

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
CAMPUS TIJUANA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA



**“CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL CULTIVO BIFÁSICO EN CONDICIONES
DE HIPOTERMIA MODERADA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA
ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TISULAR (tPA) RECOMBINANTE EN LA LÍNEA
CELULAR CHO-TF70R”**

TESIS
PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:
HÉCTOR FRAYDE GÓMEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA DE LOS ANGELES CANCINO RODEZNO

TIJUANA, BAJA CALIFORNIA

FEBRERO 2012

**“CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL CULTIVO BIFÁSICO EN CONDICIONES
DE HIPOTERMIA MODERADA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA
ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TISULAR (TPA) RECOMBINANTE EN LA
LÍNEA CELULAR CHO-TF70R”**

TESIS
PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:
HÉCTOR FRAYDE GÓMEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA DE LOS ANGELES CANCINO RODEZNO

TIJUANA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

FEBRERO 2012

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz, en el departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, Distrito Federal. Bajo la asesoría de la Dra. María de los Angeles Cancino Rodezno. Durante la realización de este proyecto se contó con los apoyos económicos de CONACyT Ciencia Básica 104951-Z y presupuesto de la UNAM otorgados a la Dra. Valdez Cruz.

DEDICATORIA

Agradezco antes que nada a mi familia, mi papá Héctor Frayde Orozco; mi madre Dora Luz Gómez Vega y a mis hermanos, Luis Fernando y Jesús Andrés, y mi abuelita Rosalina Orozco; que han estado conmigo a lo largo de todo este tiempo, aún en la distancia siempre a mi lado y apoyándome.

A mis amigos que han marcado y son parte de mi vida y familia, Carlos Virgen, Loan Villalobos, Jonathan Vincent, Janneth Leyva, Keyla Armenta por apoyarme en cada decisión que he tomado y han estado conmigo en las buenas y las malas. Y a todos con los que compartí grandes vivencias a lo largo de la carrera.

A los niños del Centro Oncológico Pediátrico por su mensaje de vida, en especial a Ian López Guzmán, por enseñarme lo valioso del don de la vida, por demostrarme que todo depende con la dedicación y decisión con la que se enfrentan los problemas.

A todos y cada uno de los miembros de la familia Trujillo- Valdez, Pedro, Ramsés, Deisy, Nelly, Mafer, Lupita, Andrea, Ramsés G., Tanya (CICESE), Charlie, Leslie, Christian, Daniel, Jesús, por todo su apoyo y aceptación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz, por la co-tutoría que llevó a cabo durante la realización de este proyecto que atañe a una de sus líneas de investigación, así como por haberme brindado toda su confianza.

Agradezco al Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán por todo su apoyo, por la donación de reactivos por permitirme trabajar en su laboratorio para desarrollar esta tesis, así como todos sus consejos tanto de trabajo en el laboratorio como de vida.

Agradezco a la Dra. María de los Angeles Cancino Rodezno por su tutoría durante la realización de los experimentos y la escritura de esta tesis. Por demostrarme que los experimentos o técnicas no son como lo dicen los libros, por enseñarme que “...peores cosas han pasado y hay que seguir adelante”, por apoyarme en cada momento y por permitirme considerarla además de mi jefa, mi amiga.

Agradezco a la Dra. Rosa Elena Mares por haberme dado su voto de confianza para realizar este trabajo y por brindarme su apoyo en la realización del mismo.

Agradezco a la Q. Noemí Hernández por todo el apoyo que me brindo a lo largo de la realización de este trabajo, así como el interés que mostro desde el inicio del mismo, y por siempre hacer tiempo, entre sus múltiples ocupaciones.

ASESOR:

Dra. María de los Angeles Cancino Rodezno

SINODALES:

Presidente: Dra. María de los Angeles Cancino Rodezno

Secretario: Dra. Norma Adriana Valdez Cruz

Sinodal: Dra. Rosa Elena Mares Alejandre

Sinodal: Q. Noemí Hernández Hernández

INDICE GENERAL

1. ABREVIATURAS	8
2. RESUMEN	9
3. INTRODUCCIÓN	11
4. LAS PRIMERAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES: OBTENCIÓN Y AVANCES BIOTECNOLÓGICOS	12
4.1 VENTAJAS DE LAS CÉLULAS DE MAMÍFERO Y CULTIVOS EN SUSPENSION	14
4.2 IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LA GLICOSILACIÓN Y SUS IMPLICACIONES EN PROTEÍNAS HUMANAS DE USO TERAPÉUTICO	16
4.3 IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LA VÍA DE SECRECIÓN DE PROTEÍNAS	18
5. EL PAPEL DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TISULAR (tPA)	
5.1 GENERALIDADES DEL SISTEMA DEL PLASMINÓGENO (FIBRINOLÍTICO)	22
5.2 CARACTERÍSTICAS DE ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TISULAR	24
5.3 GLICOSILACIÓN EN EL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TISULAR	26
6. DEMANDA MUNDIAL Y PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE PROTEÍNAS	28
7. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN CÉLULAS CHO Y ESTRATEGIAS PARA AUMENTAR LA PRODUCTIVIDAD	29
7.1 CULTIVOS BIFÁSICOS	30
7.2 TÉCNICAS ALTERNATIVAS PARA MEJORAR LA PRODUCTIVIDAD DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN LINEAS CELULARES DE MAMÍFERO	31
8. TRABAJOS PREVIOS CON LA LÍNEA CHO-TF70R	32
9. HIPÓTESIS	33
10. OBJETIVOS	34
10.1 OBJETIVO GENERAL	34
10.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
11. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	35
12. MATERIALES Y MÉTODOS	36
13. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
14. CONCLUSIONES	59
15. PERSPECTIVAS	61
16. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS	62
17. ÍNDICE DE FIGURAS	67
18. ÍNDICE DE TABLAS	67

1. ABREVIATURAS

CBP: Carbohydrate Binding Protein (proteína de unión a carbohidratos)

CHO: Chinese Hamster Ovary (Ovario de Hamster Chino)

Con A: Concanavalina A

DHFR: Dihidro Folato Reductasa

EGF: Epidermal Growth Factor (Factor de crecimiento epidermal)

FDA: Food and Drug Administration, EUA

GS: Glutamina Sintetasa

ϵ -ACA: Épsilon amino caproic acid (ácido ϵ - amino caproico)

HBsAg: antígeno de superficie del virus de la hepatitis B

hGH: human growth hormone (hormona de crecimiento)

LBS: Lysine Binding Sites (Sitios de unión a lisina)

MDS: Marcador de selección

PAI-I: Plasminogen activator inhibitor type 1

PLG: Plasminógeno

Pr: Proteína Recombinante

tPA: Tissue plasminogen activator (activador del plasminógeno tisular)

2. RESUMEN

Las proteínas glicosiladas recombinantes terapéuticas representan un enorme reto biotecnológico debido a su gran demanda mundial para el tratamiento o prevención de enfermedades humanas. La búsqueda del mejoramiento la producción de glicoproteínas terapéuticas es cada vez mayor y ha impulsado su estudio bajo distintos enfoques, los cuales permitan proponer nuevas estrategias capaces de mejorar los rendimientos de proteínas heterólogas. Una de estas estrategias es la manipulación de los parámetros de cultivo, que a su vez desencadenan las respuestas celulares y moleculares responsables de los cambios en la productividad y en la eficiencia de la producción. Recientemente se ha reportado que el cambio de temperatura -desde una temperatura óptima hacia una hipotermia moderada (llamados cultivos bifásicos por cambiar de 37 a 30°C) aumenta la producción de proteínas recombinantes en células de mamífero, como las de ovario de hámster chino (CHO). Este conocimiento fue fundamental para el desarrollo del presente proyecto y debido a que, actualmente la mayoría de las glicoproteínas heterólogas son producidas en células CHO nos dimos a la tarea de diseñar las estrategias experimentales necesarias para abordar el estudio de puntos clave de la producción de una glicoproteína heteróloga de interés médico, tales como su glicosilación y su secreción en el proceso de producción.

La proteína heteróloga modelo en este trabajo fue el Activador del plasminógeno tisular (tPA, por sus siglas en ingles). El tPA es una glicoproteína del tipo proteasa de serina de 68 kDa también conocida como plasminógeno tisular vascular o activador extrínseco, que ejerce su efecto primario en el sistema vascular. Su papel fisiopatológico tiene lugar en el remodelado de la matriz, crecimiento de cierto tipo de tumores y diseminación, la cicatrización de heridas, así como en algunas infecciones.

Aquí se aporta información nueva para la caracterización de la producción del tPA recombinante en la línea CHO-TF70R bajo condiciones de cultivo bifásico.

Particularmente se determinaron las constantes de crecimiento y viabilidad de los cultivos de la línea celular CHO-TF70R (productora de tPA heterólogo) a diferentes tiempos durante el cultivo bifásico. Se estandarizó un método *ad hoc* de purificación de

proteínas glicosiladas provenientes de la fracción secretada de la línea celular CHO-TF70R.

El tPA humano fue obtenido en la fase secretada de los cultivos de CHO-TF70R, y fue identificado mediante la técnica de Western blot y por un análisis de espectrometría de masas.

Mediante inmunodetección se encontraron diferencias entre las cantidades de tPA secretadas bajo la condición a 37°C y bajo la de cultivo bifásico, siendo esta última condición la que presentó un aumento relativo en la producción tPA en el día 7. Finalmente se identificó mediante espectrometría de masas a la proteína humana tPA heteróloga proveniente de la fracción secretada y glicosilada del cultivo de la línea celular CHO-TF70R.

3. INTRODUCCIÓN

En 1986 el activador de plasminógeno tisular (tPA, por sus siglas en ingles) con el nombre comercial de Activase® se convirtió en la primera proteína recombinante obtenida a partir de células de mamífero aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) (Collen y Lijnen, 2004). La gran mayoría de estas proteínas heterólogas (incluida tPA) son producidas en células de ovario de hámster chino (CHO) (Kaneko *et al.*, 2010). Adicionalmente, existen otras líneas celulares usadas para producción de biofármacos como las células de mieloma de ratón (NS0), de riñón de hámster bebé (BHK), de riñón embrionario humano (HEK-293) y células de retina humanas (Wurm, 2004).

En la actualidad aproximadamente un 70 % de todas las proteínas recombinantes con interés farmacéutico son producidas en células de mamífero (Wurm, 2004), la razón por la que los cultivos de dichas células sean el sistema dominante para la producción de proteínas recombinantes humanas con aplicaciones clínicas, es su capacidad de mimetizar la expresión, el plegamiento y las modificaciones postraduccionales de proteínas de *homo sapiens* (Wurm y Hacker, 2011). En comparación con otros sistemas de expresión heteróloga tales como bacterias, plantas y hongos, las líneas celulares de mamífero poseen la eficiencia y especificidad para realizar modificaciones complejas e indispensables para la actividad de algunas proteínas recombinantes tales como la glicosilación (Wurm, 2004).

Las células CHO fueron aisladas y manipuladas por en 1958 por Puck y de todas las líneas celulares de mamífero generadas hasta el día de hoy, se consideran el sistema preferido para la producción a gran escala de glicoproteínas recombinantes con uso terapéutico (Sunley y Butler, 2010). La preferencia se debe a que presentan un crecimiento rápido, tienen un bajo número de cromosomas, pueden ser transfectadas con facilidad y cuentan con la maquinaria celular para llevar a cabo modificaciones postraduccionales (Jenkins *et al.*, 1996).

Adicionalmente, las células CHO fueron diseñadas para ser deficientes en la actividad de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (Wurm y Hacker, 2011). La DHFR es una enzima monomérica, que cataliza la conversión del ácido fólico, una vitamina, a tetrahidrofolato (THF). Este último es un cofactor de transporte de una fracción de carbonos que

participan en varias reacciones biosintéticas, específicamente en la síntesis de glicina, purinas y timidina. Una célula deficiente en la actividad de la DHFR, requiere la adición de glicina, hipoxantina y timidina (GHT) en el medio para que esta sobreviva. Lo que permite implementarlo como un sistema de selección, basado en la inserción del gen de DHFR en combinación con el gen de interés. El sistema con DHFR también permite una amplificación eficiente del DNA clonado. Cuando las células son cultivadas a altas concentraciones de metotrexato (MTX), un análogo del ácido fólico que inhibe la actividad enzimática de la DHFR, las células transfectadas deben adaptarse a la disminución de la actividad de la DHFR. La sola presencia de un gen exógeno DHFR es insuficiente para vivir en estas condiciones. De hecho, las células sobrevivientes deben de haber ampliado el número de copias de DHFR para resistir a estas condiciones (Wurm y Hacker, 2011). Finalmente, las líneas celulares CHO han sido clasificada dentro del nivel de nivel de bioseguridad I, lo cual implica la ausencia de riesgo o riesgo insignificante para la salud humana y el ambiente (SAEFL, 2007).

4. LAS PRIMERAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES: OBTENCIÓN Y AVANCES BIOTECNOLÓGICOS

Las herramientas en el campo de la biología molecular nos han permitido cruzar las barreras entre especies y producir proteínas de nuestro interés en especies de nuestra selección (hospederos). Esta capacidad nos ha provisto de un gran número de proteínas recombinantes de uso terapéutico y para varias aplicaciones industriales y de diagnóstico. Las herramientas esenciales para la producción de proteínas recombinantes son el gen o la porción de cDNA que codifica para la proteína de interés, un vector de expresión y un sistema biológico (sistema de expresión u hospedero) que podrá transcribir y traducir el transgén en esa proteína de interés (Desai *et al.*, 2010). Durante un largo periodo de tiempo se ha desarrollado un gran repertorio de sistemas de expresión, *Escherichia coli* fue el pionero en sistemas de expresión en el cual la primera proteína terapéutica, la Somatostatina, fue exitosamente expresada aunque su producción no fue llevada a niveles industriales (Desai *et al.*, 2010). La insulina humana fue el primer producto recombinante que se produjo industrialmente y fue aprobado por la FDA para su uso clínico en seres humanos

(Bolívar Zapata, 2007). Posteriormente, *E. coli* fue sujeta a varios cambios como sistema de expresión para producir proteínas terapéuticas más complejas (Sorensen y Mortensen, 2005).

Otra área de gran interés para la medicina, en donde los métodos de la ingeniería genética y la biotecnología han tenido un gran impacto, es la producción de anticuerpos monoclonales (glicoproteínas) dirigidos no sólo contra agentes infecciosos, como virus y microorganismos patógenos. De igual forma, se han producido anticuerpos contra cierto tipo de tumores carcinógenos y también como sistemas de diagnóstico (Bolívar Zapata, 2007). Por lo que otros sistemas de expresión, tales como levaduras, insectos, plantas, animales transgénicos y células de mamífero (Wurm, 2004) fueron involucrados gradualmente para la producción de proteínas humanas cada vez más complejas (Desai et al 2010), ya que las glicoproteínas recombinantes requieren de ser plegadas, modificadas co y postraduccionalmente y excretadas para ser funcionales en el cuerpo humano (Bolívar Zapata, 2007).

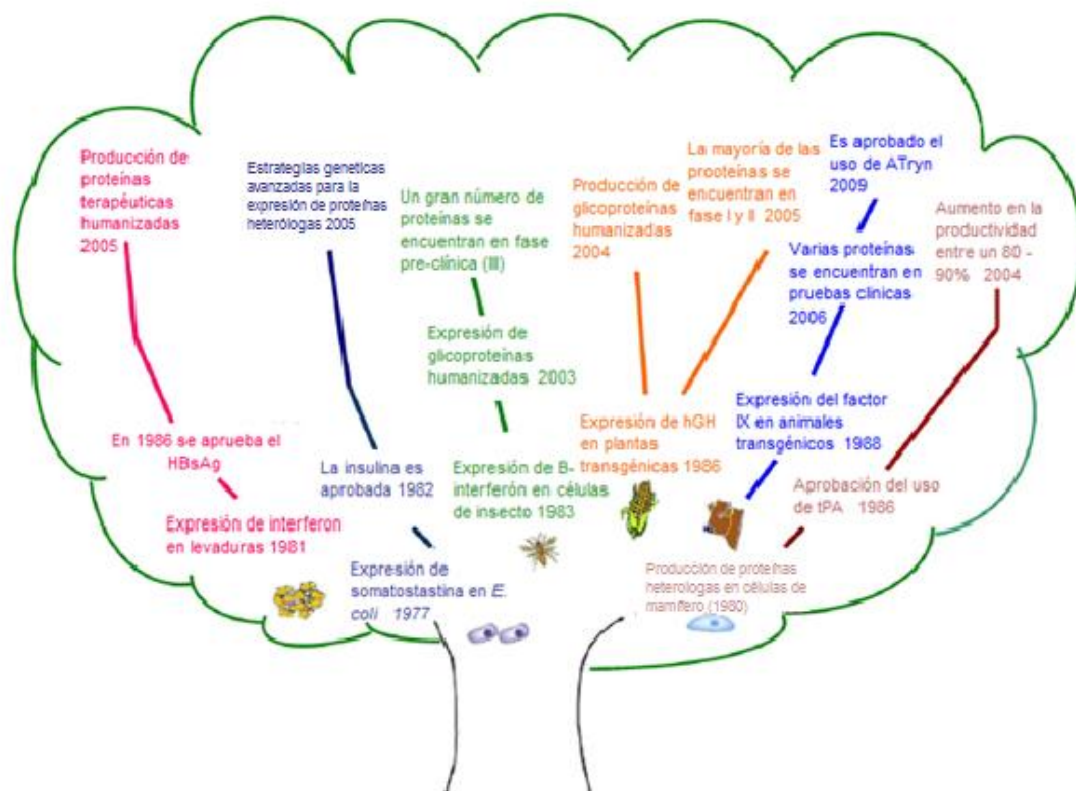


Figura 1. Imagen representativa del desarrollo de proteínas recombinantes en los diferentes sistemas de expresión; levadura, bacterias, insectos, plantas y animales transgénicos y células de mamífero. HBsAg (Antígeno de superficie de la hepatitis B), hGH (Hormona del crecimiento), ATryn (Antitrombina recombinante humana (Desai *et al.*, 2010).

