



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA**

**INGENIERÍA DE CÉLULAS CHO PARA METABOLISMO EN
GALACTOSA**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS DE LA
INGENIERÍA MENCIÓN QUÍMICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN
BIOTECNOLOGÍA**

NATALIA EUGENIA JIMÉNEZ TAPIA

**PROFESOR GUÍA:
DRA. ZIOMARA GERDTZEN HAKIM**

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
DRA. CLAUDIA ALTAMIRANO GÓMEZ
DRA. BARBARA ANDREWS FARROW
DRA. ORIANA SALAZAR AGUIRRE**

**SANTIAGO DE CHILE
MAYO 2013**

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL
TÍTULO DE:** Ingeniera Civil en Biotecnología y grado de
Magíster en Ciencias de la Ingeniería
Mención Ingeniería Química
POR: Natalia Eugenia Jiménez Tapia
FECHA: 27/05/2013
PROFESOR GUÍA: Ziomara Gerdtzen Hakim

Ingeniería de células CHO para metabolismo en galactosa

El cultivo de células animales ha cobrado gran importancia en la industria biotecnológica, dada su capacidad de producir proteínas recombinantes compatibles con su uso terapéutico en humanos. Este potencial ha motivado la búsqueda de estrategias para la optimización de los procesos cuyo objetivo es la síntesis de grandes cantidades de proteínas recombinantes con aplicaciones biomédicas.

Una de las estrategias utilizadas corresponde al cultivo en fuentes alternativas de carbono, tales como galactosa, las que al ser consumidas lentamente llevan a la obtención de un metabolismo más eficiente, con una reducción de la acumulación de metabolitos inhibitorios tanto del crecimiento celular como de la síntesis del producto. Sin embargo, se ha observado que estos cultivos presentan baja velocidad de crecimiento por lo que es necesario suplementar estos medios con glucosa o realizar modificaciones al metabolismo celular de forma de obtener cultivos con mayores rendimientos.

Para la obtención de una línea celular que presente un desempeño mejorado en cultivos con galactosa, se transfectaron células CHO de forma de sobre-exresar proteínas asociadas a pasos previamente reportados como limitantes del metabolismo de la galactosa, específicamente el transportador *Slc2a8* y galactoquinasa *Galk1*.

No se tuvieron resultados concluyentes con respecto a la sobre-expresión del transportador *Slc2a8*, debido a que el *pool* de clones obtenidos luego de la transfección no mantuvo su viabilidad durante tiempo suficiente para caracterizar su comportamiento en cultivo. Por otro lado, los resultados obtenidos mostraron que los clones seleccionados (CHO-Galk1) alcanzan mayor densidad celular en cultivos desarrollados en medio con glucosa y galactosa, además de ser capaces de crecer en un medio que sólo presenta galactosa, contrario a lo observado en la línea parental. Las células CHO-Galk1-2 presentan una mayor concentración de producto, llegando a sintetizar un 42% más de tPA que el control. El aumento más drástico de tasa de producción está asociado a la fase de crecimiento en galactosa.

Los resultados obtenidos para el metabolismo de glucosa del clon CHO-Galk1-2 presentan diferencias con respecto al cultivo control, por lo que se plantea que la sobre-expresión de este gen puede tener efectos positivos en el metabolismo de glucosa. El análisis de flujos metabólicos permite observar un metabolismo eficiente, centrado en la producción de energía, asociado a un alto flujo en el ciclo del TCA, producción de biomasa y producto.

Agradecimientos

Hay una parte de mi que no quiere creer que esto ya se terminó, se aferra a la idea de estar eternamente en este estado indefinido de no entregar, pero creo que ya es hora de dejarla ir y dejar de encontrar errores invisibles por corregir. Hay momentos que definen ciertas etapas, para mi esos instantes en medio del colapso, la frustración y más de alguna lágrima son los que te ayudan a crecer como persona y profesional, porque ¿Para qué hacer las cosas fáciles si existe un camino muchísimo más largo donde puedes aprender más? Son estas ocasiones en las que aparecen esas personas que entregan su apoyo ya sea con ideas, sugerencias y/o palabras de ánimo que te ayudan a seguir, estas mismas personas a las que está dedicada esta sección que empieza ahora.

