Mahboudi, F., & Alizadeh, H. (2010). Cloning and expression of tissue plasminogen activator (t-pa) gene in tobacco plants. *Scientific research and Essays*, 5(9), 917-922.
- Masterton, R. J., Roobol, A., Al-Fageeh, M. B., Carden, M. J., & Smales, C. M. (2010). Post-translational events of a model reporter protein proceed with higher fidelity and accuracy upon mild hypothermic culturing of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and bioengineering*, 105(1), 215-220.
- Masterton, R. J., & Smales, C. M. (2014). The impact of process temperature on mammalian cell lines and the implications for the production of recombinant proteins in CHO cells. *Pharmaceutical bioprocessing*, 2(1), 49-61.
- Mason, M., Sweeney, B., Cain, K., Stephens, P., & Sharfstein, S. T. (2014). Reduced culture temperature differentially affects expression and biophysical properties of monoclonal antibody variants. *Antibodies*, 3(3), 253-271.
- Matar, P. (Agosto, 2008). Biofármacos y Biosimilares - Riesgos y desafíos en los nuevos desarrollos. *HEMATOLOGIA*, Vol. 12 N° 2, pp. 57-59.
- Matsumoto, S., Ikura, K., Ueda, M. & Sasaki, R. Characterization of a human glycoprotein (erythropoetin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol. Biol.* Vol. 27, 1163–1172 (1995).
- McAtee, A., *et al.* (2014). Role of Chinese hamster ovary central carbon metabolism in controlling the quality of secreted biotherapeutic proteins. *Pharm. Bioprocess.*, Vol.2 No.1, pp. 63-74.
- McHugh, K. P., Xu, J., Aron, K. L., Borys, M. C., & Li, Z. J. (2020). Effective temperature shift strategy development and scale confirmation for simultaneous optimization of protein productivity and quality in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Progress*, e2959.
- McKeehan, W. (1982). Glcolysis, glutaminolysis and cell proliferation. *Cell Biol. Int. Rep.*, Vol. 6, No. 7, pp. 635-650
- Merten, O. W. (2006). Introduction to animal cell culture technology—past, present and future. *Cytotechnology*, 50(1-3), 1.
- Mikolajczyk, K., Kaczmarek, R., & Czerwinski, M. (2020). How glycosylation affects glycosylation: the role of N-glycans in glycosyltransferase activity. *Glycobiology*.
- Miyagi, T., & Yamaguchi, K. (2012). Mammalian sialidases: physiological and pathological roles in cellular functions. *Glycobiology*, 22(7), 880-896.
- Morris, A., & Schmid, J. (2000). Effects of insulin and LongR3 on serum-free Chinese Hamster Ovary Cell cultures expressing two recombinant proteins. *Biotechnol. Pog.*, Vol. 16, pp. 693-697.
- Müller, D., Bayer, K., & Mattanovich, D. (2006). Potentials and limitations of prokaryotic and eukaryotic expression systems for recombinant protein production—a comparative view. *Microbial Cell Factories*, 5(1), 1-2.
- Nam, JH., *et al.* (2008). The Effects of Culture Conditions on the Glycosylation of Secreted Human Placental Alkaline Phosphatase Produced in Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 100, No. 6, pp. 1178-1192.

Nam JH., *et al.* (2009). The effects of microcarrier culture on recombinant CHO cells under biphasic hypothermic culture conditions. *Cytotechnology*, Vol 59, pp. 81-91.

Neermann, J., & Wagner, R. (1996). Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY*, Vol. 166, pp.152-169.

Nimtz, M., *et al.* (1990). Carbohydrate structures of a human tissue plasminogen activator variant expressed in recombinant Chinese hamster ovary cells. *Federation of European Biochemical Societies*, Vol. 271 No.1,2, pp. 14-18.

Oguchi, S., *et al.* (2006). pH Condition in temperature shift cultivation enhances cell longevity and specific hMab productivity in CHO culture. *Cytotechnology*, Vol.52, pp.199-207.