4.1 VENTAJAS DE LAS CÉLULAS DE MAMÍFERO Y CULTIVOS EN SUSPENSIÓN

Las líneas celulares en cultivo son una poderosa herramienta en la investigación básica, con alcances en áreas biotecnológicas y farmacéuticas. Para que un sistema de expresión se considere útil debe de (i) ser capaz de producir la proteína correctamente plegada y funcional, incluido el procesamiento postraducciona, (ii) tener una buena productividad, (iii) ser fácil de manipular, y estabilizar, (iv) ser seguro y económico y (v) permitir un fácil aislamiento (Desai *et al.*, 2010).

Las células CHO son el modelo biológico por excelencia para la producción a gran escala de glicoproteínas recombinantes humanas de uso terapéutico (Tabla 2), sin embargo, su principal desventaja es la baja productividad obtenida en comparación con sistemas de expresión basados en células procariotas (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de los diferentes sistemas de expresión para la producción de proteínas heterólogas (Desai *et al.*, 2010).

Sistema	CP	TP	Capacidad de producción	Nivel de expresión	Glicosilación	Costo de Almacén
Bacteria	bajo	corto	alto	alto	ausente	Moderado
Hongo	mediano	mediano	alto	bajo-alto	alta MANO	Moderado
CCI	alto	mediano	Mediano	bajo-alto	alta MANO	caro
CCM	alto	largo	muy bajo	bajo-moderado	SH	caro
AT	alto	muy largo	bajo	moderado-alto	SH	caro
CCP	bajo	corto	alto	moderado-alto	DM	barato
PT	muy bajo	largo	muy alto	moderado-alto	DM	barato

CP= costo de producción, TP= tiempo de producción, CCI= cultivo celular de insecto, CCM= cultivo celular de mamífero, AT= animales transgénicos, CCP= cultivo celular de planta, PT= plantas transgénicas, MANO= manosiación

Tabla 2. Productos biológicos aprobados por la FDA producidas en células CHO (Jayapal *et al.*, 2007).

PRODUCTO	TIPO	USO TERAPÉUTICO	PRODUCTOR	AÑO DE APROBACIÓN (FDA)
Myozyme	α -glucosidasa	Cáncer colorectal metastásico	Amgen	2006
Naglazyme	N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa	Mucopolisacaridosis VI	BioMarin Pharmaceutical	2005
Advate	Factor VIII	Hemofilia A	Baxter	2003
Xolair	Anti-IgE mAb	Asma severo/moderado	Genentech	2003
Humira	Anti-TNF α mAb	Artritis Reumatoide	Abbott	2002
Aranesp	Eritropoyetina	Anemia	Amgen	2001
Campath	Anti-CD52 mAb	Leucemia linfocítica crónica	Genzyme, Bayer	2001
Herceptin	Anti-HER2 mAb	Cáncer de seno metastásico	Genentech	1998
Benefix	Factor IX	Hemofilia B	Wyeth	1997
Cerezyme	β -glucocerebrosidasa	Enfermedad de Gaucher	Genzyme	1994
Pulmozyme	Deoxiribonucleasa I	Fibrosis cística	Genentech	1993

4.2 IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LA GLICOSILACIÓN Y SUS IMPLICACIONES EN PROTEÍNAS HUMANAS DE USO TERAPÉUTICO

La glicosilación protéica - como se conoce al proceso químico en el que se adiciona un glicano a una proteína- es una de las más importantes modificaciones postransduccionales. Aproximadamente un tercio de las proteínas de interés farmacéutico son glicoproteínas (Huijuan y d'Anjou, 2009). Una glicoproteína puede tener distintas funciones biológicas, como dar estructura, ser fuente de energía, participación en la unión con carbohidratos (CBPs), entre otras. (Meynial-Salles y Combes, 1996).

Los oligosacáridos presentes en las glicoproteínas han sido clasificados dependiendo de las regiones de unión del glicano al péptido. Estos se pueden unir a la cadena peptídica de diferentes formas, siendo las tres principales:

(i) Mediante un enlace N-glucosídico a la cadena lateral de un residuo de asparagina (Asn), a condición de que esté presente la secuencia Asn-X-Ser/Thr (donde X es cualquier aminoácido a excepción de Prolina (Pro)), a esto se le conoce como N-glicosilación. Todas las uniones formadas por los glicanos unidos a proteínas tienen en común un núcleo o "core" (Jenkins *et al.*, 1996) de pentasacárido compuesto de dos residuos de N-acetilglucosamina y tres residuos de manosa ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$), este pentasacárido puede ser substituido de tres formas para generar tres tipos de N-glicoproteínas:

- a) Alta manosa o del tipo oligomanosídico: los extremos sólo contienen residuos de manosa.
- b) Complejos o del tipo lactosaminídico: el núcleo principal es sustituido por una manosa y varias unidades de ácido N-acetil-lactosaminídico. Estas cadenas pueden a su vez clasificarse de acuerdo a su patrón de ramificación en: biantenaria, triantenaria o tetrantenaria.
- c) Híbridos: Las cadenas de oligosacáridos de este tipo tienen características de las dos anteriores (alta manosa y complejos) (Figura 2)

(ii) A través de un enlace O-glicosídico a la cadena lateral de Ser o Thr, ésto es la O-glicosilación, esta glicosilación es muy amplia en proteínas del tipo estructural como los proteoglicanos.

(iii) Por medio de los carbohidratos cuya participación sea como ancla del glicofosfatidilinositol, usado para retener algunas proteínas a la membrana celular. (Meynial-Salles y Combes, 1996).

Mientras que la función biológica de muchas proteínas terapéuticas son principalmente definidas por los aminoácidos que lo componen, los carbohidratos que conforman a las glicoproteínas de uso terapéutico son determinantes de algunas propiedades farmacológicas incluyendo estabilidad, solubilidad, biodisponibilidad, actividad *in vivo* farmacocinética e inmunogenicidad (Hujian y d' Anjou, 2009).

Adicionalmente, los glicanos juegan un papel muy importante en el mantenimiento de las glicoproteínas, así mismo proveen protección contra la degradación por proteólisis y mejoran la solubilidad en el medio e inhiben la agregación de proteínas. Todos los factores descritos, son tomados en cuenta en el desarrollo y optimización de glicoproteínas de uso terapéutico con la finalidad de proporcionar tratamientos más eficaces (Huijuan y d' Anjou, 2009).

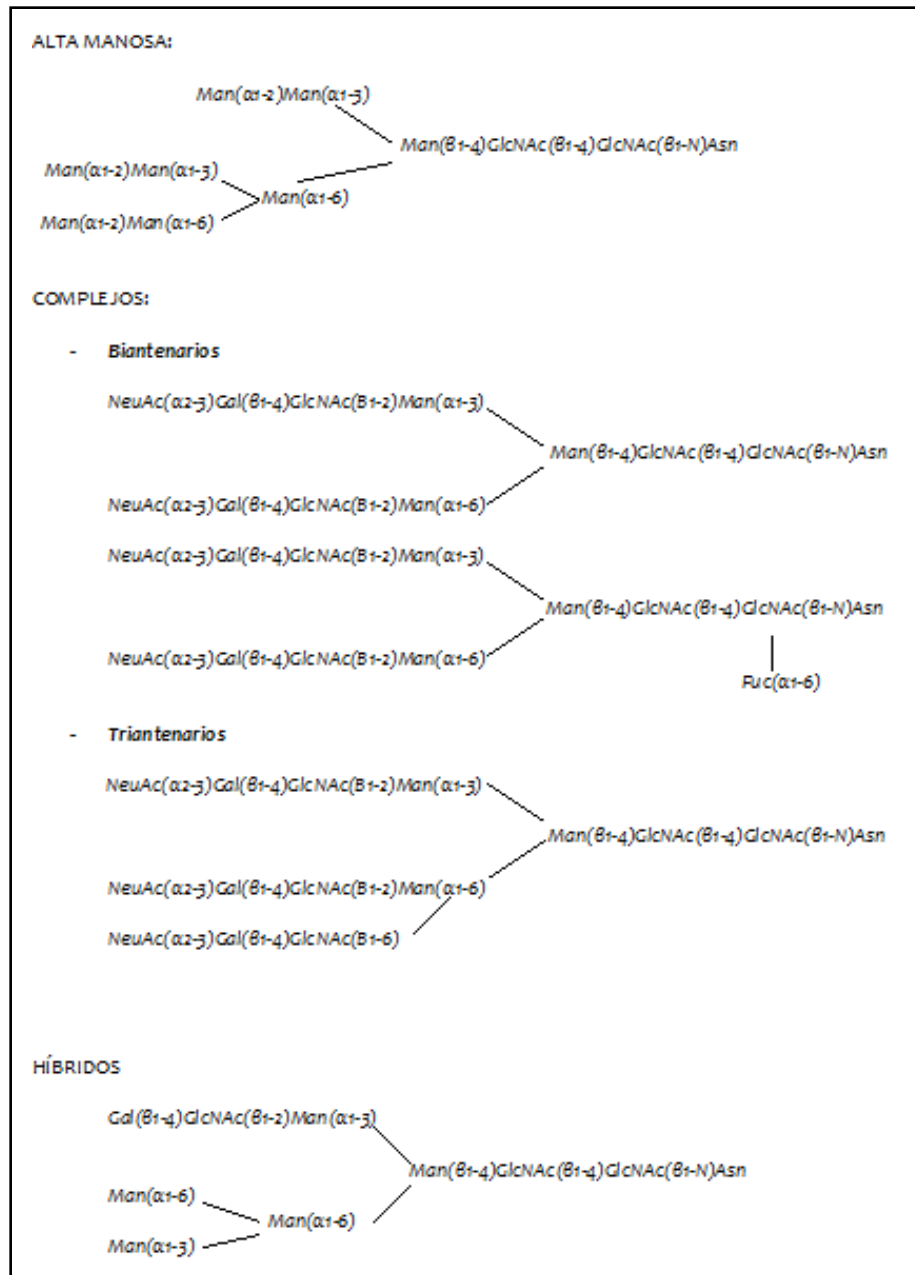


Fig. 2 Tipos de N- glicosilación (Meynial-Salles y Combes, 1996).

4.3 IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LA VÍA DE SECRECIÓN DE PROTEÍNAS

Todas las proteínas producidas en la célula eucariota (excepto las sintetizadas a través de los ribosomas mitocondriales y cloroplásticos) inician sus síntesis en

ribosomas citosólicos. Existen distintos destinos celulares para los diferentes tipos de proteínas sintetizadas en los ribosomas citosólicos de las células eucariotas, dependiendo de la ausencia o presencia de diferentes señales dentro de la secuencia proteica que determinará su destino final. Por ejemplo algunas secuencias señal, dirigen a las proteínas hacia la vía secretora y exocitosis, enviándola inicialmente hacia las membranas del Retículo Endoplasmático (RE), para su sucesivo transporte hacia el aparato de Golgi, y que posteriormente se puede enviar hacia diferentes orgánulos de destino o ser secretada al exterior celular. (Lodish *et al.*, 2004)

El RE rugoso (RER) es el sitio de la síntesis y maduración de las proteínas que entran en la vía secretora. Las proteínas sintetizadas por esa vía en el RER son glicoproteínas integrales de membrana, proteínas destinadas a la secreción extracelular y las enzimas lisosomales.

Las proteínas sintetizadas en el RER tienen normalmente en su extremo amino terminal (NH₂) una secuencia de aproximadamente treinta aminoácidos cuyos radicales son predominantemente hidrófobos, que recibe el nombre de “péptido señal” que se une a una partícula de reconocimiento de la señal, SRP (acrónimo de "Signal Recognition Particle" en inglés). La síntesis de estas proteínas comienza en los ribosomas libres en el citosol, la interacción entre la secuencia señal y la partícula SRP para temporalmente la traducción de la proteína por el ribosoma. El complejo se acopla entonces con sitios de anclaje de la membrana del RE (al receptor de la SRP), la partícula SRP se separa, y la traducción se reanuda y la proteína en nacimiento va atravesando un poro transmembrana llamado "translocón" (un canal construido de proteínas) en la membrana del RE (Alberts *et al.*, 1994)

Las proteínas solubles que no van a estar embebidas en la membrana pierden su secuencia señal al ser escindida de la cadena polipéptica por una enzima llamada “peptidasa señal” ubicada en la cara luminal de las cisternas del RER, por lo que la proteína se transfiere por completo al lumen del RER. Si las proteínas solubles no son residentes del RER (e.g. proteínas lisosomales o de secreción), entonces siguen su ruta dentro de la vía secretora (Lodish *et al.*, 2004).

En la vía secretora, las proteínas (generalmente glicoproteínas) destinadas a ser secretadas al espacio extracelular o insertadas en la membrana plasmática se

embarcan en un viaje intracelular controlado a través de diferentes compartimentos del sistema de endomembranas. Las glicoproteínas son enviadas en vesículas revestidas de transporte a la cara cis del aparato de Golgi, pasan por los distintos compartimentos (cis, medial y trans) del aparato Golgi en vesículas, o por maduración de las cisternas del Golgi) donde serán modificadas (principalmente los oligosacáridos que portan) y son empaquetadas en vesículas de secreción producidas por gemación controlada en la red trans del Golgi (TGN, acrónimo de Trans Golgi Network, en inglés). Las glicoproteínas finalmente serán llevadas hasta la membrana plasmática donde la membranas de la vesículas se fusionarán finalmente con la membrana plasmática para liberar por exocitosis al espacio extracelular los contenidos en las mismas (Figura 3). La exocitosis representa la culminación de la vía secretora de la célula eucariota. Además, durante el proceso de fusión las bicapa lipídicas de las vesículas secretorias se integran en la membrana plasmática aumentando la superficie de esta última (Lodish et al., 2004).