No puedo imaginar finalizar esta etapa sin agradecer a Ziomara y la Cami, por todos sus consejos tanto profesionales como vocacionales y personales, y al resto del *team* de cultivo (Camilo, Ale, Alicia, Anita y Sergio). También a la gente con la que compartimos esas sobremesas interminables después del almuerzo, a la profesora Oriana por toda su ayuda en la parte molecular de este trabajo y a Claudia Altamirano y a Mauricio por su buena disposición en mis eternas visitas para medir en su laboratorio.

Muchísimas gracias a todos mis amigos por su apoyo incondicional, aunque muchas veces no entendieran de qué estaba hablando, por qué era bueno que vivieran y que murieran las células también. A la Java, por animarme y ayudarme en la vida, la Teté, amiga y compañera de oficina que me animaba a seguir, y Silvana, la compañera de colegio con la que comentábamos nuestras tesis aburriendo la resto.

Y finalmente, pero no menos importante, gracias a ti Carlos por ser mi mejor amigo, mi pilar y mi compañero. Por todos esos libros que leíste mientras contaba células, todas esas reuniones interrumpidas y mucho más, esto no habría sido posible sin presencia, paciencia, y apoyo.

PS: lo más probable es que haya olvidado a la mitad de la gente a la que debería estar aquí, pero en verdad hay que asumir que los agradecimientos de tu tesis son sólo una fotografía de lo que sientes en el momento en el que te sientas a escribir esto.

Tabla de Contenido

1	Introducción y Antecedentes Generales	1
1.1	Introducción	1
1.2	Antecedentes bibliográficos	1
1.2.1	Cultivo de células animales	1
1.2.2	Metabolismo celular	3
1.2.2.1	Metabolismo de lactato y <i>shift</i> metabólico	5
1.2.2.2	Estrategias e ingeniería celular	7
1.2.3	Metabolismo de la galactosa	8
1.2.3.1	Transportador de galactosa: GLUT8	8
1.2.3.2	Galactoquinasa: GALK1	10
1.2.4	Análisis de flujos metabólicos	10
1.3	Objetivos	12
1.4	Alcances	12
2	Materiales y Métodos	13
2.1	Metodología General	13
2.2	Materiales y Métodos	14
2.2.1	Materiales	14
2.2.1.1	Reactivos	14
2.2.1.2	Equipos	15
2.2.1.3	Materiales de laboratorio	16
2.2.1.4	Software	16
2.2.2	Vectores utilizados	17
2.2.2.1	pGEM T-easy	17
2.2.2.2	pcDNA 3.1	18
2.2.3	Preparación Constructos Genéticos	18
2.2.3.1	Galactoquinasa (GALK1)	18
2.2.3.2	Transportador GLUT8 (Slc2a8)	20
2.2.3.3	Purificación Final	21
2.2.4	Cultivo Celular	21
2.2.4.1	Adaptación a medio DMEM/F12 con bajo porcentaje de suero	22
2.2.4.2	Transfección y selección	22
2.2.4.3	Curvas de crecimiento	23
2.2.4.4	Determinación de metabolitos	24