Ochoa H.E, Nagore R.N y Zamudio H.N. (2006) Capítulo II: Estructura Funcional Celular En: Bioquímica: una exploración de la complejidad de la vida

Owczarek, B., Gerszberg, A., & Hnatuszko-Konka, K. (2019). A brief reminder of systems of production and chromatography-based recovery of recombinant protein biopharmaceuticals. *BioMed research international*, 2019.

Phadtare, S., Alsina, J., & Inouye, M. (1999). Cold-shock response and cold-shock proteins. *Current opinion in microbiology*, 2(2), 175-180.

Palomares, L.A., Uribe JM, Delgado A., Hernández M., Servin P., Pérez J., Ramirez O.T., *et al.* (2006). The impact of the bioprocess on the glycosylation of recombinant human erythropoietin. *Cell Culture Engineering X*, Whistler, Canada.

Palomares, L., *et al.* (2007). Superando los retos del cultivo de células animales a través de la bioingeniería. *Biotecnología*, Vol.14, pp. 385-389

Parekh, R. B., Dwek, R. A., Thomas, J. R., Opendakker, G., Rademacher, T. W., Wittwer, A. J., ... & Harakas, N. (1989). Cell-type-specific and site-specific N-glycosylation of type I and type II human tissue plasminogen activator. *Biochemistry*, 28(19), 7644-7662.

Park, J. H. *et al.* Proteomic Analysis of Host Cell Protein Dynamics in the Culture Supernatants of Antibody-Producing CHO Cells. *Sci. Rep.* 7, 44246; doi: 10.1038/srep44246 (2017).

Park, J. H., Noh, S. M., Woo, J. R., Kim, J. W., & Lee, G. M. (2016). Valeric acid induces cell cycle arrest at G1 phase in CHO cell cultures and improves recombinant antibody productivity. *Biotechnology journal*, 11(4), 487-496.

Pecqueur, C., *et al.* (2008). Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization. *The FASEB Journal*, Vol. 22, pp. 9-18.

Pereira, S., *et al.* (2018). Impact of CHO Metabolism on Cell Growth and Protein Production: An Overview of Toxic and Inhibiting Metabolites and Nutrients. *Biotechnol. J.*, Vol.13, pp. 1-13.

Pérez-Rodríguez, S., Ramírez-Lira, M. D. J., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2020). Nutrient supplementation strategy improves cell concentration and longevity, monoclonal antibody production and lactate metabolism of Chinese hamster ovary cells. *Bioengineered*, 11(1), 463-471.

Pihlasalo, S. (2011). *Quantification of Proteins and Cells Luminometric Nonspecific Particle-Based Methods*. (Tesis doctoral). University of Turku, Turku.

Phadtare, S., Alsina, J., & Inouye, M. (1999). Cold-shock response and cold-shock proteins. *Current Opinion in Microbiology*, Vol.2, pp.175-180.

Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR*, 1, 89-113.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* 29: e4

Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, 26(6), 509-515. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>

Puck, T., *et al.* (1958). Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *GENETICS OF SOMATIC MAMMALIAN CELLS*, Vol. 3, pp.945-958.

Radhakrishnan, D., Robinson, A. S., & Ogunnaike, B. A. (2018). Controlling the glycosylation profile in mAbs using time-dependent media supplementation. *Antibodies*, 7(1), 1.

Rapley, R. (2018). Electrophoretic Techniques. In A. Hofmann & S. Clokie (Eds.), *Wilson and Walker's Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* (pp. 219-252). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/9781316677056.008

Rapley, R. (2018). Recombinant DNA Techniques and Molecular Cloning. In A. Hofmann & S. Clokie (Eds.), *Wilson and Walker's Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* (pp. 73-178). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/9781316677056.006

Reynoso, G., (2016). *Matraces con agitación por resonancia acústica y orbital: Caracterización del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno y comparación de cultivos de Escherichia coli* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX

Richard, S. (2005). *Active hypothermic growth: a novel means for increasing total recombinant protein production by CHO cells* (tesis de doctorado). MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY, USA.