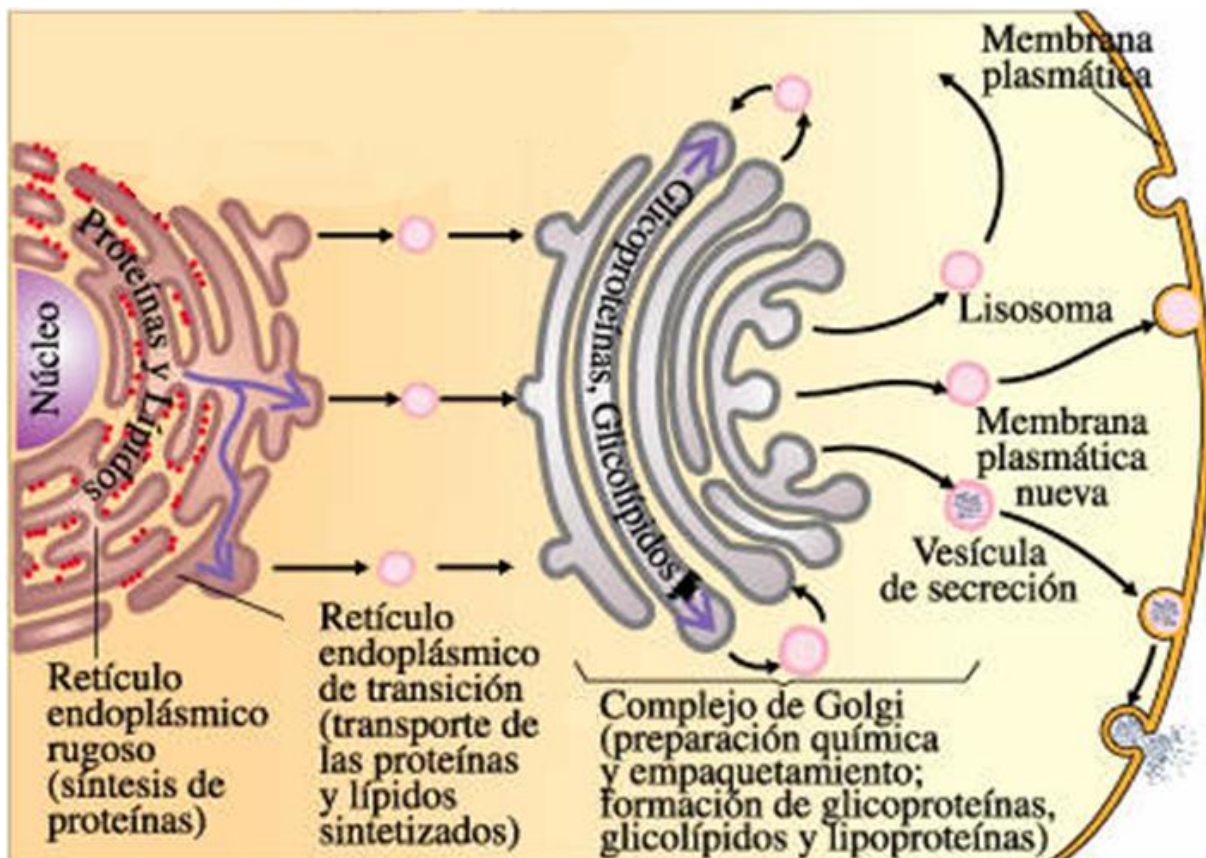


Figura 3. Vía de secreción de proteínas. Imagen que esquematiza la forma en la que una proteína es ensamblada (RER), y la ruta que sigue, en la que esta sale del retículo endoplásmico, donde es transportada al aparato de Golgi, para posteriormente ser secretada.

La actividad proteolítica de las proteínas secretadas por las células es un elemento indispensable para la proliferación y migración y modelaje celular. Esta actividad está dada por una batería de enzimas y zimógenos secretados por la célula hacia el espacio extracelular. Las colagenasas, metaloproteasas, elastasas y otras enzimas degradativas conforman el amplio mundo de proteasas que se encargan de degradar la matriz extracelular. En condiciones normales la actividad proteolítica es modulada por el entorno celular e inclusive por la propia matriz extracelular. Por ejemplo, La plasmina es una importante enzima degradativa que es secretada por la célula como zimógeno, denominado plasminógeno. El plasminógeno queda retenido en la matriz extracelular no teniendo actividad proteolítica sobre ella. La molécula que convierte al plasminógeno en plasmina se denomina Activador de Plasminógeno y es secretada por la célula en respuesta a ciertos estímulos. Existen dos tipos de activadores de

plasminógeno el uPA (urokinase plasminogen activator) que se describió originalmente en la orina, de donde proviene su nombre y el tPA (tissue plasminogen activator). Estos convierten al plasminógeno en plasmina que a su vez actúa sobre la fibronectina, la laminina y colagenasas latentes que resultan así son activadas (Alberts *et al.*, 1994)

5. EL PAPEL DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TISULAR

5.1 GENERALIDADES DEL SISTEMA DEL PLASMINÓGENO (FIBRINOLÍTICO)

El sistema del plasminógeno (fibrinolítico) comprende una pro-enzima inactiva, el plasminógeno, que puede ser convertida a la enzima activa, la plasmina. La plasmina degrada a la fibrina y activa a las metaloproteinasas de matriz (MMPs, por sus siglas en inglés), que una vez activas, degradan la matriz extracelular. Hasta la fecha han sido identificados dos activadores fisiológicos del plasminógeno: activador del plasminógeno tisular (tPA) y el plasminógeno activado por uroquinasa (uPA). La inhibición del sistema MMP/ plasminógeno, es mediada por el activador del plasminógeno, mediante inhibidores específicos de cada uno, al nivel de la plasmina, principalmente por la $\alpha 2$ -antiplasmina (PAI), o a nivel de los MMP, por los inhibidores de los MMP (MMPI). La doble función del sistema del plasminógeno está bien establecida. La vía mediada por el tPA está involucrada principalmente en la homeostasis de la fibrina, y la vía mediada por el uPA esta principalmente involucrado en fenómenos como la migración celular y remodelación tisular. En consecuencia, el término “sistema fibrinolítico” se ha convertido en insuficiente y, para ello, se sustituyen por “sistema del plasminógeno”. Hasta este momento la mayoría de los componentes que conforman este sistema, con excepción de los PAI, se han identificado y caracterizado bioquímicamente en la terapia trombolítica (Collen, 1999).

El papel fisiopatológico del sistema del plasminógeno se deduce de las correlaciones entre los niveles de sus componentes y los estados clínicos de ciertas patologías, en las que se determina su papel en la biología vascular, el remodelado de la matriz, crecimiento de cierto tipo de tumores y diseminación, la cicatrización de heridas, así como su participación en algunas infecciones, por tanto, las aplicaciones terapéuticas del sistema del plasminógeno son diversas (Collen, 1999).

Dos peculiaridades bioquímicas son comunes en el mecanismo activador de las enzimas de la coagulación y de la fibrinólisis: (i) Las reacciones se inician y propagan en una superficie epitelial (endotelio), (ii) las reacciones se organizan en un sistema que se amplifica enzimáticamente (cascada). La secuencia de eventos enzimáticos que conducen a disolver un coágulo es el resultado de un equilibrio dinámico entre grupos diferentes de proteínas. Algunas actúan como generadores de plasmina (plasminógeno, activadores, fibrina), otras como inhibidores de la fibrinólisis ($\alpha 2$ antiplasmina, PAI I) (De la Peña Díaz y Anglés-Cano, 2008).

Las proteasas fibrinolíticas generalmente existen en forma de zimógenos, una molécula de cadena simple que es activada cuando se corta un enlace peptídico. Todas las proteasas de serina activas se cortan en un enlace arginina y/o lisina. En el caso de las proteasas fibrinolíticas, los productos resultan en moléculas de doble cadena unidos por uno o más puentes disulfuro. La estructura típica de este tipo de proteasas es que en su amino terminal contienen varios dominios (cadena A) y en el carboxilo terminal es donde se encuentra el dominio proteasa de serina (cadena B) (Booth y Bachmann, 2006).

La plasmina es una enzima fibrinolítica protagonista; es una proteasa de serina parecida a tripsina que degrada a la fibrina y es generada por la activación de su zimógeno, el plasminógeno. Es una molécula bicatenaria compuesta por una cadena pesada derivada de la porción amino terminal, que contiene 560 aminoácidos y 5 dominios anillados o “kringles”. El dominio Kringle es un dominio de proteínas plegadas a manera de grandes bucles estabilizados por tres enlaces disulfuro. Estos dominios son importantes en las interacciones proteína-proteína en co-factores de coagulación de la sangre, en donde se localizan los lugares de unión a lisina (lysine binding sites; (LBS) por sus siglas en inglés), y una cadena ligera derivada de la posición carboxilo terminal compuesta por 241 aminoácidos, que contiene el centro activo formado por los aminoácidos serina (Ser), histidina (His) y ácido aspártico (Asp). El nombre proviene del pastel escandinavo “kringle”, debido a su forma similar. (De la Peña Díaz y Anglés-Cano, 2008).

El plasminógeno humano (PLG) es el zimógeno de la proteasa plasmina. Es una glicoproteína monocatenaria de 92 kDa formada por 791 aminoácidos y un 2% aproximado de carbohidratos. En un adulto la concentración en plasma de PLG es aproximadamente de 200 mg/L. El tiempo de vida media del PLG nativo, que posee un ácido glutámico (Glu) en su amino terminal (Glu-PLG) es aproximadamente de 2.2 días, y el PLG degradado (Lys-PLG) tiene un tiempo de vida media más corto de 0.8 días. El principal sitio de producción de PLG es en el hígado, pero el PLG está presente en el espacio extravascular de varios tejidos como en el riñón y la cornea así como en algunas células sanguíneas como los eosinófilos que también son capaces de sintetizarlo. Su cadena A está formada por 5 regiones “Kringles”, cada uno formado aproximadamente por 78 – 80 aminoácidos. Funcionalmente estas regiones “kringles” le dan a PLG la habilidad para unirse a residuos de lisina expuestas de la fibrina, α 2-antiplasmina, colágeno, tetranectina y receptores celulares. El dominio catalítico (cadena B) está conformado por 230 residuos de aminoácidos y tiene homología con la familia de la tripsina. La activación de plasminógeno a plasmina se lleva a cabo mediante un corte en Arg 561- Val 562 (Booth & Bachmann, 2006).

5.2 CARACTERÍSTICAS DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TISULAR

El activador de plasminógeno tisular (tPA) es una glicoproteína del tipo proteasa de serina de 68 kDa también conocida como plasminógeno tisular vascular o activador extrínseco, conformada por 527 aminoácidos. Ejerce su efecto primario en el sistema vascular porque es producido y secretado por la células endoteliales. En plasma la concentración de tPA es aproximadamente de 5 μ g/L. La mayoría del tPA se encuentra acompañado con su inhibidor primario, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1, por sus siglas en inglés) (Booth y Bachman, 2006).

La estructura del tPA (Figura 4) muestra un dominio “finger”, así como un dominio EGF (por sus siglas en inglés, factor de crecimiento epidermal), dos dominios Kringles en la cadena A, mientras que en la cadena B se encuentra el dominio proteasa de serina. El dominio finger se extiende desde los residuos 6-43. Este dominio está involucrado en la unión del tPA a la fibrina. La unión de este dominio a la fibrina es independiente a los

LBS presentes en las regiones “kringle”. El dominio EGF (residuos 44-92) se cree que tiene afinidad sobre receptores de manosa y está involucrado en la depuración del tPA. El kringle 2 tiene afinidad por lisina, mientras que ninguna función ha sido descrita para el kringle 1. La estructura cristalina del dominio kringle 2 del tPA tiene homología con el dominio Kringle 4 del PLG. El dominio catalítico del tPA es típico al de otras proteasas de serina, con la triada catalítica His 322, Asp 371 and Ser 478. El sitio activo se reduce gracias a la formación de cuatro bucles de superficie. El bucle que se forma alrededor de Arg 299 expone cinco residuos adicionales, Arg298-Arg-Ser-Pro-Gly 302, que se exponen fuera de la superficie molecular, en una forma similar a un β -hairpin y es de fundamental importancia para la interacción con PAI-1 (Booth y Bachmann, 2006).

El tPA es secretado como una molécula monocatenaria (sctPA, simple chain tPA) pero puede ser fácilmente convertido a una forma bicatenaria (tctPA, two chain tPA) por la plasmina, quien realiza un corte en el enlace peptídico en Arg275-Ile276. Sorprendentemente la sctPA no es un zimógeno en la presencia de fibrina, pero su actividad proteolítica es cercana al del sctPA. El tPA es un activador ineficiente del PLG en la ausencia de fibrina, pero en su presencia la activación del plasminógeno es potenciado. (Collen y Lijnen, 2004).



Figura 4. Estructura terciaria del activador del plasminógeno tisular (tPA). P00750 (www.pdb.org).

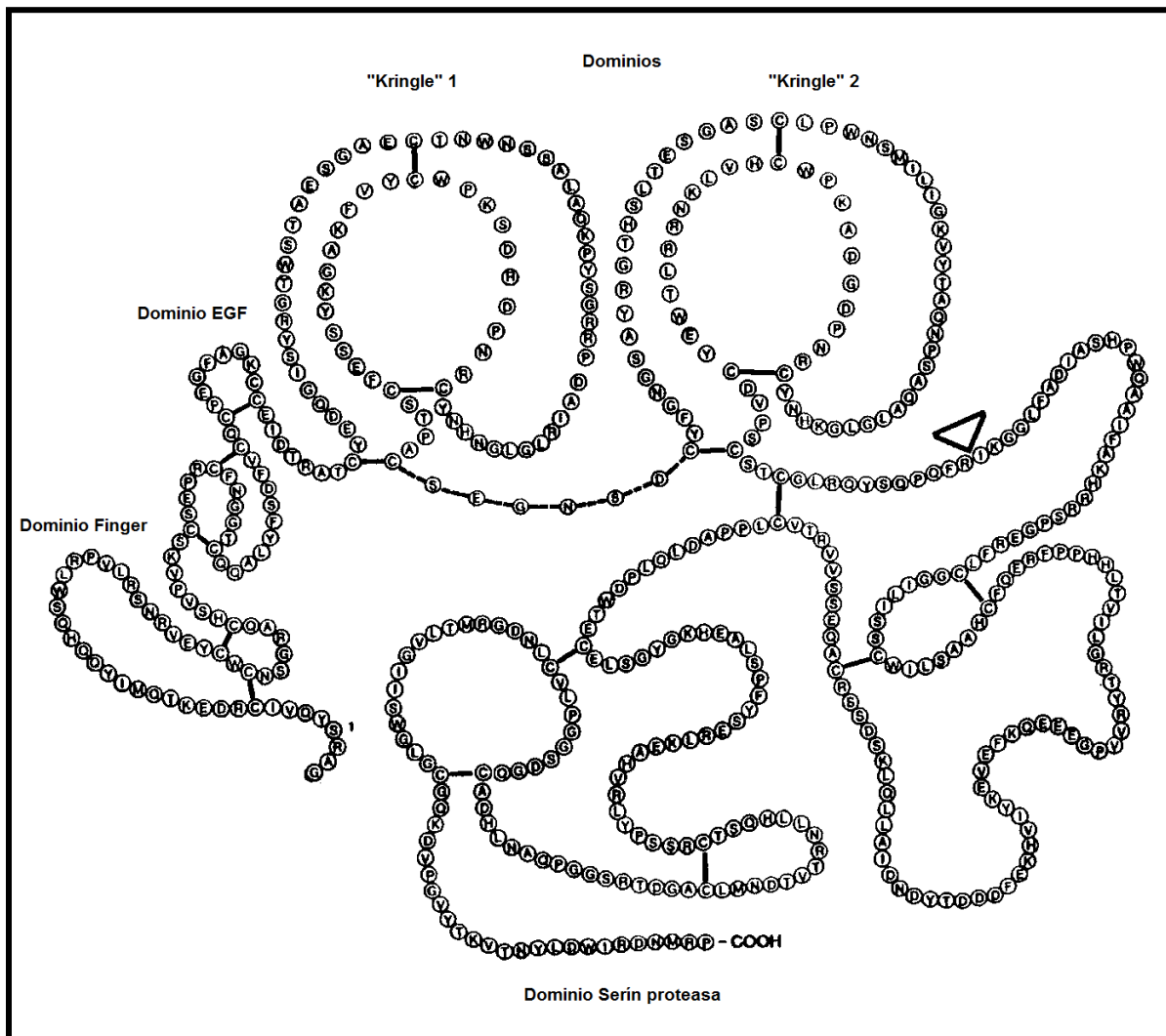


Figura 5. Representación esquemática de la estructura primaria del activador de plasminógeno tisular, donde se muestran los cinco dominios. La flecha indica el sitio de corte, donde el activador de plasminógeno tisular se convierte en tPA de cadena sencilla a doble cadena. (Collen y Lijnen, 2009).

5.3 GLICOSILACIÓN EN EL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TISULAR

El tPA posee 4 sitios de posible N-glicosilación (Asn-117, Asn-184, Asn-218 y Asn-448) de los cuales solo el de Asn-184 es de ocupación variable y el sitio Asn-218 no puede ser ocupado por que presenta una secuencia Asn-Pro-Ser donde la prolina interfiere con los procesos de N-glicosilación de los residuos de Asn por la rotación de

la misma. De esta forma el tPA se produce, como una mezcla de dos glicoproteínas: tPA del tipo I (tPA- I), el cual posee los tres posibles sitios de glicosilación ocupados (Asn-117, Asn-184 y Asn-448) y el tPA del tipo II (tPA-II), el solo posee dos sitios posibles de glicosilación (Asn-117 y Asn- 448), lo anterior se ha observado tanto en sistema nativos como recombinantes (Andersen *et al.*, 2000). El residuo Asn-1117 es predominantemente N-glicosilado con estructuras del tipo alta manosa (oligomanosilación), mientras que los residuos Asn-184 y Asn-448 son asociados predominantemente a estructuras del tipo complejo, esto se ha observado que es conservado tanto en tPA recombinantes, en sistema de células de mamífero (CHO) como el tPA nativo (Spellman *et al.*, 1989). Asimismo, se ha determinado que la glicosilación del Asn-184 no interfiere con el procesamiento de glicanos en los demás sitios de ocupación. Por otra parte, en el tPA-I se observo la presencia de glicanos en Asn-184, el cual restringe el acceso de algunas enzimas de glicosilación al sitio Asn-448 (Rudd *et al.*, 1995).