2.2.5	Análisis de flujos metabólicos	24
2.2.5.1	Metabolismo de galactosa	25
2.2.5.2	Glucólisis	26
2.2.5.3	Ciclo de Krebs	26
2.2.5.4	Glutaminólisis	26
2.2.5.5	Síntesis y degradación de aminoácidos	26
2.2.5.6	Definición de molécula equivalente energética	28
2.2.5.7	Definición de reacción de síntesis de biomasa	28
2.2.5.8	Definición de reacción de síntesis de t-PA	28
2.2.5.9	Matriz estequiométrica	28
3	Resultados y discusión	30
3.1	Preparación Constructos Genéticos	30
3.1.1	Galactoquinasa Galk1	30
3.1.2	Transportador GLUT8	31
3.1.2.1	Diseño de partidores	31
3.1.2.2	Generación constructo pcDNA- <i>Slc2a8</i>	32
3.2	Curvas de crecimiento	32
3.2.1	Adaptación a medio bajo en suero	32
3.2.2	Comportamiento de células CHO tPA	33
3.2.3	Comportamiento de células transfectadas CHO-Galk1	34
3.2.3.1	Comportamiento de los clones seleccionados	37
3.2.3.2	Síntesis de producto recombinante (tPA)	40
3.2.4	Transportador de galactosa GLUT8 (<i>Slc2a8</i> y co-expresión <i>Galk1-Slc2a8</i>)	41
3.3	Análisis de flujos metabólicos	41
4	Conclusiones	47
	Referencias	49
	Anexos	55
A	Protocolos para la preparación de constructos genéticos	55
A.1	Digestiones y reacciones de PCR	55
A.2	Precipitación de DNA con Etanol frío	57
A.3	Cuantificación y pureza del DNA	57
B	Protocolos cultivo celular	58
B.1	Preparación de medio de cultivo	58
B.2	Subcultivos	58
B.3	Congelación de células	59
B.4	Descongelación de células	59
B.5	Determinación de densidad celular	60
B.6	Transfección con Lipofectamina 2000	60
B.7	Selección de clones mediante dilución al límite	61
B.8	Determinación de la concentración de t-PA por ELISA	62
B.9	Determinación de concentración de amino ácidos	63

C	Curva de crecimiento de células CHO tPA en medio CHOSFMII	69
D	Selección clones CHO-Galk1	70

Índice de Tablas

1.1	Procesos que utilizan líneas celulares animales	3
1.2	Algunos integrantes de la familia de transportadores GLUT.	9
3.1	Cálculo de μ_{\max} para cultivos con distintas concentraciones de suero fetal bovino	33
3.2	Parámetros μ_{\max} y $\Delta L/\Delta Hex$ para cultivos de células CHO tPA	33
3.3	Parámetros μ_{\max} y $\Delta L/\Delta Hex$ para cultivos utilizando el pool de células CHO-Galk1	36
3.4	Parámetros μ_{\max} y para cultivos de clones CHO Galk1 seleccionados	39
3.5	Cálculo de $\Delta L/\Delta Hex$ para cultivos de clones CHO Galk1 seleccionados	40
3.6	Tasas específicas para análisis de flujo metabólico	42
A.1	Digestión para la extracción del gen de la galactoquinasa (<i>Galk1</i>)	55
A.2	Ligación del gen <i>Galk1</i> con su vector de expresión	55
A.3	Reacción de PCR para la integración de sitios de restricción BamHI y XbaI en <i>Slc2a8</i>	56
A.4	Ligación de <i>Slc2a8</i> a PGEMT-easy	56
A.5	Protocolo para incorporación de mutaciones en <i>Slc2a8</i> utilizando KOD polimerasa	56
A.6	Digestión de PGEMT- <i>Slc2a8</i> -SR-Mut y pcDNA zeo	57
A.7	Ligación <i>Slc2a8</i> -SR-Mut a pcDNA zeo (1 hr a 23°C)	57
B.8	Composición de <i>buffers</i> de la fase móvil para HPLC	65