Richelle, A., & Lewis, N. E. (2017). Improvements in protein production in mammalian cells from targeted metabolic engineering. *Current opinion in systems biology*, 6, 1-6.

Roobol, A., Carden, M. J., Newsam, R. J., & Smales, C. M. (2009). Biochemical insights into the mechanisms central to the response of mammalian cells to cold stress and subsequent rewarming. *The FEBS journal*, 276(1), 286-302.

Rodríguez, J., *et al.* (2005). Enhanced Production of Monomeric Interferon- β by CHO Cells through the Control of Culture Conditions. *Biotechnology Progress*, Vol. 21, pp. 22-30.

- Roggenbuck, D., Mytilinaiou, M. G., Lapin, S. V., Reinhold, D., & Conrad, K. (2012). Asialoglycoprotein receptor (ASGPR): a peculiar target of liver-specific autoimmunity. *Autoimmunity highlights*, 3(3), 119.
- Rouf, S., *et al.* (1996). Tissue-Type Plasminogen Activator: Characteristics, applications and Production Technology. *Biotechnology Advances*, Vol. 14, No.3, pp. 239-266.
- Rudd, P., *et al.* (2001). Glycosylation and the Immune System. *Carbohydrates and Glycobiology*, Vol. 291, pp. 2370-2376.
- Serrato, J., *et al.* (2007). Differences in the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by hybridomas cultured in serum-supplemented, serum-free or chemically defined media. *Biotechnol. Appl. Biochem*, Vol. 47, pp. 113-124.
- Schiermeyer, A., Schinkel, H., Apel, S., Fischer, R., & Schillberg, S. (2005). Production of Desmodus rotundus salivary plasminogen activator α 1 (DSPA α 1) in tobacco is hampered by proteolysis. *Biotechnology and bioengineering*, 89(7), 848-858.
- Stanisz, J., *et al.* (1983). Comparative energy metabolism in cultured heart muscle and hela cells. *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 115 (3), pp. 320-330.
- Serrato, J., *et al.* (2004). Heterogeneous Conditions in Dissolved Oxygen Affect N-Glycosylation but Not Productivity of a Monoclonal Antibody in Hybridoma Cultures. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, Vol. 88, No. 2, pp. 176-188.
- Seismann, H., Blank, S., Braren, I., Greunke, K., Cifuentes, L., Grunwald, T., ... & Spillner, E. (2010). Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of α -1, 3-core fucosylation. *Molecular immunology*, 47(4), 799-808
- Shi, M., *et al.* (2005). Controlled growth of Chinese hamster ovary cells and high expression of antibody-IL-2 fusion proteins by temperature manipulation. *Biotechnology Letters*, Vol. 27, pp. 1879-1884.
- Shukla, A., & Gottschalk, U. (2013). Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing. *Trends in Biotechnology*, Vol.31 Issue 3, pp. 147-154.
- Simon, A., & Hofmann, A. (2018). Spectroscopic Techniques. In A. Hofmann & S. Clokie (Eds.), *Wilson and Walker's Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* (pp. 454-499). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/9781316677056.015
- Sonna, L. A., Fujita, J., Gaffin, S. L., & Lilly, C. M. (2002). Invited review: effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *Journal of applied physiology*, 92(4), 1725-1742.
- Sou SN., *et al.* (2015). Understanding the impact of different bioprocess conditions on monoclonal antibody glycosylation in CHO cell cultures through experimental and computational analyses. *BMC Proc.* Vol.9 No.6.
- Sou SN., *et al.* (2015). How does mild hypothermia affect monoclonal antibody glycosylation? *Biotechnol. Bioeng.* Vol.112. pp.1165 –1176.

Sou, S. N., Jedrzejewski, P. M., Lee, K., Sellick, C., Polizzi, K. M., & Kontoravdi, C. (2017). Model-based investigation of intracellular processes determining antibody Fc-glycosylation under mild hypothermia. *Biotechnology and bioengineering*, 114(7), 1570-1582.