La glicosilación sobre el residuo Asn-184 tiene influencia sobre las propiedades biológicas del tPA (Mori *et al.*, 1995) ya que la actividad específica fibrinolítica del tPA-II ha mostrado ser alrededor del 50% mayor que la actividad mostrada del tPA-I (Spellman *et al.*, 1989). Así como una mayor afinidad por la lisina y fibrina por lo tanto una mayor actividad fibrinolítica (Mori *et al.*, 1995). Lo cual sugiere la presencia de un glicano en Asn-148 que interfiere con la unión del tPA con la lisina del plasminógeno (Rudd *et al.*, 1995). Otro parámetro que es alterado por la composición de carbohidratos del tPA es la tasa de depuración en el torrente sanguíneo, ya que estudios recientes han demostrado que al bloquear los receptores de manosa con ovoalbúmina, tanto de los hepatocitos como las células de Kupffer, el tPA no es endocitado. Sugiriendo, que los receptores de manosa en estas células son los principales receptores afines del tPA para su depuración. Además de que estos estudios demuestran que el tPA posee mayor afinidad a estos tipos de receptores que otro tipo de glicoproteínas. (Otter *et al.*, 1991)

6. DEMANDA MUNDIAL Y PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Las proteínas recombinantes con fines terapéuticos representan uno de los principales impulsores de crecimiento económico en la industria biofarmacéutica por seguridad en su uso, así como un beneficio clínico eficaz. Sin embargo, mientras las proteínas recombinantes con uso terapéutico han revolucionado el tratamiento a muchas necesidades médicas; una baja actividad, una rápida depuración y la inmunogenicidad siguen siendo desafíos para el desarrollo de proteínas en la industria biofarmacéutica (Huijuan y d'Anjou, 2009).

Las células que sobreviven son transferidas como células únicas a un segundo cultivo, así estas células son cultivadas bajo condiciones específicas para obtener poblaciones clonales, es decir, una población que se origina de una misma célula y que las células hijas contienen la misma información que la generación anterior. La población clonal que presente un crecimiento apropiado y una alta productividad son tomadas para la producción de las proteínas recombinantes. El proceso de cultivo es entonces establecido de acuerdo a todos los requerimientos necesarios (pH, nutrientes, O₂, etc.). Todas las proteínas recombinantes son naturalmente secretadas al medio, donde se realizan los estudios requeridos para determinar su calidad, así como la cantidad que es secretada (Wurm, 2004).

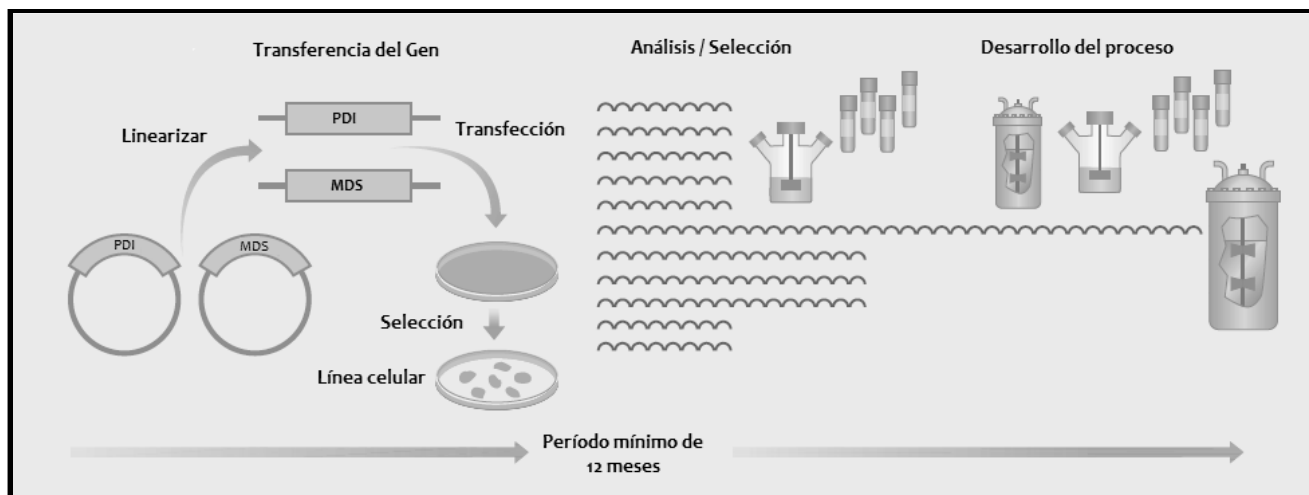


Figura 6. Generación de líneas celulares y desarrollo del proceso de cultivo para la generación de proteínas de interés (PDI). Los vectores con las secuencias de interés se linearizan (el gen que codifica para la PDI junto con el MD), posteriormente son transfectadas de manera simultánea en la línea celular elegida, las células transfectadas poseerán ventajas selectivas y a partir de una célula transfectada se obtiene una clona. Finalmente esta clona puede cultivarse bajo las condiciones experimentales requeridas para la obtención de la proteína recombinante a pequeña, mediana o gran escala. MDS = marcador de selección (Wurm, 2004).

7. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN CÉLULAS CHO Y ESTRATEGIAS PARA AUMENTAR LA PRODUCTIVIDAD

Las células CHO son las células huésped de más amplio uso en el mercado para la producción de proteínas de uso terapéutico. En un esfuerzo para incrementar la productividad de las proteínas recombinantes en células CHO, los efectos de varios parámetros ambientales tales como el pH, O₂ y la osmolaridad en los medios para la producción de proteínas recombinantes han sido ampliamente investigados (Yoon *et al*, 2003). Los primeros experimentos en los que se involucra el cambio de temperatura en cultivos *in vitro* de células de mamífero fueron reportados hace ya más de 40 años (Wurm, 2004). Sin embargo estudios más concluyentes han sido publicados recientemente. Dichos estudios demuestran que las temperaturas sub-fisiológicas pueden aumentar la productividad de proteínas recombinantes en cultivos sumergidos (Al-Fageeh *et al.*, 2006).

7.1 CULTIVOS BIFÁSICOS

Entre las diversas técnicas implementadas en cultivos de células de mamífero para aumentar las productividades se destaca la exposición de éstos a temperaturas sub-óptimas de crecimiento. (Al-Fageeh *et al.*, 2006). La temperatura es uno de los parámetros ambientales clave que influyen en el crecimiento celular y la producción de la proteína recombinante en células CHO. Las células de mamífero incluyendo a las células CHO, se cultivan a 37°C para estimular su crecimiento. Es sabido que la disminución de la temperatura por debajo de los 37°C (entre 28 – 34°C), es un método para mejorar el rendimiento del cultivo (Figura 6). En un cultivo celular a baja temperatura, disminuye su tasa de crecimiento específico, pero mejora la viabilidad celular. Por otra parte con la disminución de la temperatura de los cultivos también se puede observar una reducción en el consumo de glucosa y/o glutamina, reducción en la producción de lactato y formación de amonio. En general se ha observado la disminución en la eliminación de sustancias de desecho, y una disminución en la actividad proteolítica, así como también puede aumentar la productividad específica (Yoon *et al.*, 2003). Sin embargo estos efectos no pueden generalizarse respecto a la productividad específica, debido a que no en todos los casos en los que se disminuye la temperatura con lleva a un aumento en la productividad específica.

Por ejemplo Kaufmann y colaboradores (1999) reportaron un aumento en la productividad en la expresión de fosfatasa alcalina secretada (SEAP, por sus siglas en inglés) en células CHO de 1.7 veces en los cultivos crecidos a una temperatura de 30°C en comparación con los cultivos a 37°C. Por otra parte Yoon y colaboradores (2003) reportaron que con la reducción de temperatura en los cultivos celulares con células CHO modificadas mediante ingeniería para expresar Eritropoyetina (EPO) y activador del plasminógeno tisular (tPA) aumenta la productividad específica. Sin embargo, la disminución de la temperatura sobre células que expresaban trombopoyetina o anticuerpos humanizados, reducen o no afectan la productividad específica, respectivamente (Wurm y Hacker, 2011; Wurm, 2004). Por lo que, el efecto benéfico de la disminución de la temperatura es variable dependiendo de la línea celular y del sistema de expresión que se utilice.

La implementación de cultivos bifásicos es una estrategia para alcanzar altas concentraciones celulares en etapas tempranas de los cultivos y mantenerlas mediante la disminución de la temperatura, lo cual en algunos casos mejora la productividad específica y también mejorar las productividades volumétricas.

Esta estrategia de cultivo combina los beneficios tanto de trabajar a temperaturas óptimas de crecimiento (alta concentración celular) como a temperaturas óptimas de producción (aumento de la productividad específica) disminuyendo las desventajas de cada una. (Al-Fageeh *et al.*, 2006).

7.2 TÉCNICAS ALTERNATIVAS PARA MEJORAR LA PRODUCTIVIDAD DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN LÍNEAS DE CELULARES DE MAMÍFERO

En 2002 Yang y Butler; en una línea celular de CHO productora de EPO describieron que a una concentración mayor a 30 nM de amonio, las estructuras de los glicanos tetrasializados y tetraantenarios presentaban 73% y un 57% de disminución en la proporción de estas estructuras respectivamente. En 2005, Rodríguez y colaboradores reportaron estudios sobre la producción de interferón- β monomérico en células CHO manipulando las condiciones del cultivo, en el que se agregaron en experimentos diferentes, butirato de sodio (NaBu), dimetil sulfóxido (DMSO) y glicerol, en los que demostraron que tanto el uso de NaBu y de DMSO aumentan la productividad específica. Sin embargo, generan un decremento en la velocidad de crecimiento lo que resulta en una reducción del interferón producido (Yang y Butler, 2002). De igual forma el glicerol provocó una reducción de velocidad de crecimiento y se observó que a medida que pasa el tiempo, disminuye la cantidad de sialicaciones. Con la combinación de diferentes estrategias se ha aumentado la productividad de IgG en células CHO, tal y como reportaron Kantardjieff y colaboradores (2010). Ellos incrementaron la síntesis de IgG al doble con respecto al control, empleando la técnica del cultivo bifásico (de 37⁰ C a 33⁰ C) mas la adición de butirato de sodio al medio.

8. TRABAJOS PREVIOS CON LA LÍNEA CHO-TF70R

En 2009 se determinó que la producción de la proteína recombinante en el sistema elegido responde favorablemente a la hipotermia y se describió que el mejor tiempo para iniciar el cultivo bifásico (cambio de temperatura) es a las 48 horas. Pues en este tiempo se observó una mayor productividad específica de tPA de 1.44 veces al cultivo control (37°C), en el que además presenta la mayor productividad volumétrica 1.55 veces mayor respecto al cultivo control (Barrón, 2009).

Sin embargo, este trabajo no se estudió si el tPA encontrado se encontraba glicosilado que es de enorme relevancia para la correcta producción de tPA humano heterólogo.

Tabla 3. Efecto del tiempo de cambio de temperatura en el desempeño de cultivos bifásicos de la línea celular CHO-TF70R (Barrón, 2009).

Cultivo	μ	tPA max (mg/L)	qtPA (pg/cel-d)	Productividad volumétrica (mg/L-h)
Control 37°C	0.37	4.17	2.49	0.034
24 h	0.074	13.9	1.99	0.036
48 h	0.156	11.4	1.44	0.053
72 h	0.151	10.3	1.52	0.047
96 h	0.074	7.7	0.36	0.036
120 h	0.098	6.6	0.12	0.039

9. HIPÓTESIS

La proteína recombinante tPA humana se sobre expresa, se glicosila y se secreta bajo condiciones de cultivo de hipotermia moderada (cultivo bifásico) en la línea celular CHO-TF70R.

10. OBJETIVOS

10.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar si la proteína recombinante tPA humana se glicosila y se secreta durante la sobreexpresión inducida por condiciones de hipotermia moderada (cultivo bifásico) en la línea celular CHO-TF70R.

10.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las constantes de velocidad de crecimiento y viabilidad de los cultivos de la línea celular CHO-TF70R a diferentes tiempos y bajo temperatura óptima (37 °C) y en hipotermia moderada (30°C) en el medio de cultivo CD-OptiCHO de GIBCO.
- Evaluar el consumo de glucosa de los cultivos de CHO-TF70R.
- Aislar y determinar los perfiles de proteína citosólica y secretada de los cultivos sumergidos de la línea celular CHO-TF70R.
- Purificación de proteínas glicosiladas provenientes de la fracción secretada de la línea CHO-TF70R.
- Determinar mediante inmunodetección si el tPA se encuentra en la fracción glicosilada y secretada del cultivo sumergido de línea celular CHO-TF70R.
- Analizar la concentración relativa de tPA en las fracciones del secretoma glicosilado correspondientes a distintos puntos de la cinética del cultivo bifásico de la línea CHO-TF70R.
- Identificar mediante espectrometría de masas el tPA humano a partir de la fracción glicosilada y secretada del cultivo sumergido de línea CHO-TF70R.

11. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

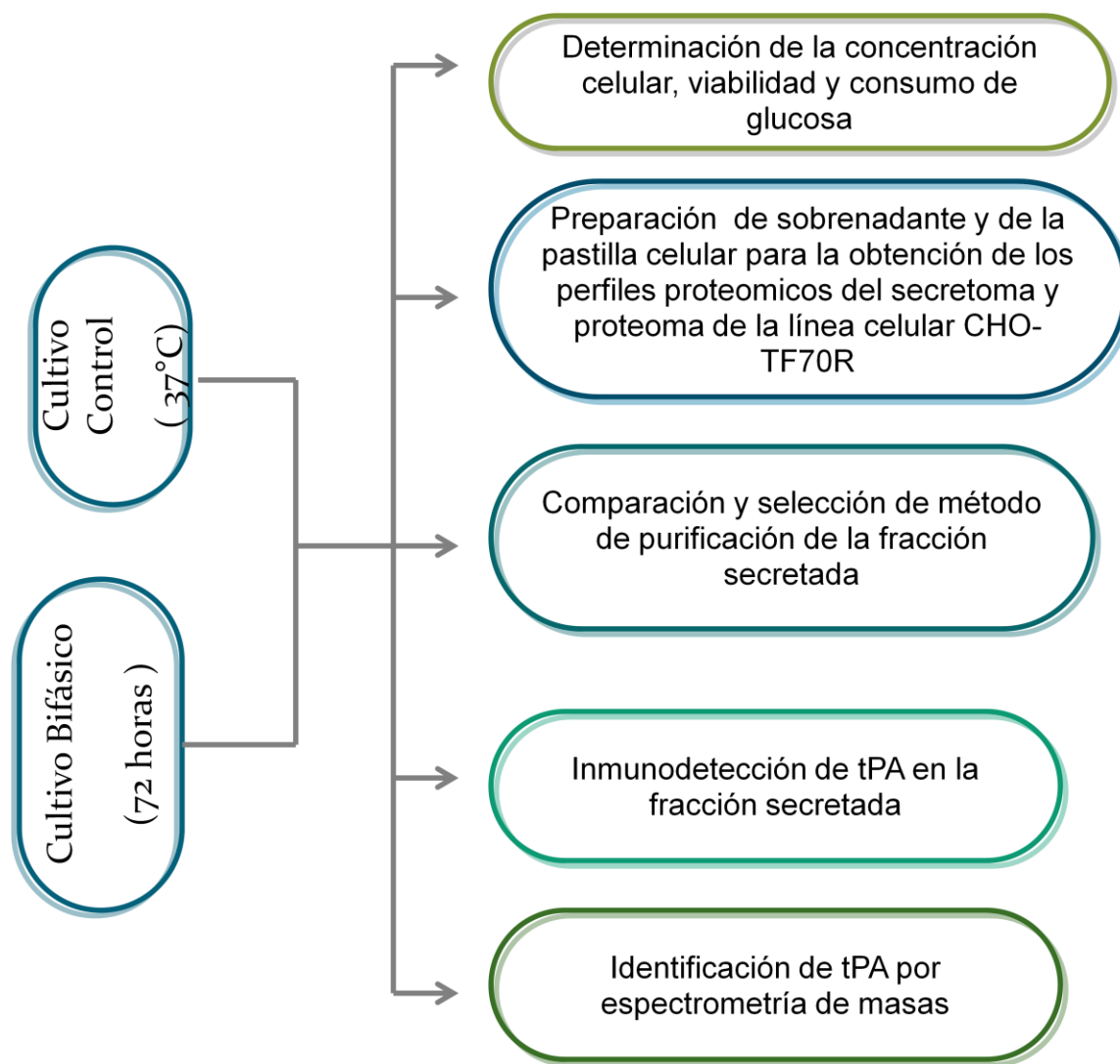


Figura 7. Estrategia experimenta empleada para el análisis de la producción, secreción glicosilación e identidad del tPA recombinante obtenido del cultivo bifásico de la línea CHO-TF70R .

12. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

La línea celular CHO-TF70R fue establecida por medio de la cotransfección de los genes de tPA y DHFR a una línea celular CHO-DHFR⁽⁻⁾. Los genes están dirigidos por el sistema promotor/ potenciador de SV40 (Virus del Simio 40). El medio de cultivo libre de suero y químicamente definido utilizado para esta línea celular fue CD-OptiCHO GIBCO® suplementado con glutamina 6 mM, Insulina 2 µg/mL, penicilina 100 U/ mL, estreptomycin 0.01 mg/mL, Pluronic F-68 Sigma® 0.001 g/L, Metrotexato 200 nM y 4% extracto de levadura. Los cultivos fueron establecidos en frascos agitados (spinners) de 250 mL con un volumen de trabajo de 100 mL, en una incubadora de atmósfera controlada a 95% de humedad, 5% CO₂ y una velocidad de agitación de 60 rpm. La concentración inicial promedio fue de 5 x10⁵ células viables/ mL con una viabilidad superior al 86%. Las temperaturas utilizadas en este estudio fueron 37 y 30°C. Los cultivos bifásicos, se realizaron con cambios de temperatura directo, de 37 a 30°C.

Determinación de metabolitos, concentración y viabilidad celular

La cuantificación celular y medición de viabilidad fue llevada a cabo mediante el conteo directo en la cámara de Neubauer mediante la técnica de exclusión con azul de tripano (Sandford, 1951; Hidalgo Morales, 2009). La glucosa fue determinada con el equipo Accu-Check ® Active de Roche™. Se tomó un mL/día/spinner para la determinación del consumo de glucosa. Estas muestras fueron conservadas a -20°C, hasta su cuantificación, en el que se usaron tiras de Accu-Check ® Active de Roche®, así como su respectivo equipo según recomendaciones del fabricante.

Cinética

La cinética se realizó empleando 8 spinners, 4 spinners fueron cultivados bajo condiciones control a 37°C y los 4 spinners restantes fueron cultivado bajo condiciones

bifásicas (37°C a 30°). El cambio se realizó a las 72 horas de ser iniciado el cultivo, manteniéndose a 30° a lo largo del resto del cultivo.

Determinación de proteína

Posteriormente a la recolección de muestra, el sobrenadante y el concentrado celular fueron separados mediante centrifugación, como se describe más adelante. Se tomaron las muestras correspondientes a 4 spinners: 2 de ellos a las 120 h (48 h después del cambio de temperatura), uno bajo condiciones control (37°C) y otro bajo condiciones de hipotermia moderada (30°C). Los 2 spinners restantes se colectaron al séptimo día del cultivo. Los spinners fueron centrifugados en tubos de 50 mL (Falcon) a 300 rpm durante 5 minutos, el concentrado de células (pellet) fue separado del sobrenadante, este último fue centrifugado nuevamente a 2500 rpm por cinco minutos, una vez colocado en tubos falcon de 50 ml y fueron guardados a -70°C hasta el momento de su purificación. Debido al gran volumen recolectado y al poco volumen que acepta la columna de purificación, se procedió a liofilizar las muestras, esto con el fin de concentrar nuestra proteína.

Una vez realizada la liofilización se tomo el polvo de cada uno de los matraces y fueron guardados en tubos de 1.5mL (Eppendorf), éstos fueron resuspendidos en 100 µL de agua MQ para su posterior purificación.

Preparación y purificación de tPA con la columna de afinidad

Se utilizaron dos formas de purificación utilizando la resina Concanavalina A (Con A). La primera fue con la columna a la que se preparó con sepharose Con A de Sigma® y la segunda se realizo con el kit Qproteome Mannose Glycoprotein de QIAGEN®, que utiliza la lectina Con A, lectina específica para manosa. Para empacar la columna, se tomó un mL de Con A y se colocó en una columna de 5 mL, se hicieron pasar dos volúmenes de etanol al 70% y dos volúmenes de Buffer de pegado ($\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}$ 0.1 M, NaCl 1M, $\text{MnCl}_2 - 4 \text{H}_2\text{O}$ 1 mM, NaN_3 0.01% y $\text{CaCl}_2 - 2\text{H}_2\text{O}$ 1mM) y se conservó a una temperatura de 4°C.

El sistema usado para la purificación de tPA consta de una bomba peristáltica (BIORAD Econo Pump EP-1), de baja presión, acoplado a un cromatógrafo (BIORAD) así como un colector de fracciones (BIORAD Fraction collector model 2110), estos equipos acoplados a la columna de Con A preparada y empacada previamente.

Antes de la purificación de las muestras, se realizó un lavado de las mangueras del equipo con una solución 0.5 M de hidróxido de sodio (150 mL), posteriormente fueron enjuagadas con agua Mili Q (500 ml). La columna fue acoplada al sistema y se preparó usando 6 volúmenes (1 volumen es igual a 10 ml) de buffer de pegado (CH_3COONa 0.1 M, NaCl 1M, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaN_3 0.01%). Posteriormente, la muestra se depositó en la columna de manera manual, se inició la cromatografía a un flujo continuo de 0.5 mL/ min. Se realizaron gradientes entre buffer de pegado y el buffer de elución (CH_3COONa 0.1M, NaCl 1 M, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1mM, NaN_3 0.01 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM y α -metil manosido 0.05 M). El gradiente empleado fue de 100% de buffer de pegado a un 100% de buffer de elución pasando por las mezclas de porcentajes intermedios; las fracciones obtenidas fueron colectadas, marcadas y dializadas con una membrana Spectra/Por 3 MWCO: 3.500 ® y utilizando el equipo Microdializer system 500 Pierce ® debido a la alta concentración de sales.

Las porciones colectadas fueron agrupadas en fracciones no glicosiladas (no retenidas por la columna) y fracciones glicosiladas (pegadas a la columna y posteriormente eluídas).

Cromatografía por columna con el Kit Qproteome Mannose Glycoprotein de QIAGEN

Se prepararon y etiquetaron dos columnas, una para cada temperatura (37 y 30°C), se prepararon 2.5 ml del buffer de pegado con 25 µL de la solución de inhibidor de proteasas (100x), de esta solución preparada se tomaron 500 µL a 50 µL del sobrenadante, se mezclaron suavemente. Esta mezcla se colocó en la columna correspondiente, dejando incubar por un minuto, se centrifugó durante dos minutos a 500 rpm, y se lavó dos veces con 750 µL de la primera solución preparada.

En un tubo aparte se preparó una alícuota del buffer de elución (300 μ L) y se le agregó 3 μ L de la solución de inhibidor de proteasas. Se cambió la columna de centrifugación a un tubo de microcentrífuga limpio. Se hicieron pasar de 100 μ L en 100 μ L de la solución preparada anteriormente, dejando que se incube por un minuto y se centrifugó por dos minutos a 500 rpm.

SDS-PAGE y Western Blot

La identificación de tPA fue realizada en geles de poliacrilamida desnaturalizantes SDS-PAGE que fueron teñidos posteriormente con Coomassie y/o tinción de plata. Para los Western Blot (WB) se utilizaron membranas INMOBILON-P Millipore®, el marcador de peso molecular utilizado fue de la compañía Fermentas PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder. Anti-tPA caprino y el secundario es proteína G HRP.

Posterior a la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana, esta fue bloqueada con albúmina (BSA) al 3% por 1 hora en agitación suave y a temperatura ambiente, se lavó con TBS por diez minutos y 2 veces con TBS-tween 20 al 0.05% durante diez minutos, se puso a incubar la membrana con el anticuerpo primario en una dilución 1:1000 en TBS-tween 20 durante una hora a una temperatura de 37°C, se realizó un lavado con TBS durante diez minutos y otros dos lavados con TBS-tween 20 por diez minutos cada lavado. Se realizó la segunda incubación con el anticuerpo secundario en una dilución 1:2000 por un lapso de 1 hora a temperatura ambiente. Se hicieron dos últimos lavados con TBS-tween 20 de diez minutos cada uno y un último lavado con TBS, para posteriormente ser revelado por 3,3'-Diaminobenzidine (DAB).

Geles en dos dimensiones

Preparación de las muestras (ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit BIORAD®)/Extracción de proteínas

Se transfirieron 100 μ L de muestra total proveniente de la línea celular CHO-TF70R a un tubo eppendorff de 1.5 mL, se agregaron 300 μ L del agente precipitante 1 y se mezcló suavemente, esto se deja incubó por 15 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo se agregaron 300 μ L del agente precipitante 2, se mezcló hasta homogenizar, se centrifugaron los tubos a velocidad máxima (14000 rpm) por cinco minutos, hasta la formación de un concentrado proteico (pellet). Evitando tocar el pellet, el sobrenadante se descartó, se volvió a realizar una centrifugación de 15-30 segundos para eliminar cualquier residuo líquido que pudiese haber quedado. Se agregaron 40 μ L del reactivo de lavado 1 sobre el pellet y se centrifugó a velocidad máxima por cinco minutos, posteriormente se agregaron 25 μ L de agua mili Q y se sometió a vortex de 10 a 20 segundos, esto con el fin de dispersar el pellet, ya disperso se agregó 1 mL del reactivo de lavado 2 (prenfriado a -20°C por al menos una hora) y 5 μ L del aditivo de lavado 2, se sometió a vortex por un minuto. Esta mezcla se incubó a -20°C por treinta minutos, cada 10 minutos de esta incubación se utiliza el vortex durante 30 segundos. Posterior a la incubación, se centrifugó el tubo por cinco minutos a velocidad máxima, para obtener un pellet más denso; se descartó el sobrenadante y se realizó una segunda centrifugada de 15-30 segundos para eliminar el exceso de líquido, a partir de este punto el pellet tomó una coloración blanquecina. El pellet se dejó secar a temperatura ambiente por no más de cinco minutos. Este último se resuspendió en 125 μ L en el buffer de rehidratación 2-D (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 40 mM DTT, 0.5% Pharmalyte o IPG buffer, 0.002% azul de bromofenol, 2.5 ml). Esta es una solución solubilizante que ayuda a que una mayor cantidad de proteínas sean solubilizadas y se obtenga una mayor cantidad de puntos en el patrón del gel bidimensional. Finalmente se centrifugó a velocidad máxima por 5 minutos a temperatura ambiente con el fin de aclarar la muestra de proteína. La muestra se conservó a -80°C para su posterior análisis.

Preparación para separación por punto isoelectrico (ReadyPrep™ 2-D Starter Kit BIORAD®) y separación en gel por peso molecular

Electroforesis bidimensional (2D).

Isoelectroenfoque (primera dimensión).

El isoelectroenfoque para la estandarización de las muestras, se realizó en tiras de 7 cm con pH inmovilizado de 3-10.

a) Para las tiras de 7 cm se mezclaron 100 µL de la muestra con 1 µL de buffer IPG de pH inmovilizado de 3-10 y el buffer de rehidratación

b) La mezcla se colocó en el fondo del sarcófago de isoelectroenfoque (IEF), sobre la mezcla se puso la tira de acrilamida con pH inmovilizado, con la malla de acrilamida en contacto con el buffer. Al momento de poner las tiras en el sarcófago se hicieron coincidir los electrodos (positivo con positivo y negativo con negativo).

c) Finalmente la tira se cubrió con aceite mineral, con la finalidad de evitar la evaporación de la muestra.

d) Los sarcófagos se colocaron en la unidad de isoelectroenfoque PROTEAN IEF cell de BIORAD.

e) Una vez transcurrido el tiempo de rehidratación, inició el programa de ciclos empleado para el isoelectroenfoque de las muestras protéicas en función de la longitud de la tira, y del rango de pH seleccionado (Tabla 4).

Tabla 4. Programación de la primera dimensión en el PROTEAN IEF cell.

Longitud Tira	Rango de pH	Voltaje (v)	Duración h:min	Volt-hora kVh
7 cm	3-10	Paso 1 500 V	0:30	0.25
	3-10 lineal	Paso 2 1000 V	0:30	0.5
		Paso 3 5000 V	1:40	7.5

Equilibrio de la primera dimensión

a) Al completarse los ciclos del IEF, las tiras fueron incubadas en agitación en el buffer de equilibrio (BE) durante 15 min.

b) Al terminar este periodo se incuban las tiras en buffer de equilibrio adicionado con iodoacetamida (125 mg/5 mL de BE) durante 15 min.

Segunda dimensión.

La separación de las proteínas por peso molecular se hizo en SDS PAGE. Se utilizaron geles al 15% de acrilamida.

a) Se quitó el exceso de BE y iodoacetamida de las tiras sumergiéndolas en buffer de corrida (Tris base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1% p/v).

b) La tira se colocó de manera convencional con el lado positivo hacia la izquierda (junto al marcador de peso molecular) y con la malla de acrilamida hacia el frente.

c) La electroforesis se realizó a 15 mA/gel.

Tinción de geles

Para la tinción de geles con plata se utilizó el protocolo descrito por Scevchenko y colaboradores en 1996.

Brevemente se fijó el gel en una solución de metanol al 50% y ácido acético 5% durante 20 minutos. Se lavó el metanol al 50% durante 10 minutos. Se lavó el gel durante dos horas en agua Mili-Q. Se sensibilizó el gel con la solución $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 0.02% durante 1 minuto y se lavó el gel dos veces con agua Mili-Q. Se incubó el gel en la solución de AgNO_3 al 0.1% durante 20 minutos a 4 °C y se repitieron los lavados con agua Mili-Q. Se reveló el gel con la solución de formalina (formaldehído al 35%) al 0.04% y Na_2CO_3 al 2%. Para detener la tinción se utilizó ácido acético al 5%,

Tinción de Coomassie colidal se usó la técnica de Anderson (1991).

Los geles de poliacrilamida se depositaron en charolas que contuvieran la solución de fijación (50% CH_3OH , 3% H_3PO_4) y se incubaron en agitación suave durante un mínimo de 2 h. Se removió la solución fijadora y se lavó cada gel con agua tres veces en

intervalos de 20 min. Después del último cambio de agua se adicionó la solución de pre-tinción (34% CH₃OH, 3% H₃PO₄, 17% (p/v) (NH₄)₂SO₄). Se incubó una hora y posteriormente se añadieron 0.35 g de Commasie R-250 por cada litro de solución. La solución de tinción estuvo en contacto con el gel entre 18 y 24 horas. Finalmente, se retiró la solución de tinción y se lavó con agua mili Q hasta que el trasfondo azul fue eliminado.

Identificación del tPA por espectrometría de masas MALDI-TOF

Las proteínas separadas por electroforesis fueron cortadas del gel y posteriormente fueron digeridas con tripsina, con lo que se obtiene una mezcla de péptidos. La masa molecular de cada uno de los péptidos resultantes de la proteólisis se puede determinar experimentalmente mediante MALDI-TOF. Esta información se conoce como huella de masas de los péptidos de una proteína o peptide mass fingerprint (PMF). Por tanto, la proteína analizada puede ser identificada exitosamente cuando se produce una correspondencia entre los valores experimentales de las masas moleculares de cada uno de sus péptidos con los valores de masas teóricas esperadas para una de las proteínas existentes en las bases de datos (Wool *et al.*, 2002; Clauser *et al.*, 1999). Hoy en día existen varios programas accesibles vía Internet que brindan el servicio de identificación de proteínas en línea utilizando la estrategia del PMF y entre los más empleados se encuentra el MASCOT (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF), el ProFound (http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe) y el MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>).

Dichos programas usan la información primaria suministrada por la espectrometría de masas la cual es comparada con bases de datos de los cortes proteolíticos predichos para una determinada digestión, la debe ser reproducible y generar un conjunto de péptidos que característico para cada una de las proteínas reportadas. Por esta razón, es posible predecir mediante una digestión *in silico* el conjunto de péptidos que se debe generar mediante el tratamiento proteolítico específico de cada una de las proteínas almacenadas en las bases de datos de secuencias y por lo tanto se puede calcular

teóricamente las masas moleculares de cada uno de los péptidos esperados (Mann *et al.*, 1993).