Índice de Figuras

1.1	Reacciones del metabolismo celular	4
1.2	Metabolismo de glutamina	5
1.4	Vía de Leloir	8
1.5	Modelo esquemático de la estructura de GLUT8.	9
2.1	Metodología general	13
2.2	Esquema del vector pGEMT-easy	17
2.3	Esquema de los vectores pcDNA 3.1(+)	18
2.4	Metodología general generación constructo Galk1	19
2.5	Metodología general generación constructo <i>Slc2a8</i>	20
2.6	Red metabólica a utilizar para el análisis de flujos metabólicos	25
3.1	Generación del constructo Galk1-pcDNA3.1	30
	(a) Digestión para la liberación del gen	30
	(b) Digestión para verificar la existencia del inserto en los clones obtenidos	30
3.2	Generación del constructo pcDNA- <i>Slc2a8</i>	32
	(a) Reacción de PCR para integración de sitios de restricción BamHI, XbaI	32
	(b) Digestión para verificar la existencia del inserto en los clones obtenidos	32
3.3	Curva de crecimiento de células CHO tPA en medio Glc20, GG6/14 y Gal20	34
	(a) Densidad celular	34
	(b) Concentración de glucosa y lactato	34
3.4	Curva de crecimiento de <i>pool</i> de clones Galk1 en medio GG6/14	34
	(a) Densidad celular	34
	(b) Concentración de glucosa y lactato	34
3.5	Curva de crecimiento de <i>pool</i> de clones Galk1 en medio Gal20	36
	(a) Densidad celular	36
	(b) Concentración de galactosa y lactato	36
3.6	Curvas de crecimiento para clones CHO-Galk1 seleccionados en medio GG6/14	37
	(a) Densidad celular	37
	(b) Concentración de galactosa y lactato	37
3.7	Curvas de crecimiento para clones Galk1 seleccionados en medio Gal20 . . .	39
	(a) Densidad celular	39
	(b) Concentración de galactosa y lactato	39
3.8	Producción de tPA para CHO-Galk1-2 y CHO tPA	40
	(a) Concentración en cultivo	40

(b) Productividad específica	40
3.9 Análisis de flujos metabólicos	43
B.1 Dilución al límite	62
B.2 Botón <i>Mobile Phase Setup</i>	66
B.3 Ventana <i>Autopurge</i>	66
B.4 Botón <i>Autopurge</i>	67
B.5 Cambio de Bomba A a Bomba B	67
B.6 Ilustraciónb de la llave del equipo abierta y cerrada	67
B.7 Botón <i>Shutdown</i>	68
C.1 Curva de crecimiento en medio CHOSFMII	69
(a) Densidad celular	69
(b) Concentración de glucosa y lactato	69
D.1 Selección de clones Galk1: Minimización de ΔL /célula	70
D.2 Selección preliminar de clones Galk1: Maximización de densidad celular . . .	70
D.3 Perfiles de galactosa, glucosa y lactato para clones seleccionados en medio GG6/14	71
(a) Concentración de lactato	71
(b) Concentración de glucosa y galactosa	71
D.4 Perfiles de galactosa y lactato para clones seleccionados en medio Gal20 . . .	71
D.5 Relación entre la tasa específica de producción de tPA y la velocidad de crecimiento para control y clon seleccionado	72

Nomenclatura

α KG α cetoglutarato

μ Tasa específica de reproducción celular

μ_{\max} Tasa específica de reproducción celular en etapa de crecimiento exponencial

S Matriz estequiométrica

X Vector de las concentraciones de metabolitos

X_v Número de células vivas

AcCoA Acetil Coenzima A

Ala Alanina

Arg Arginina

Asn Asparragina

Asp Ácido Aspártico

Cys Cisteína

Fum Fumarato

Gal Galactosa

Gal_{ext} Galactosa extracelular

Gal_{in} Galactosa intracelular

Glc Glucosa

Gln Glutamina

Glu Glutamato

Gly Glicina

Hex Hexosa

His	Histidina
Ile	Isoleucina
Lac	Lactato
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Mal	Malato
Met	Metionina
OAA	Oxaloacetato
Phe	Fenilalanina
Pi	Grupo fosfato
Pro	Prolina
Pyr	Piruvato
q_c	Tasa específica de consumo
q_p	Tasa específica de producción
Ser	Serina
SucCoA	Succinil CoA
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
V	Volumen
Val	Valina
X	Densidad celular