Spellman, M., *et al.* (1989). Carbohydrate Structures of Human Tissue Plasminogen Activator Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 264 No.24, pp. 14100-14111.

Staub, J. M. *et al.* High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotechnol.* Vol.18, 333–338 (2000).

Strober W., 2001. Trypan blue Exclusion Test of Cell Viability. In: *Curr. Protoc. Immunol.* John Wiley & Sons Inc

Sweich, K., *et al.* (2012). Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expression and Purification*, Vol. 84, pp. 147-153.

Tan, H. K., Lee, M. M., Yap, M. G., & Wang, D. I. (2008). Overexpression of cold-inducible RNA-binding protein increases interferon- γ production in Chinese-hamster ovary cells. *Biotechnology and applied biochemistry*, 49(4), 247-257.

Thaysen-Andersen, M. (2010). Analysis of protein glycosylation using HILIC. *Merck Sequant Technical Summary*, 1-4.

Tjio, J. H., & Puck, T. T. (1958). Genetics of somatic mammalian cells: II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *The Journal of experimental medicine*, 108(2), 259.

Tripathi, N. K., & Shrivastava, A. (2019). Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7.

Trombetta, E. S. (2003). The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology*, 13(9), 77R-91R.

Trummer, E., *et al.* (2006). Process Parameter Shifting: Part I. Effect of DOT, pH, and Temperature on the Performance of Epo-Fc Expressing CHO Cells Cultivated in Controlled Batch Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 94, No. 6, pp. 1033-1044.

Trummer, E., *et al.* (2006). Process Parameter Shifting: Part II. Biphasic Cultivation—A Tool for Enhancing the Volumetric Productivity of Batch Processes Using Epo-Fc Expressing CHO Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 94, No. 6, pp. 1045-1052.

Toronjo-Urquiza, L., Acosta-Martin, A. E., James, D. C., Nagy, T., & Falconer, R. J. (2019). Resveratrol addition to CHO cell culture media: The effect on cell growth, monoclonal antibody synthesis and its chemical modification. *Biotechnology progress*.

Underhill, M. F., Marchant, R. J., Carden, M. J., James, D. C., & Smales, C. M. (2006). On the effect of transient expression of mutated eIF2 α and eIF4E eukaryotic translation initiation factors on reporter gene expression in mammalian cells upon cold-shock. *Molecular biotechnology*, 34(2), 141-149.

Varki A, Cummings RD, Esko JD, *et al.*, (2009) editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908/>.

Varki A, Cummings RD, Esko JD, *et al.*, (2017) editors. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274/>

Valladeau, J., Duvert-Frances, V., Pin, J. J., Kleijmeer, M. J., Ait-Yahia, S., Ravel, O., ... & Zurawski, S. M. (2001). Immature human dendritic cells express asialoglycoprotein receptor isoforms for efficient receptor-mediated endocytosis. *The Journal of Immunology*, 167(10), 5767-5774.

Vergara M., *et al.* (2009). Glycosylation stage leads production of extracellular rh-tPA at sub-physiological temperatures of culture. *N. Biotechnology*, Vol.25.

Vergara M., *et al.* (2012). Simultaneous environmental manipulations in semi-perfusion cultures of CHO cells producing rh-tPA. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol.15, Issue.6, pp. 2-9.

Vergara M., *et al.* (2014). Differential effect of culture temperature and specific growth rate on CHO cell behavior in chemostat culture. *PLoS One* Vol.9.

Vergara, M., *et al.* (2015). Endoplasmic Reticulum-Associated rht-PA Processing in CHO Cells: Influence of Mild Hypothermia and Specific Growth Rates in Batch and Chemostat Cultures. *PLOS ONE*, Vol. 12, pp.1-12.

Walsh, G. (2014). Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature Biotechnology*, Vol. 32, pp.992-1000.