La técnica de identificación empleada empleó ionización y es comúnmente llamada MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization), fue descrita por Karas y Hillenkamp en 1988. En este método de ionización los analitos fueron disueltos en una solución de un compuesto que absorbe UV, llamado matriz (matrix), y colocado dentro del espectrómetro de masas. Debido a que los solventes se van secando, los compuestos de la matriz cristalizaron y los analitos quedan contenidos dentro de la matriz de cristales (Pulsos de láser de luz UV (3-5 ns, 337 nm, 107W/cm²) son utilizados para vaporizar pequeñas cantidades de la matriz donde se incluyen los iones del analito y llevados a fase gaseosa en el proceso. La ionización ocurre por protonación en el ambiente ácido producido por los compuestos de la matriz y por la adición de ácido diluido en la muestra. Debido a que con la desorción por láser la producción de iones es discreta y es pequeños paquetes, el MA LDI esta comúnmente combinado con un analizador de tipo time-of-flight (TOF) dando un sistema de alta sensibilidad (Gevaert *et al.*, 1996)

Mediante MASCOT se realizó la identificación de proteínas basado en bases de datos de pesos de péptidos, este software usa métodos probabilísticos para calcular significancia entre datos. http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=/search_select.html

El procesado automático de los espectros, la generación de la lista de picos y la búsqueda en la base de datos se llevó a cabo utilizando la combinación de Mascot (Matrix Science, Inc., London, U.K) y el programa Protein Pilot 2.0.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) con el algoritmo Paragon. La identificación del origen proteico de los péptidos se llevó a cabo utilizando la base de datos de proteínas del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (NCBI nr, National Center for Biology Information non-redundant) restringida a las secuencias polipeptídicas de las proteínas humanas.

En todos los casos, el motor de búsqueda (MASCOT) estableció un valor estadístico de probabilidad o score significativo (a una $p > 0,05$) como condición para una identificación positiva. La identificación de las proteínas está basada en el ProtScore, con una línea de corte fijada en 1.3, lo que significa un nivel de confianza del 95%.

13. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la velocidad de crecimiento y de viabilidad de los cultivos de la línea CHO-TF70R a diferentes tiempos: 37°C y en hipotermia moderada (30°C).

A lo largo de la cinética, se tomaron muestras cada 24 horas para determinar la concentración celular (Figura 8) y determinar la viabilidad de los cultivos (Figura 9), esto mediante la técnica de exclusión con azul de tripano. La mayor concentración celular se obtuvo en los cultivos a 37°C 120 horas después de iniciado el cultivo, con una concentración promedio de 1.2×10^6 cel/mL, mientras que en el cultivo bifásico la concentración máxima calculada fue de 1.5×10^6 cel/mL también a las 120 horas de iniciada la cinética (correspondientes a las 48 horas posteriores al cambio de temperatura). Ambos cultivos, tanto control como bifásico, iniciaron con una velocidad de crecimiento (μ) de 0.021 h^{-1} , posterior al cambio de temperatura la velocidad de crecimiento en los cultivos bifásicos disminuyó a una μ de 0.017 h^{-1} .

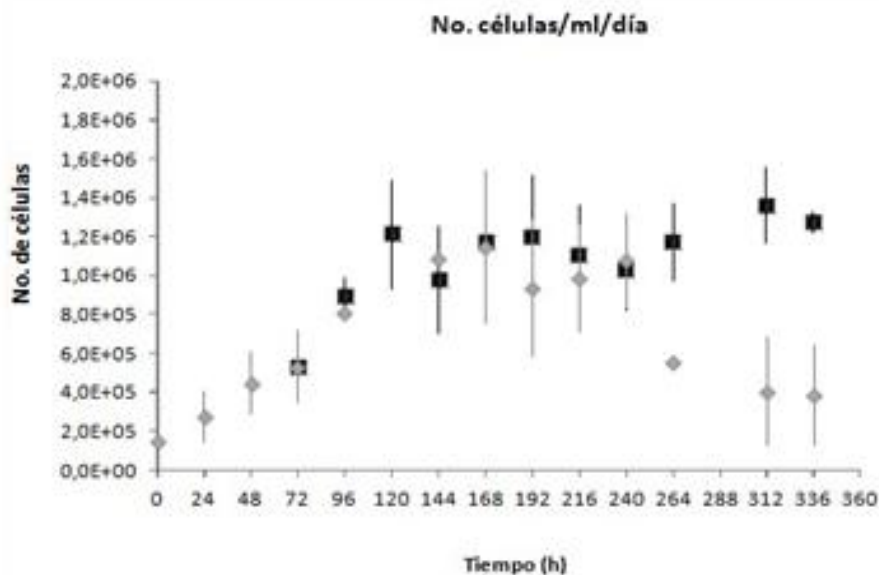


Figura 8. Cinética de crecimiento de la línea celular CHO-TF70R en cultivo control a 37 °C grados (♦) y en cultivo bifásico de 37°C a 30°C (■).

Con respecto a la viabilidad (Figura 9) se comprobó que con el cambio de temperatura (cultivos bifásicos) la vida de los cultivos se extiende. Lo cual correlaciona con los resultados preliminares encontrados por Barrón en 2009. Se observó que la viabilidad del cultivo control (37°C) alcanza el 60% a las 240 h, en comparación al cultivo bifásico que tardó 360 horas para llegar al 60% de viabilidad, por lo cual se concluyó que el cultivo bifásico prolonga la vida de las células CHO-TF70R 120 horas adicionales con respecto al control (Figuras 8).

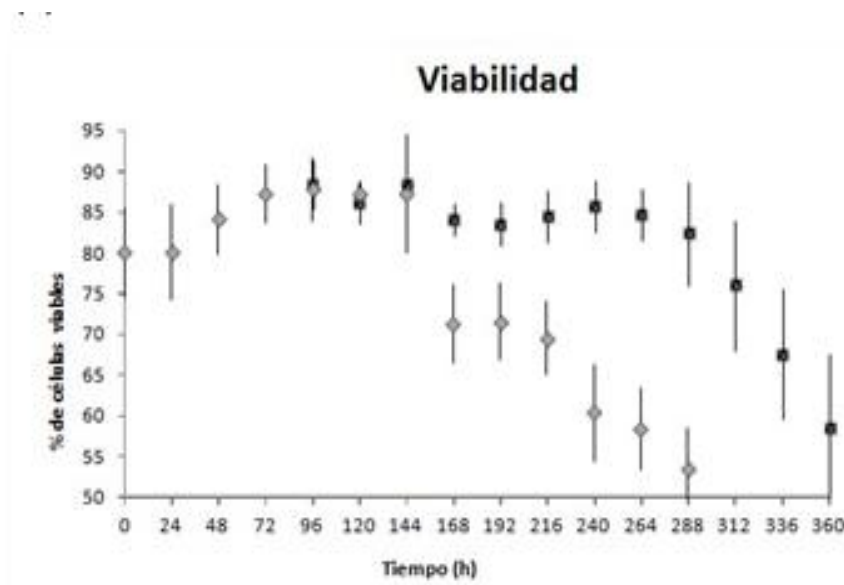


Figura 9. Cinética de la viabilidad de la línea celular CHO-TF70R a diferentes tiempos bajo condiciones de crecimiento control a 37°C (◆) y durante el cultivo bifásico de 37°C a 30°C (■).

Evaluación del consumo de glucosa de los cultivos como indicador de actividad metabólica

En la figura 10 se muestra el consumo específico de glucosa de ambos cultivos a 37°C y bifásicos. Se puede apreciar que no hay diferencia significativa en el consumo de glucosa entre una y otra condición. Aunque es de esperarse que las células en cultivo bifásico consuman una menor concentración de glucosa o en menor tiempo, debido a la disminución del metabolismo por el decremento en la temperatura, es posible que el gasto requerido para la respuesta al estrés por hipotermia moderada requiera de un

mayor consumo de glucosa. Es probable que otros metabolitos como la glutamina, glutamato y lactato muestren algún cambio, por lo que en un futuro se analizarán.

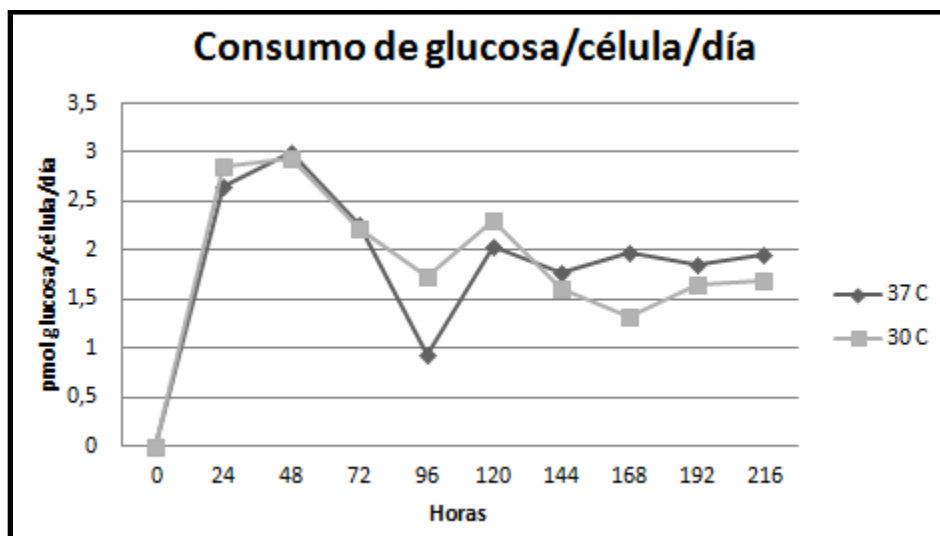


Figura 10. Cinética de consumo específico de glucosa por células CHO-TF70R.

Como el cambio de temperatura de los cultivos bifásicos sucede en una rampa de tiempo, dependiente del líquido en el que se transfiere la temperatura. Se decidió determinar la cinética de enfriamiento se muestra en la figura 11, en la que se observa que a los 15 minutos de realizarse el cambio a la incubadora a temperatura sub óptima, el cultivo bifásico alcanza los 34 °C (temperatura máxima subóptima) y a los 70 minutos de haber comenzado el cultivo bifásico, la temperatura ha descendido a 30 °C.

Este dato es importante e interesante, pues las respuestas moleculares ante diferentes tipos de estrés suceden en diferentes intervalos de tiempo y también en función del tiempo en el que sucede en el estímulo. De ahí que los datos obtenidos posteriormente son de cultivos bifásicos con una rampa de cambio de temperatura de 37°C a 30°C de 70 min.

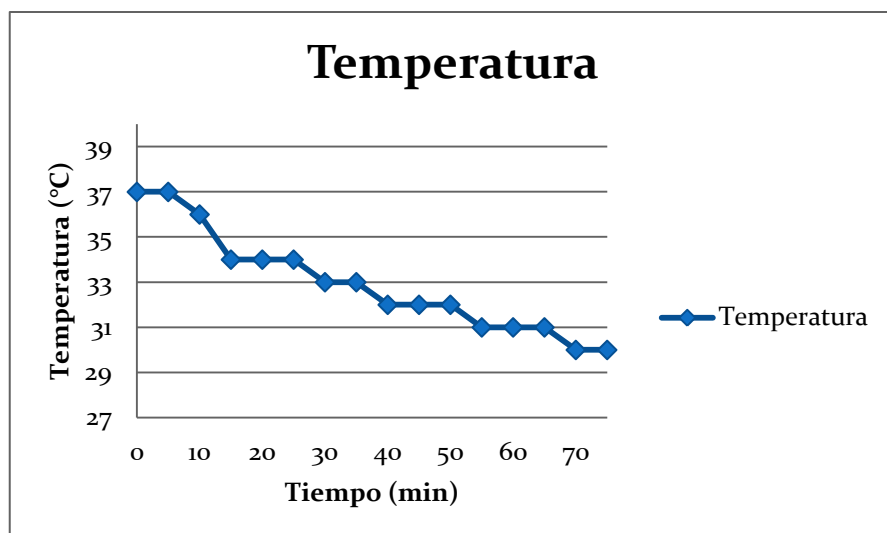


Figura 11. Pendiente de enfriamiento que muestra el tiempo en el que el cultivo en condiciones control a 37°C, alcanza la temperatura sub óptima de crecimiento a los 30°C.

Perfiles de proteína citosólica y secretada de los cultivos sumergidos de la línea celular CHO-TF70R.

Con la finalidad de determinar las fracciones de proteína citosólica y secretada de la línea celular CHO-TF70R, se aislaron el paquete celular del sobrenadante para procesarlos mediante la técnica de separación de proteínas SDS PAGE 2D. Para descartar proteínas propias sólo del medio. Se corrió un gel control con muestra proveniente del medio de cultivo y sin células (Figura 12). Se resolvieron los patrones correspondientes al proteoma y al secretoma (Figura 13 y 14) de la línea celular CHO-TF70R lo cual nos permitió evidenciar los perfiles característicos de ambas fracciones. En las figuras 13 y 14 se muestran los perfiles proteómicos de las proteínas del citoplasma y de las proteínas secretadas al medio respectivamente. Ambas muestras en los geles fueron colectadas al tiempo 24 de haber comenzado el cultivo. En este trabajo se presentan los patrones de proteína total correspondientes al proteoma y al secretoma de CHO-TF70R resultantes de la estandarización de las condiciones de electroforesis bidimensional.



Figura 12. Estandarización de las condiciones de electroforesis bidimensional para la muestra correspondiente a medio de cultivo CD-Opti CHO libre de células. Gel 2-D al 15 % de poliacrilamida, strips 7 cm 3 a 10 pH. Muestra proveniente de medio completo utilizado en los cultivos celulares, usado como control negativo. Teñido con azul de Coomassie. El marcador de peso molecular utilizado fue Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder de Fermentas®.

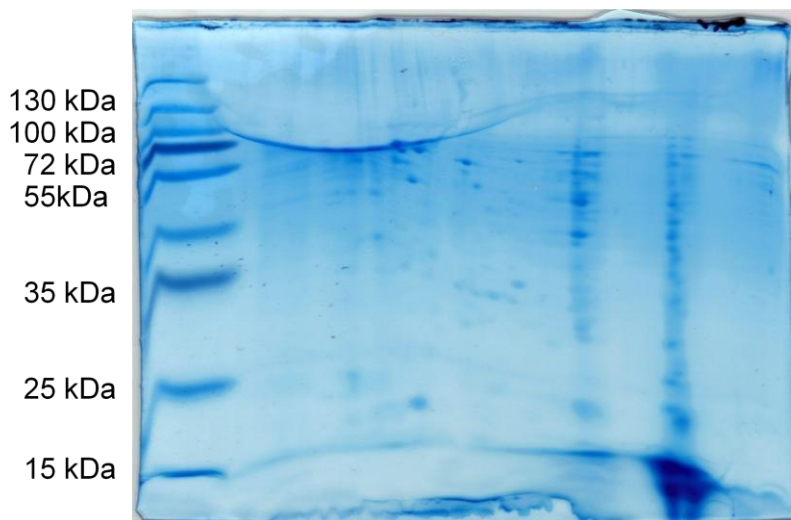


Figura 13. Estandarización de las condiciones de electroforesis bidimensional para la muestra correspondiente a la proteína citoplasmática proveniente de la línea celular CHO-TF70 a las 24 horas de iniciado el cultivo. Gel 2-D al 15 % de poliacrilamida, strips 7 cm 3 a 10 pH Perfil proteómico correspondiente al paquete celular de un cultivo CHO-TF70R. Teñido con azul de Coomassie. El marcador de peso molecular utilizado fue Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder de Fermentas®.

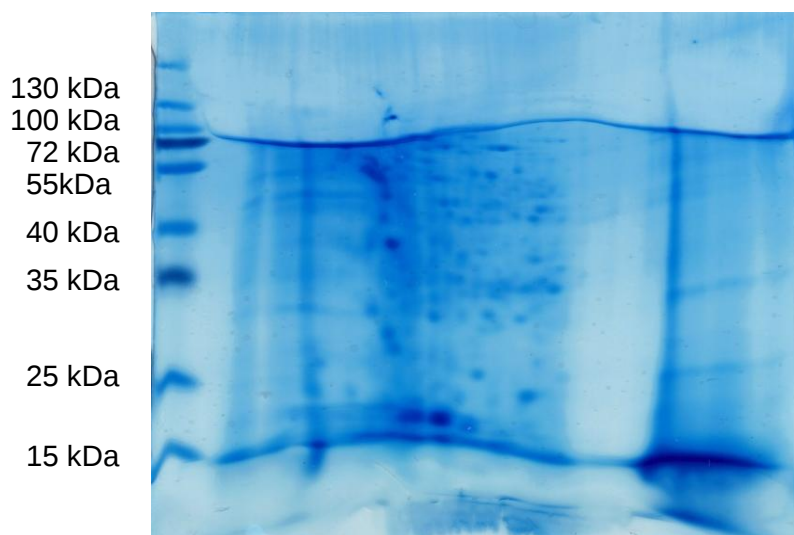


Figura 14. Estandarización de las condiciones de electroforesis bidimensional para la muestra correspondiente a la proteína secretada proveniente de un cultivo de la línea celular CHO-TF70R a las 24 h de iniciado el cultivo. Gel 2-D al 15 % de poliacrilamida, strips 7 cm 3 a 10 pH Perfil proteómico correspondiente al secretoma de un cultivo CHO-TF70R. Teñido con azul de Coomassie. El marcador de peso molecular fue Page Ruler TM Plus Prestained Protein Ladder de Fermentas ®.