1 | Introducción y Antecedentes Generales

1.1 Introducción

En la industria biotecnológica, la tecnología del ADN recombinante marcó un antes y un después permitiendo la producción de proteínas recombinantes con diversas aplicaciones, tales como las asociadas a la industria del papel, alimenticia y su aplicación terapéutica, entre otras. Esta última ha generado un gran interés en las últimas décadas. Desde su desarrollo entre 1970 y 1980, con la producción de la insulina recombinante en *Escherichia coli* esta tecnología, por la necesidades del mercado, ha evolucionado al uso de otros sistemas de expresión tales como las células animales.

Actualmente el 60% de las proteínas recombinantes son producidas en células animales (Matasci et al., 2008). Esto se debe a su habilidad de sintetizar proteínas con propiedades bioquímicas similares a las expresadas en humanos. La línea celular CHO (*Chinese Hamster Ovary*) fue el primer huésped utilizado para la producción de estos productos, tales como interferones y tPA (*tissue type Plasminogen Activator*), la que consiste en la primera proteína recombinante con aplicación terapéutica aprobada por la FDA en este sistema de expresión (Hacker et al., 2009).

La creciente demanda por estos productos fomenta la búsqueda de metodologías que permitan la obtención de mayores rendimientos a un menor costo. Una de estas es la Ingeniería Celular, donde se han realizado modificaciones al metabolismo de distintas fuentes de carbono de forma de cumplir con este objetivo (Chen et al., 2001; Irani et al., 2002).

1.2 Antecedentes bibliográficos

1.2.1 Cultivo de células animales

El cultivo de células animales se inició a principios del 1900 con el interés por el estudio del comportamiento de células aisladas, libres de variaciones asociadas a un organismo completo. Originalmente consideraba el uso de fragmentos de distintos tejidos para su estudio, sin embargo el cultivo de células dispersas provenientes de estos explantes derivó en

lo que se conoce hoy como cultivo celular (Freshney, 1998).

Actualmente existen diversas líneas de investigación asociadas a este campo:

- **Actividad intracelular:** estudios de: síntesis de proteínas, transcripción del ADN, metabolismo energético, metabolismo de drogas, ciclo celular, diferenciación y apoptosis.
- **Flujos intracelulares:** ARN, receptores de hormonas, flujos metabólicos, transducción de señales.
- **Interacción con el medio extracelular:** Nutrición, infección, citotoxicidad, carcinogénesis, mecanismos de acción de drogas e interacciones ligando-receptor.
- **Interacción célula-célula:** morfogénesis, control paracrino, cooperación metabólica, adhesión celular y movilidad.
- **Productos celulares:** diseño de bioreactores para su uso con células animales, *downstream processing*, uso productos de secreción en la industria.
- **Genómica:** análisis genéticos en condiciones normales y patológicas, manipulación genética, infección.
- **Farmacología:** estudios en mecanismos de acción, receptor ligando, metabolismo de drogas, resistencia de drogas (Freshney, 1998).

Aún cuando la tecnología del ADN recombinante se desarrolló en la década de 1980, el primer producto con orientación terapéutica sintetizado en células animales corresponde a la vacuna contra el polio, producida en 1949 en la línea celular HeLa la cual era sometida a la acción del virus para la producción de esta vacuna (Enders et al., 1949).

Posteriormente, Earle y Eagle estudiaron los requerimientos nutricionales de las líneas celulares *in vitro*, definiendo en 1955 el medio de cultivo conocido como EMEM (*Eagle's minimum essential media*, medio esencial de Eagle) el que reemplazó a los fluidos biológicos utilizados hasta ese entonces, teniendo como única limitación el requerimiento de la adición de suero, cuya composición no está completamente definida (Eagle, 1955). Adicionalmente, Eagle estudió el uso de fuentes alternativas de carbono en cultivos de células animales, encontrando que tanto fructosa como maltosa y manosa son capaces de sustituir a glucosa en medios de cultivo. No así galactosa y D-ribosa, sobre las cuales no se encontraron resultados concluyentes (Eagle et al., 1958).