Walsh, G. (2003). *Biopharmaceuticals. Biochemistry and Biotechnology*. England: Wiley.

Walsh, G.. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *NATURE BIOTECHNOLOGY*, Vol.36 No.12, pp.1136-1145.

Walsh, G., & Jefferis, R. (2006). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature Biotechnology*, Vol. 24 No.10, pp. 1241-1252.

Wang, Y., Huang, S., Haga, Y., Kweon, H. K. K., Hirayama, H., Andrews, P., & Suzuki, T. (2017). Glycosylation quality control by the Golgi structure. *The FASEB Journal*, 31(1_supplement), 784-1.

Wang, Q., Yin, B., Chung, C. Y., & Betenbaugh, M. J. (2017). Glycoengineering of CHO cells to improve product quality. In *Heterologous Protein Production in CHO Cells* (pp. 25-44). Humana Press, New York, NY.

Wellmann, S., *et al.* (2003). Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by a HIF-1-independent mechanism. *Journal of Cell Sc*, Vol. 117 No.9, pp.1785-1794.

Werner, R. G., Kopp, K., & Schlueter, M. (2007). Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems. *Acta Paediatrica*, 96, 17-22.

Weizmann Institute of Science (2016). Synthesis of substrates in N-glycan biosynthesis SuperPath. 24/Ene/2017, de PathCards. Pathway Unification Database. Weizman Institute of Science Sitio web: http://pathcards.genecards.org/card/synthesis_of_substrates_in_n-glycan_biosynthesis.

- Wuest, D. M., Harcum, S. W., & Lee, K. H. (2012). Genomics in mammalian cell culture bioprocessing. *Biotechnology advances*, 30(3), 629-638.
- Wippermann, A., *et al.* (2017). Integrative analysis of DNA methylation and gene expression in butyrate-treated CHO cells. *Journal of Biotechnology*, Vol. 257, pp. 150–161.
- Wong, D., *et al.* (2010). Profiling of N-Glycosylation Gene Expression in CHO Cell Fed-Batch Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 107. No.3, pp. 516-528.
- Wong, N. S., Wati, L., Nissom, P. M., Feng, H. T., Lee, M. M., & Yap, M. G. (2010). An investigation of intracellular glycosylation activities in CHO cells: effects of nucleotide sugar precursor feeding. *Biotechnology and bioengineering*, 107(2), 321-336.
- Wulhfard S., *et al.* (2008). Mild Hypothermia Improves Transient Gene Expression Yields Several Fold in Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology Progress*, Vol. 24, pp. 458-465.
- Wurm, F. M., & Hacker, D. (2011). First CHO genome. *Nature biotechnology*, 29(8), 718.
- Xu, Y., & Cacia, J. (2000). A reversed-phase hplc assay for plasminogen activators. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol*, Vol 23. No. 12, pp. 1841-1850.
- Xu, J., Tang, P., Yongky, A., Drew, B., Borys, M. C., Liu, S., & Li, Z. J. (2019, January). Systematic development of temperature shift strategies for Chinese hamster ovary cells based on short duration cultures and kinetic modeling. In *mAbs* (Vol. 11, No. 1, pp. 191-204). Taylor & Francis.
- Yanagishita, M. (1993). Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Pathology International*, 43(6), 283-293.
- Yao, J., *et al.* (2015). Plants as Factories for Human Pharmaceuticals: Applications and Challenges. *Int. J. Mol. Sci.*, Vol. 16, pp. 28549-28565.
- Yoon, S., *et al.* (2003). Effect of Low Culture Temperature on Specific Productivity, Transcription Level, and Heterogeneity of Erythropoietin in Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 82, No.3, pp. 290-298.
- Yoon, S., *et al.* (2003). Effect of Low Culture Temperature on Specific Productivity and Transcription Level of Anti-4-1BB Antibody in Recombinant ChineseHamster Ovary Cells. *Biotechnol. Prog*, Vol. 19, pp. 1383-1386.
- Yoon, S., *et al.* (2004). Enhancing Effect of Low Culture Temperature on Specific Antibody Productivity of Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells: Clonal Variation. *Biotechnol. Prog*, Vol. 20, pp. 1683-1688.
- Yoon, S., *et al.* (2006). Adaptation of Chinese hamster ovary cells to low culture temperature: Cell growth and recombinant protein production. *Journal of Biotechnology*, Vol.122 , pp. 463–472.
- Yoon, S., *et al.* (2006). Biphasic culture strategy for enhancing volumetric erythropoietin productivity of Chinese hamster ovary cells. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 39, pp. 362-365.