Purificación de proteínas glicosiladas provenientes de la fracción secretada de la línea celular CHO-TF70R

La proteína tPA secretada fue purificada por dos métodos de afinidad usando dos estrategias de purificación para glicoproteínas. Ambos métodos fueron comparados.

Uno de los sistemas de purificación usados fue la resina comercial de Sigma ® empacada sobre una columna de afinidad, y el segundo método fue con el uso del kit comercial de QIAGEN, las fracciones obtenidas por ambos métodos fueron separadas mediante cromatografía en gel desnaturizante unidimensional teñido con azul de Coomassie, Se apreció que las fracciones obtenidas por el método comercial de QIAGEN se resolvieron mejor, fueron más abundantes y limpias (el gel se cargó contra volumen) en comparación con las mismas muestras de glicoproteína aisladas por FPLC. Por lo anterior, el método de purificación de proteínas glicosiladas de QIAGEN fue seleccionado cómo el método más adecuado para el análisis de las fracciones provenientes de los sobrenadantes de cultivos de células CHO-TF70R (figura 15).

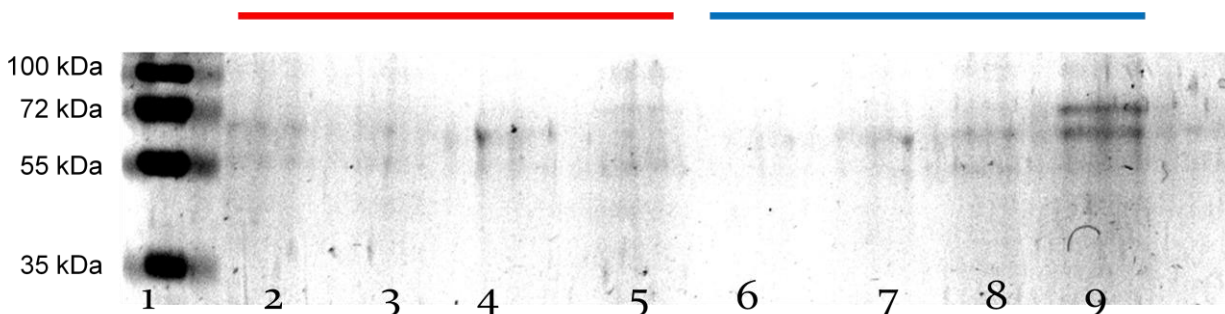


Figura 15. Comparación entre dos métodos de separación de proteínas glicosiladas. Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 15%, teñido con azul de Coomassie, de los carriles 2 al 5, son muestras de proteína glicosilada aisladas mediante FPLC (carriles del 2 al 5) (■), en el siguiente orden: 2. 37°C a las 72 horas del cultivo, 3. 30°C a las 72 horas del cultivo al momento de realizar el cambio 4. 37°C a las 120 horas del cultivo, 5. 30°C a las 120 horas del cultivo, con la lectina comercial Concanavalina A de Sigma®. De los carriles 6 al 9, se muestran porciones de glicoproteínas aisladas mediante el kit Qproteome Mannose Glycoprotein de QIAGEN® (carriles del 6 al 9) (■), en el siguiente orden 6. 37°C a las 72 horas del cultivo, 7. 30°C a las 72 horas del cultivo al momento de realizar el cambio 8. 37°C a las 120 horas del cultivo, 9. 30°C a las 120 horas del cultivo. El buffer de elución que se utilizó está compuesto por CH₃COONa 0.1M, NaCl 1 M, MnCl₂ 4H₂O 1mM, NaN₃ 0.01 % CaCl₂ H₂O 1 Mm y α-metil manosido 0.05 M. y el marcador de peso molecular utilizado fue Page Ruler™ Plus Prestained protein ladder FERMENTAS®.

Determinación de la presencia del tPA humano en la fracción glicosilada y secretada del cultivo sumergido de línea celular CHO-TF70R entre las condiciones control (37°C) y cultivo bifásico

Posteriormente a la selección del método de purificación, los sobrenadantes provenientes de los cultivos de la línea celular CHO-TF70R crecidos a 37 °C y en cultivo bifásico colectados a los tiempos (48, 72, 120 y 168 h) fueron procesados por el kit Qproteome Mannose Glycoprotein de QIAGEN®. Las fracciones no glicosiladas del secretoma de la línea celular CHO-TF70R crecida bajo las condiciones (37°C y bifásico a distintos tiempos) también fueron colectadas. Para apreciar su perfil proteico fueron resueltas en un SDS PAGE al 15%, se cargaron cantidades iguales en función de su volumen en el siguiente orden: en el carril 2, a las 48 horas del cultivo a 37°C antes de realizar el cambio, en el carril 3 a las 48 horas al momento del cambio a 30°C, en el

carril 4 a las 120 horas del cultivo (48 horas del cambio) a 37°C y en el carril 5 a las 120 horas del cultivo (48 horas del cambio) a 30°C (Figura 17).

Las fracciones pegadas, es decir las proteínas glicosiladas, fueron eluidas al final empleando el α -metil-manosido. Las muestras de glicoproteínas correspondientes al cultivo a 37 y el cultivo bifásico analizados a distintos tiempos fueron resueltas en un SDS PAGE al 15%. Dicho gel se tiñó con plata y se observaron perfiles proteicos distintos, correspondientes a las diferentes muestras, en las muestras eluidas a las 48 horas del cambio de temperatura, se apreciaron unas bandas particularmente abundantes alrededor de los 68 kDa que se enriquecen bajo las condiciones del cultivo bifásico lo cual coincide con el peso esperado para tPA, lo cual sugiere la sobre producción de esta proteína recombinante (Figura 16).

Debido a la observación de bandas cercanas al peso molecular de 68 kDa en las fracciones secretadas y glicosiladas se decidió corroborar mediante inmunodetección la presencia de tPA humano secretado y glicosilado.

Así mismo, se realizó una cuantificación proteica antes y después de la purificación, con lo que se determinó el porcentaje de recuperación para cada muestra analizada. En la tabla 6, se puede apreciar el porcentaje de recuperación de proteína glicosilada con el kit Qproteome Mannose Glycoprotein de QIAGEN®, en el que el promedio de recuperación de proteína pegada a Concanavalina A, es de un 3% de proteína glicosilada recuperada en promedio.

Tabla 5. Porcentaje de recuperación con el Kit Qproteome Mannose Glycoprotein de QIAGEN®. %P= Pegado, %NP= No Pegado

Fracciones	72 h 37 °C	72 h 30°C	120 h 37°C	120 h 30 °C	7 d 37 °C	7 d 30°C
% P	3.2	3.02	2.48	2.95	4.35	3.56
% NP	93	94	95	96	91	95

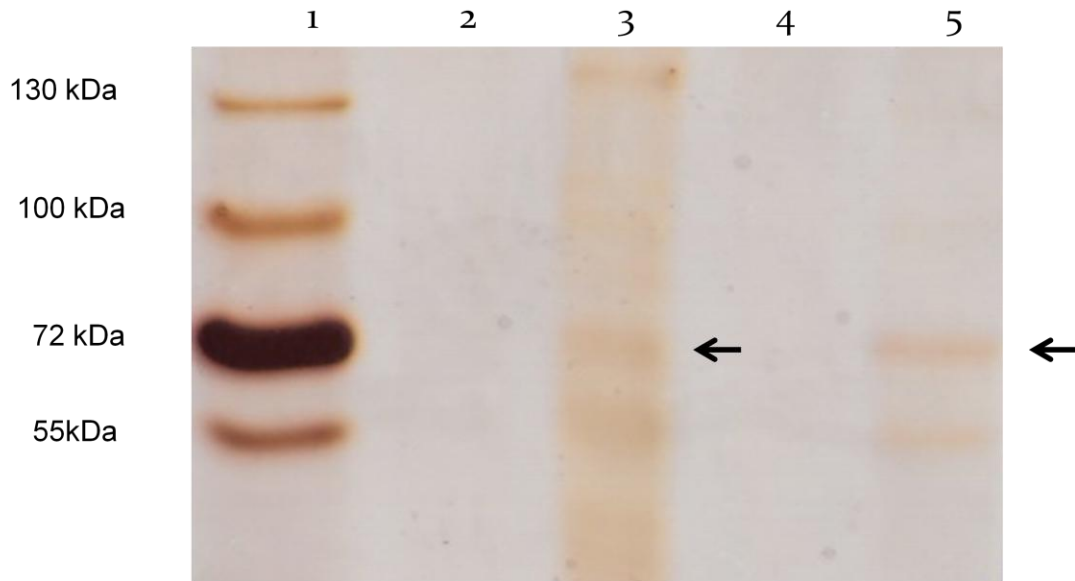


Figura 16. Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10%, teñido con plata, en el carril uno marcador de peso molecular de FERMENTAS®, en el carril 2 y 4 se muestra una fracción de cultivo control a 37°C, en el carril 2 antes del cambio y en el carril 4 a las 48 horas de haber realizado el cambio del cultivo (120 horas), en el 3 y 5 carril se muestra la corrida electroforética del cultivo a 30°C, antes de iniciar el cultivo bifásico y 48 horas (120 horas) posterior al cambio de temperatura. Las cuatro muestras son fracciones eluidas con el kit.

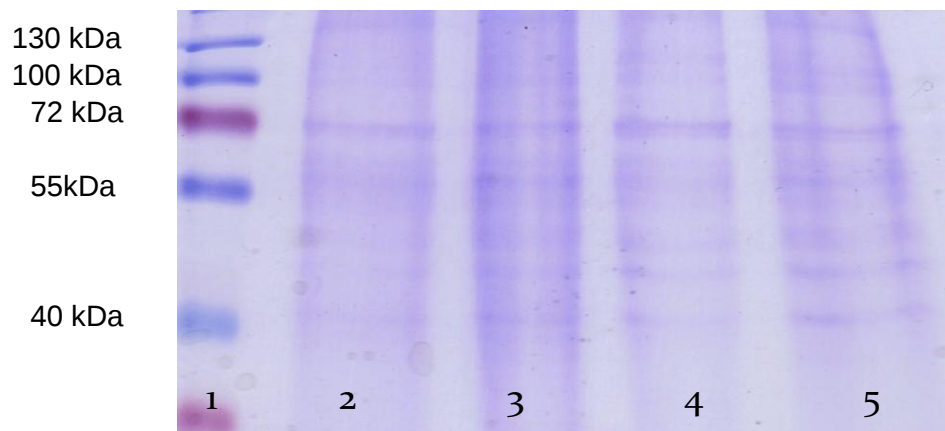


Figura 17. Aislamiento de las proteínas no glicosiladas en la fracción secretada de la línea CHO-TF70R. Fracciones no glicosiladas correspondientes al secretoma de la línea celular CHO-TF70R. A partir de los cultivos a distintas temperaturas (37°C y bifásico) se obtuvieron por centrifugación los sobrenadantes y una vez liofilizados se procesaron por el kit Qproteome Mannose Glycoproteins de QIAGEN. La parte no glicosilada fue cargada en un SDS PAGE al 15%, en el siguiente orden: En el carril uno marcador de peso molecular de FERMENTAS®, en el carril 2 y 4 se muestra una fracción de cultivo control a 37°C, en el carril 2 antes del cambio y en el carril 4 a las 48 horas de haber realizado el cambio del cultivo (120 horas), en el 3 y 5 carril se muestra la corrida electroforética del cultivo a 30°C, antes de iniciar el cultivo bifásico y 48 horas (120 horas) posterior al cambio de temperatura

Identificación de tPA en las fracciones del secretoma glicosilado correspondientes a distintos puntos de la cinética del cultivo bifásico comparado con el cultivo control a 30°C.

Se determinó mediante inmunodetección la presencia de tPA humano secretado y glicosilado durante las siguientes condiciones: se tomaron muestras a los siguientes tiempos, 48, 72, 120 y 168 horas del cultivo total, tanto en condiciones control como en cultivo bifásico.

Como se puede apreciar en la Figura 18, el anticuerpo monoclonal contra tPA reconoció bandas específicas en el peso esperado, por lo que se concluyó que existe tPA glicosilado presente en el medio correspondiente a los cultivos CHO-TF70R. Adicionalmente se observó un aumento relativo a medida que transcurre el tiempo en los cultivos bifásicos. Lo que infiere que en los cultivos bifásicos el tPA se está glicosilando, es secretado y además se acumula, pues aparentemente es mayor al obtenido en cultivos control a 37°C (Figura 18).

Con el objetivo de identificar plenamente la presencia de tPA humano, se optó por hacer un análisis con un espectrómetro de masas.

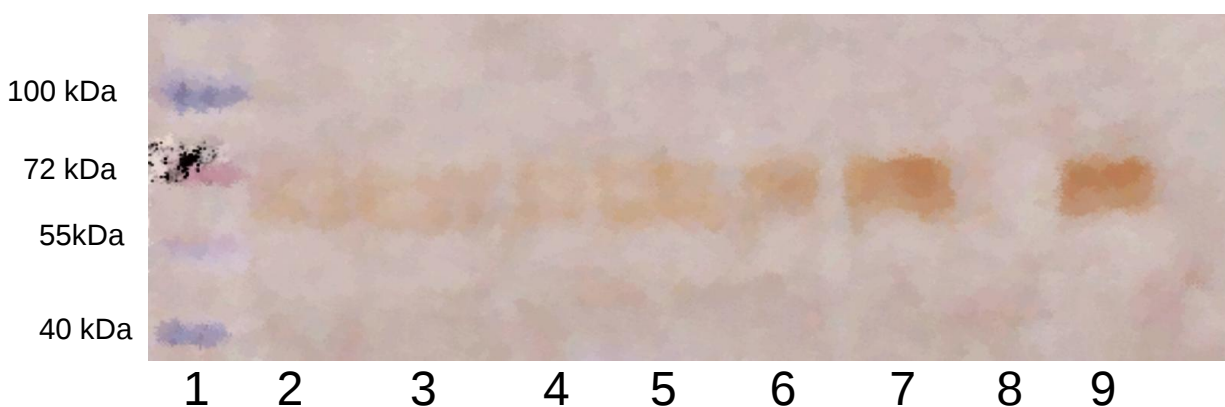


Figura 18. Western Blot utilizando membranas inmobilon P, en el que se confirma que el activador del plasminógeno tisular se está produciendo en la línea celular TF70R-CHO, con el siguiente orden, en el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular de FERMENTAS®, carril 2 y 3, muestras del medio a las 72 horas de iniciado el cultivo a 37 y 30°C respectivamente, carriles 4 y 5, muestras del medio a las 120 horas a 37 y 30°C respectivamente, carriles 6 y 7, muestras del medio a los siete días del cultivo a 37 y 30°C respectivamente, el carril ocho es medio completo, y en el carril 9 tPA control 5µg (Actilyse® BOEHRINGER INGELHEIM).

Identificación mediante espectrometría de masas de la proteína tPA humano

Una vez que fue identificado el tPA por inmunodetección (figura 16) y que éste correspondía a la banda cercana al peso molecular de 68 kDa, se cortaron las bandas correspondientes al peso predicho para tPA humano (Figura 18), para identificar mediante espectrometría de masas que el tPA detectado corresponda al tPA humano. Los cortes realizados al gel fueron enviados a INMEGEN (Instituto Nacional de Medicina Genómica) para su análisis.

Los espectros de fragmentación arrojados por el espectrómetro de masas nos condujeron a la identificación de péptidos. Para que la proteína tPA fuera considerada positivamente identificada requirió al menos de dos péptidos plenamente encontrados (arriba del 95% nivel de significación) y de más de seis aminoácidos cada uno. Se cumplieron estos requisitos pues se identificaron un péptido de 9 residuos con 96% de confianza y otro de 12 aminoácidos con un 99% de confianza. Lo cual confirma que la proteína identificada por inmunodetección en la fracción secretada y glicosilada de la línea CHO-TF70R corresponde a tPA humano. Los resultados presentan alta homología en la asignación de los péptidos ($p < 0.05$). Los péptidos fueron observados utilizando el algoritmo Paragon y/o el motor de búsqueda Mascot.

Adicionalmente se observó una cobertura del 20% en el que también se encontraron péptidos con menor porcentaje de confianza (67 y 19%). En la Figura 19 se muestra la secuencia completa del activador del plasminógeno tisular en la cual se muestran las secuencias que fueron detectadas tras el análisis por MASCOT. Las secuencias encontradas se muestran en la tabla 6.