Estos hechos junto con la aparición de líneas celulares y el desarrollo de la técnica del hibridoma, donde la fusión de linfocitos con células de mieloma permitió la producción industrial de anticuerpos monoclonales con fines diagnósticos (Köhler & Milstein, 1975) fomentaron el desarrollo del uso de células animales en la industria biotecnológica.

Fue a principios de la década de 1980 cuando surge un nuevo producto en la industria farmacéutica: las proteínas recombinantes, siendo la insulina la primera producida a gran escala con orientaciones terapéuticas en 1982, la cual fue expresada en *Escherichia coli* debido a su gran velocidad de crecimiento. Posteriormente, motivados por la complejidad de las moléculas requeridas y por la necesidad de modificaciones post-traduccionales, se optó por el uso de líneas celulares animales para estos fines (Butler, 2005). La primera proteína recombinante con orientación terapéutica producida en células animales fue el activador tisular del plasminógeno (tPA), proteína utilizada para disolver coágulos sanguíneos utilizada como tratamiento de infartos cardíacos, y que es producida naturalmente por células animales en muy bajas concentraciones. Al insertar el gen humano que codifica para esta proteína en células CHO se obtienen rendimientos de $50 \text{ mg } 10^9 \text{ células}^{-1} \text{ día}^{-1}$ o incluso mayores (Kretzmer, 2002).

Actualmente, las células animales son utilizadas para la producción de distintas proteínas con aplicaciones terapéuticas (Tabla 1.1), en particular las células CHO se han convertido en uno de los sistemas de expresión estándares para la producción de éstas, dado que se manejan técnicas que permiten la transfección, amplificación y selección de clones productores (Butler, 2005). A pesar de todo esto, el crecimiento de células animales es un proceso complejo debido a que éstas son altamente sensibles a cambios en el ambiente tales como el pH, la temperatura, concentración de oxígeno disuelto y osmolalidad (Chen et al., 2001; Duval et al., 1991; Miller et al., 1988; Ozturk & Palsson, 1990).

Tabla 1.1: Procesos que utilizan líneas celulares animales (Hu, 2011).

Línea celular	Producto	Año de aprobación para su producción
CHO	tPA	1987
CHO	EPO	1989
CHO	Deoxiribonucleasa I	1993
CHO	Interferon- β	1996
CHO	Hormona folículo estimulante	1997
CHO	Anti-TNF- α mAb	2002
CHO	Hormona luteinizante	2004
NS0	Anticuerpo subunidad α receptor IL-2 de células T	1997
Hibridoma	Muromomad CD3	1986
SP2/0	Anti-TNF- α -mAb	1998

1.2.2 Metabolismo celular

Las principales fuentes de carbono utilizadas en el cultivo de células animales son glucosa y glutamina (Figura 1.1). La primera es oxidada en el citoplasma para generar dos moles de piruvato en una serie de reacciones conocidas como glucólisis, cuya ecuación neta corresponde a:

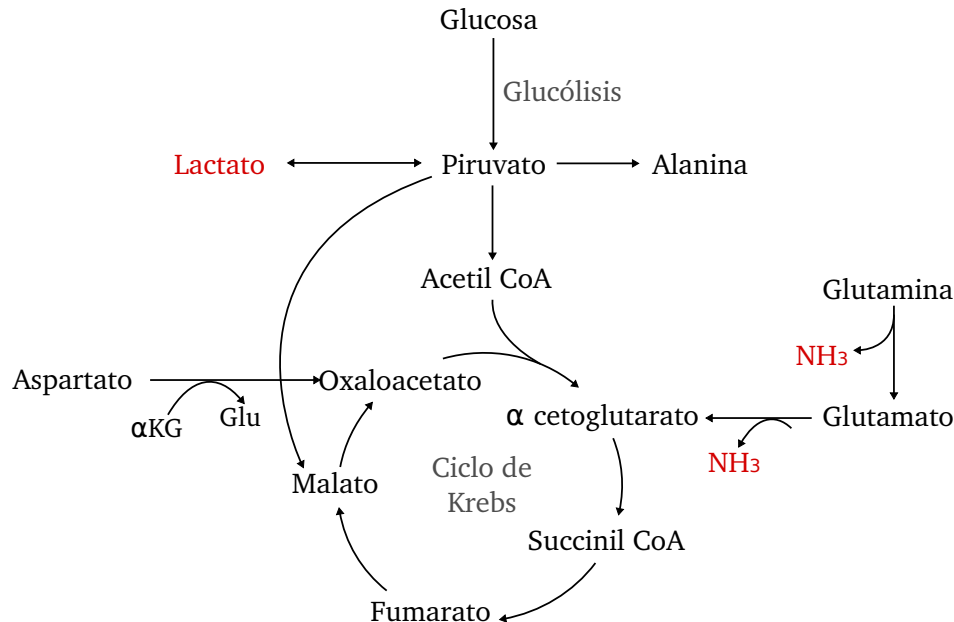


Figura 1.1: Reacciones del metabolismo central de glucosa y glutamina. Adaptado de Glacken et al. (1986).

El rendimiento¹ de la glucosa es dependiente de los productos finales del catabolismo de esta fuente de carbono. Si piruvato es reducido a lactato mediante la acción de la lactato deshidrogenasa (LDH), sólo 2 moles de ATP son producidos por cada mol de glucosa consumido. Adicionalmente piruvato puede ingresar al ciclo de Krebs (o ciclo de TCA en la mitocondria) produciendo 36 moles de ATP por cada mol de glucosa consumido (Glacken et al., 1986; David L. Nelson, 2008).

Por otro lado glutamina, además de consistir en una fuente de carbono, aporta el grupo amino para la síntesis de ácidos nucleicos. Su rendimiento es variable dependiente del grado de oxidación alcanzado: si es oxidada a CO₂ (oxidación completa) otorga 21 moles de ATP por cada mol de glutamina consumido, en cambio si su oxidación es incompleta puede llegar a producir 12 moles de ATP/mol consumido de glutamina para el caso de aspartato o 6 si es oxidada a lactato (Glacken et al., 1986; Hu, 2011) (Figura 1.2).

Ambas fuentes de carbono son metabolizadas ineficientemente conduciendo a la acumulación de metabolitos secundarios. Para el caso de glucosa, un alto flujo en la glucólisis produce un exceso de piruvato que no ingresa al ciclo de Krebs para la producción de energía, sino que es reducido para formar lactato; mientras que glutamina al ser metabolizada libera grandes cantidades de amonio. Adicionalmente, su consumo se traduce en un agotamiento rápido de los nutrientes presentes en el medio, factores que en conjunto contribuyen a la muerte celular (Hassell et al., 1991; Omasa et al., 1992; Glacken et al., 1986).