Yoon S., *et al.* (2007). Effect of culture temperature on follicle-stimulating hormone production by Chinese hamster ovary cells in a perfusion bioreactor. *Biotechnological Products and Process Engineering*, Vol. 76, pp.83-89.

Zamani, A., *et al.* (2007). Lower Culture-Temperature Effects on Recombinant IFN- γ Production in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. *Int. J. Agri. Biol.* Vol.9, No.3, pp. 378-381.

Zhang, X., & Wang, Y. (2016). Glycosylation quality control by the Golgi structure. *Journal of molecular biology*, 428(16), 3183-3193.

Zhang L., *et al.* (2016). Glycan analysis of therapeutic glycoproteins. *MABS*, Vol 8. No.2, pp. 205-215.

Zhang, P., Woen, S., Wang, T., Liao, B., Zhao, S., Chen, C., ... & Rudd, P. M. (2016). Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. *Drug discovery today*, 21(5), 740-765.

Zhu, X., Bühner, C., & Wellmann, S. (2016). Cold-inducible proteins CIRP and RBM3, a unique couple with activities far beyond the cold. *Cellular and molecular life sciences*, 73(20), 3839-3859.

Zhu, G., & Lee, A. S. (2015). Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis. *Journal of cellular physiology*, 230(7), 1413-1420.

10. Anexos

Tabla 21. Oligonucleótidos usados para el análisis transcripcional.

Función	Proteína	Secuencia de oligonucleótidos (5-3')
Choque frío	CIRP	R:AAA GTC TGG TCA CGA GGC CA F: AGT GAG CAC CTT GTC CCC AC
	RBM3	R:CCC CGG GAT CTT TGA GTC TC F: ATG ARC AGG CAC TTG AAG ACC
Glicosiltransferasas	β 1,4 Galactosiltransferasa 1 (B4GALT1)	R:GTC CCG ATG TCC ACT GTG ATT F: TGC GCT TTG ATG GTT TGA AC
	α 2,3 Sialiltransferasa (ST3GAL4)	R: CTT CAC TCC CTT TGG TCC CA F:GAA CAG CCC ATC TTC CTC CA
Glicosidasas	Sialidasa (NEU2)	R: CAC CTC CTC AGC TTG CCA CT F: CAA GAC GGA TGA GCA TGC AG
	Galactosidasa (GLB1)	R: TGTCGCAGATCGTTGGACATGA F: AAC TTT GGC CTC AGT TGG GA
	α 1,2-Manosidasa 1B (Man1A2)	R: ATG AGG CCG GTA ATC CAG ATA TAC F: TCTTTCAACGAGTGGCATGAAG
Transportadores	CMP-SialT	R: GCT GAG AAG CCT TTC ATG ATG TT F: TCT GGT TTG TCA TCT TCC TTG CT
	UDP-GalT	R: AAT TCC AGC AGC TAC GAA CCC F: CAC CGC AGC TGT CTT CTC G
Retículo endoplasmático	GRP78	R: CAT CGC CAA TCA GAC GCT C F: CGC GTG GAG ATC ATA GCC A
	PDI	R: GGT GTT TGT GTT GGC AGT GC F: GAG GCT TGC CCC TGA GTA TG
rt-PA	rt-PA	R: TCT GAA TCG GGC ATG GAT TT F: GGA TGC AAT GAA GAG AGG GC