Las secuencias en rojo tienen una confiabilidad menor al 1%. La que se encuentra en amarillo tiene una confiabilidad mayor al 60% pero menor del 80%. Las secuencias en verde tienen un porcentaje de confiabilidad mayor al 95% (Figura 20)

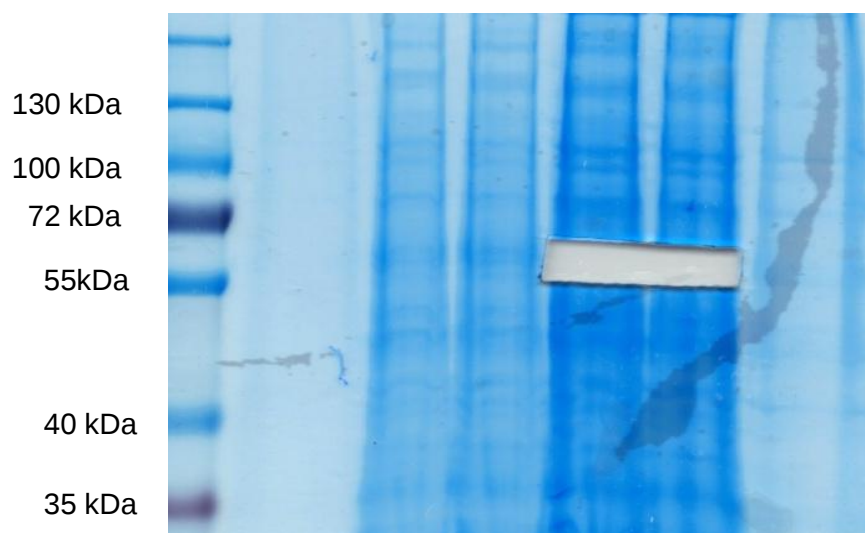


Figura 19. Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie donde se muestran los sitios de corte que fueron enviados a INMEGEN. Fracciones concentradas por SAVANT correspondientes a 30°C a los siete días del cultivo, se cargaron por duplicado para tener más material a analizar. Los dos primeros carriles son la misma muestra por duplicado sin concentrar en el SAVANT y estos fueron utilizados como referencia de migración de las bandas de interés.

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSQEIHFRRGARSYQVICRDEKTQ
 MIYQQHQSWLRPVLRSNRVEYCWCNSGRAQCHSVPVKSCSEPRCFN
 GGTCQQALYFSDFCQCPEGFAGK**CCEIDTR**ATCYEDQGISYRGTWST
 AESGAECTNWNSSALAQKP**YSGRRPD**AIRLGLGNHNYCRNPDRDSKP
 WCYVFKAGKYSSEFCSTPACSEGNSDCYFGNGSAYRGTHSLTESGAS
 CLPWNSMILIGNVYTAQNPSAQUALGLGKHNYCRNPDGDAKPWCHVLK
 NRRLTWEYCDVPSCSTCGLRQYSQPQFRIKGGLF**ADIASHPWQAAIFA**
KHRRSPGERFLCGGILISSCWILSAAHCFQER**FPPH**LT**VILGR**TYRVVP
 GEEEQKFEVEKYIVHK**EFDDDTYDND**IAL**LQLK**SDSSR**CAQESSV**VRTV
CLPPADLQLPDWTECELSGYGK**HEALSPFY**SERLKEAHVRLYPSSRCT
 SQHLLNRTVTDNMLCAGDTRSGGPQANLHDACQGDSGGPLVCLNDG
 RMTLVGIISWGLGCGQKDVPGVYTK**VTN**YLDWIRDNMRP

Figura 20. Secuencia proteica completa del activador del plasminógeno tisular humano. Las secuencias en rojo tienen una confiabilidad menor al 1%. La que se encuentra en amarillo tiene una confiabilidad mayor al 60% pero menor del 80%. Las secuencias en verde tienen un porcentaje de confiabilidad mayor al 95%.

Tabla 6. Secuencias arrojadas por el análisis hecho por espectrometría de masas de masas (INMEGEN) con su respectivo porcentaje de confianza. Que confirma la presencia de tPA humano recombinante en el secretoma.

Secuencia	% de confiabilidad
FPPHHLTIVILGR	99
VTNYLDWIR	96
HEALSPFYSER	67
RPDAIR	19

14. CONCLUSIONES

- Se determinaron las constantes de crecimiento para los cultivos control y cultivos bifásicos, siendo de 0.021 h^{-1} inicialmente para ambos, pero una vez realizado el cambio de temperatura la velocidad de crecimiento disminuyó a 0.017 h^{-1} en el cultivo bifásico. El cultivo control se mantuvo constante hasta las 264 horas en las que empieza la fase de muerte del cultivo; la viabilidad del cultivo bifásico se prolongó 120 horas adicionales en comparación al cultivo control.
- No hubo diferencia significativa en el consumo de glucosa entre una y otra condición. Aunque es de esperarse que las células en cultivo bifásico consuman una menor concentración de glucosa o en menor tiempo, debido a la disminución del metabolismo por el decremento en la temperatura, es posible que el gasto requerido para la respuesta al estrés por hipotermia moderada requiera de un mayor consumo de glucosa.
- Se obtuvieron los perfiles de proteína correspondientes al proteoma y el secretoma en los cultivos sumergidos de la línea celular CHO-TF70R, en geles bidimensionales, ambos perfiles resultan distintos entre si y presentan una distribución proteica particular.
- Se seleccionó un método *ad hoc* de purificación de proteínas glicosiladas provenientes de la fracción secretada de la línea celular CHO-TF70R, el protocolo del Qproteome® Mannose Glycoprotein Kit de QIAGEN mostró ser la mejor opción debido a la obtención un perfiles de glicoproteínas más discreto, limpio y abundante.

- El tPA humano producido en los cultivos control y cultivos bifásicos desarrollados en medios CD-OptiCHO de GIBCO®, se identificó mediante inmunodetección en las fracciones de cultivos CHO-TF70R secretadas y glicosiladas. Así mismo se corroboró un aumento relativo en el cultivo bifásico encontrándose la cantidad máxima de tPA acumulada en las muestras correspondientes al séptimo día del cultivo.
- Se identificó tPA humano por espectrometría de masas en muestras provenientes de cultivo de la línea celular CHO-TF70R (en la fracción secretada y glicosilada).

15. PERSPECTIVAS

El conocimiento generado con este trabajo, deja abierta una serie de preguntas las cuales pueden aportar información adicional y significativa para la caracterización del efecto del cultivo bifásico en condiciones de hipotermia moderada sobre la producción de la proteína activador del plasminógeno tisular (tPA) recombinante en la línea celular CHO-TF70R. Algunas de estas preguntas pueden ser contestadas mediante los siguientes objetivos:

- Cuantificar otros factores que puedan indicar actividad metabólica durante el cultivo de CHO-TF70R, tales como lactato, glutamina y glutamato.
- Realizar un análisis proteómico diferencial de las proteínas citosólicas correspondientes a la línea celular CHO-TF70R para monitorear los cambios que sufre la célula bajo el estrés de la producción de tPA recombinante bajo la presión del cultivo bifásico.
- Realizar ensayos glicoproteómicos del secretoma diferencial de la línea celular CHO-TF70R bajo diferentes condiciones de temperatura de cultivo (37°C y bifásico).
- Realizar análisis de glicanos mediante espectrometría de masas para observar en que residuo de aminoácido, el tPA se está glicosilando y conocer que glicoforma es la que se está secretando y/o determinar si se están secretando diferentes glicoformas.
- Determinar si el activador de plasminógeno tisular producido en la línea CHO-TF70R posee actividad.

16. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

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

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, Roberts, K. and Watson, J.D. 1994. Molecular Biology of the Cell. 3 era Edición. Garland Science. Nueva York. Chapter 13. Vesicular Traffic in the Secretory and Endocytic Pathways.

Andersen, D.C., Bridges T.Y. Gawlitzeck, M. and Hoy, C. 2000. Multiple Cell Culture Factors Can Affect the Glycosylation of Asn-184 in CHO- Produced Tissue – Type Plasminogen Activator. *Biotechnol. Bioeng.* 70(1):25-31

Barrón Castillo, M. 2009. Tesis: Estudio de la temperatura subfisiológica en cultivos de células CHO recombinantes: Efectos sobre el metabolismo, ciclo y muerte celular. Instituto de Biotecnología, UNAM

Bolívar Zapata, F.G. 2007. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. 2^{da} Edición. México, DF. El colegio Nacional. 718 p.

Booth, N.A. and Bachmann, F. 2006. Hemostasis & thrombosis: Basic Principles and clinical Practice. Fifth edition. Editorial Lipincott Williams & Wilkins. Robert Colman, Victor Marder, Alexander Clowes, James George and Samuel Goldhaber. Chapter 18: Plasminogen – plasmin system. Pp. 335 – 364.

Clauser, K.R., Baker, P., Burlingame, A.L. 1999. Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal Chem.* 71(14):2871-82.

Collen, D. 1999. The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb Haemost.* 1999 Aug;82(2):259-70.

Collen, D. and Lijnen, H.R. 2004. Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. *Journal of thrombosis and haemostasis* 2:541-546

Collen, D. and Lijnen, H.R. 2009. The tissue-type plasminogen Activator Story. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1151-1155

De la Peña Díaz, A. y Anglés-Cano, E. 2008. Hemostasia y trombosis. Segunda Edición. Editorial Prado. Carlos Martínez M & Sandra Quintana G. Capítulo 6: El sistema de la fibrinólisis y mecanismos de regulación. Pp. 147-165.

Desai, P.N., Shrivastava, N. and Padh, H. 2010. Production of heterologous proteins in plants: Startegies for optimal expression. *Biotechnology Advances* 28:427-435.

Harvey, D.J. 1999. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrometry Reviews* 18: 349-451

Hidalgo Morales, M.R. 2010. Tesis: Estudio transcripcional de las vías de N-glicosilación en células de ovario de hámster chino (CHO) cultivadas en condiciones de hipotermia moderada (30 y 32⁰C). Instituto de Biotecnología UNAM.

Huijan Li and Marc d'Anjou. 2009. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins *Current opinion in Biotechnology* 20: 678 -684

Jayapal, K.P., Wlaschin, K.F., Hij, W. and Yap, M.G. 2007. Recombinant Protein Therapeutics from CHO cells – 20 Years and Counting. CHO Consortium. Society Biological Engineering (SBE) Special Edition.

Jenkins, N., Parekh, R.B. and James, D.C. 1996. Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nature Biotechnology* 14: 975-981

Kaneko, Y., Sato, R. and Aoyagi, H. 2010. Changes in the quality of antibodies produced by Chinese hamster ovary cells during the phase of cell culture. *Journal of bioscience and Bioengineering* 109(3): 281-287

Kantardjieff, A., Jacob, N.M., Yee, J.C., Epstein, E., Kok, Y.J., Philip, R., Betenbaugh, M. and Hu, W.S. 2010. Transcriptome and proteome analysis of Chinese hamster ovary cells under low temperature and butyrate treatment. *Journal of Biotechnology* 145: 143-159

Kaufmann, H., Mazur, X., Fussenegger, M. and Bailey, J.E. 1999. Influence of Low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells *Biotechnol. Bioeng.* 63(5): 573-582

Keller N., Kiratli S., Roulin S., Spahr U., Leuenberger S., Spycher C., Dorsch K. and Jenal U. 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).

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H. and Matsudaira, P. 2004. Molecular Cell Biology. 5 th Edition. W.H. Freeman and Company

Mann, M., Hojrup, P. and Roepstorff, P. 1993. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases, *Biol. Mass Spectrom.* 22(6), 338

Meynial-Salles, I. and Combes, D. C. 1996. In vitro glycosylation of proteins: An enzymatic approach. *Journal of Biotechnology* 46: 1-14

Mori, K., Dwek, R.A., Downing, Kristina A., Opdenakker, G. and Rudd, P. M. 1995. The activation of type 1 and type 2 plasminogen by type 1 and type 2 tissue plasminógeno activator. *The Journal of Biological Chemistry* 270(7): 3261-3287

Otter, M., Barret-Bergshoeff, M. M. and Rijken, D.C. 1991. Binding of Tissue-type plasminógeno activator by the mannose Receptor. *The journal of Biological Chemistry* 266(21): 13931-13935.

Rodríguez J., Spearman M., Huzel N. and Butler M. 2005. Enhanced production of monomérica interferon- β by CHO cells throught the control of culture conditions. *Biotechnol. Prog.* 21: 22-30

Rudd, P.M., Woods, R.J., Wormald, M.R., Opdenakker, G., Downing, A.K., Campell, I.D. and Dwek, R.A. 1995. The effects of variable glycosylation on the functional activities of ribonuclease, plasminogen and tissue plasminógeno activator. *Biochim Biophys Acta* 1248(1): 1-10

Sandford, K.K., Earle, W.R., Evands, V.J., Waltz, H. and Shannon, J.E. 1951. The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. *J. Nat. Cancer Inst.* 11:773-795

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. 1996. Mass Spectrometric Sequencing of proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal. Chem.* 68: 850-858

Sorensen, H.P. and Mortensen, K.K. 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 4:1-10

Spellman, M.W., Basa, L.J., Leonard, C.K., Chakel, J.A. and O'Connor, J.V. 1989. Carbohydrate structures of human tissue plasminógeno Activator expressed in Chinese Hamster Ovary Cells. *The journal of Biological Chemistry* 264(24):14100-14111

Sunley, K. and Butler, M. 2010. Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. *Biotechnology advances* 28:385-394

Vandekerhove, J. 1996. Structural analysis and identification of gel-purified proteins, available in the femtomole range, using a novel computer program for peptide sequence assignment, by matrix-assisted laser desorption ionization-reflectron time-of-flight-mass spectrometry. *Electrophoresis*. 17(5), 918.

Wool, A and Smilansky, Z. 2002. Precalibration of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight spectra for peptide mass fingerprinting. *Proteomics*. 2(10):1365-73

Wurm, F.M. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology* 22: 11, 1393-1398.

Wurm, F.M. Hacker D.L., Rajendra, Y. and Kiseliak, D. 2011. Reduced glutamine concentration improves protein production in growth-arrested CHO-DG44 and HEK-293E cells. *Biotechnol Lett*. Nov 30, electronic publication

Yang, M. and Butler, M. 2002. Effects of Ammonia and glucosamine in the heterogeneity of erythropoietin glycoforms. *Biotechnol. Prog.* 18:129-138

Yoon, S. K., Kim, S.H. and Lee, G. M. 2003. Effect of low culture temperature on specific productivity and transcription level Anti-4-1BB antibody in recombinant Chinese hamster ovary cells. *biotechnol. Prog.* 19: 1383-1386

Yoon, S.K., Song, J.Y. and Lee, G.M. 2003. Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level and heterogeneity of erythropoietin in Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnol. Bioeng.* 82(3): 289-298

17. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de proteínas recombinantes en diferentes sistemas de Expresión	14
Figura 2. Tipos de N-glicosilación	18
Figura 3. Ruta de glicosilación y secreción de glicoproteínas	21
Figura 4. Estructura terciaria del activador del plasminógeno tisular	25
Figura 5. Estructura primaria del activador del plasminógeno tisular	26
Figura 6. Generación de las líneas celulares y desarrollo del proceso de cultivo para la generación de proteínas de interés	29
Figura 7. Estrategia experimental	35
Figura 8. Cinética de crecimiento de la línea celular CHO-TF70R	46
Figura 9. Viabilidad de los cultivos de la línea celular CHO-TF70R	47
Figura 10. Consumo específico de Glucosa en la línea CHO-TF70R	48
Figura 11. Escalera de enfriamiento de 37 °C a 30 °C	49
Figura 12. Gel bidimensional del medio de cultivo completo	50
Figura 13. Gel bidimensional de proteína citoplasmática de la línea CHO-TF70R	50
Figura 14. Gel bidimensional de proteína secretada de la línea CHO-TF70R	51
Figura 15. Comparación entre dos métodos de purificación de proteínas Glicosiladas	52
Figura 16. Gel con las fracciones pegadas, purificadas con el kit de QIAGEN	54
Figura 17. Gel con las fracciones no pegadas, purificadas con el kit de QIAGEN	54
Figura 18. Inmunodetección del activador del plasminógeno tisular	55
Figura 19. Gel con los cortes enviados a INMEGEN	57
Figura 20. Secuencia proteica del activador del plasminógeno tisular	57

18. INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de los diferentes sistemas de expresión	15
Tabla 2. Productos Biológicos Aprobados por la FDA en células CHO	15
Tabla 3. Efecto de la hipotermia moderada sobre la línea CHO-TF70R	32
Tabla 4. Programación de la primera dimensión en el PROTEAN IEF cells	41
Tabla 5. Porcentaje de recuperación con el kit de purificación Qproteome Mannose Glycoprotein de QIAGEN®	53
Tabla 6. Secuencias obtenidas por MALDI-TOF reportadas por IMEGEN	58