¹Producción de ATP por mol de fuente de carbono consumida

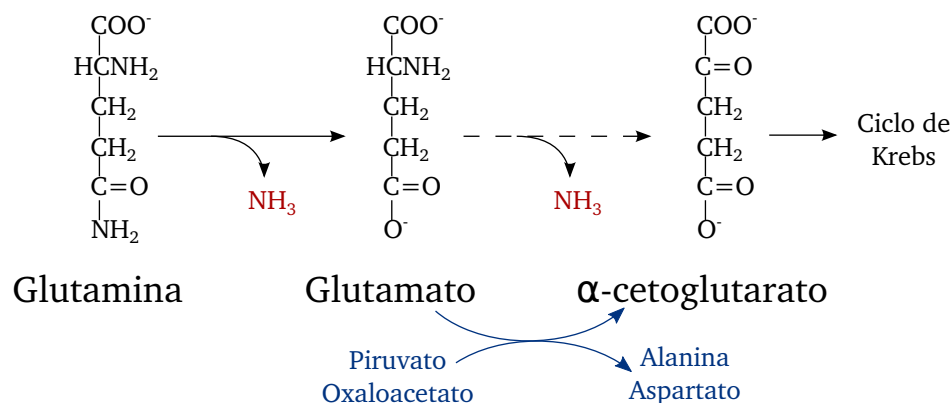


Figura 1.2: Algunas reacciones del metabolismo de la glutamina. Adaptado de (Hu, 2011).

1.2.2.1 Metabolismo de lactato y *shift* metabólico

El efecto perjudicial de la acumulación de lactato se ha evidenciado en distintas líneas celulares. Así, se ha observado en cultivos que presentan concentraciones de este metabolito superiores a 18 [mM] una reducción en: la tasa específica de crecimiento (Omasa et al., 1992), su densidad celular y rendimiento en la producción de proteínas recombinantes (Glacken et al., 1986; Chen et al., 2001; Gambhir et al., 2003).

Su producción está directamente relacionada con un alto flujo metabólico a través de la glucólisis (ver Figura 1.1). Allí el exceso de piruvato debe ser transformado en lactato para regenerar el NAD usado en el metabolismo de glucosa. Esta reacción, catalizada por la enzima lactato dehidrogenasa (LDH), es reversible y su dirección está ligada a diversos factores entre los cuales se encuentra el balance entre NADH y NAD. El cambio de dirección de esta reacción hacia el consumo de lactato es conocido como *shift* metabólico, fenómeno que se asocia a fases de baja velocidad de crecimiento donde glucosa es consumida pero a bajas tasas (Hu, 2011; Korke et al., 2004).

Para caracterizar el estado metabólico en el cual se encuentra la célula se utiliza el parámetro $\Delta L/\Delta G$, el que indica cuantos moles de lactato son producidos al consumir 1 mol de la fuente de carbono utilizada en el cultivo en estudio, la que generalmente es glucosa. Un valor positivo indica que hay producción de lactato, mientras que un $\Delta L/\Delta G$ negativo se asocia al consumo de este metabolito (Europa et al., 2000).

Se han realizado diversos estudios con respecto a los fenómenos que ocurren dentro de la célula en el transcurso de la etapa de producción a consumo de lactato, particularmente con respecto a la redistribución de flujos en las distintas vías involucradas en el metabolismo de las fuentes de carbono. Piruvato es uno de los principales puntos de interés, dado que este compuesto es el vínculo entre la glicólisis y el ciclo de Krebs, además de estar directamente relacionado con la producción de lactato y alanina (Gambhir et al., 2003). En particular se ha encontrado que existe una relación directa entre bajos flujos a nivel de glicólisis y el ciclo de Krebs, con el nivel de expresión génica de las enzimas involucradas en estas vías (Korke et al., 2004). Este fenómeno también ha sido abordado desde el enfoque de la proteómica,

comparando perfiles obtenidos a partir de células en distintos estados metabólicos, de lo que se ha comprobado que la enzima enolasa, involucrada en penúltimo paso de la glucólisis disminuye su concentración luego de que se produce un *shift* metabólico (Pascoe et al., 2007).

Adicionalmente, se ha encontrado que tanto en células CHO como en células humanas, este *shift* metabólico se produce al realizar cultivos en medios con fuentes combinadas de carbono tales como glucosa y galactosa. En estos cultivos glucosa es consumida inicialmente, etapa en la cual lactato es producido y posteriormente consumido en la fase de crecimiento en galactosa; con lo que se obtienen cultivos con viabilidad extendida (Figura 1.3) (Neermann & Wagner, 1996; Altamirano et al., 2006; Wilkens et al., 2011).

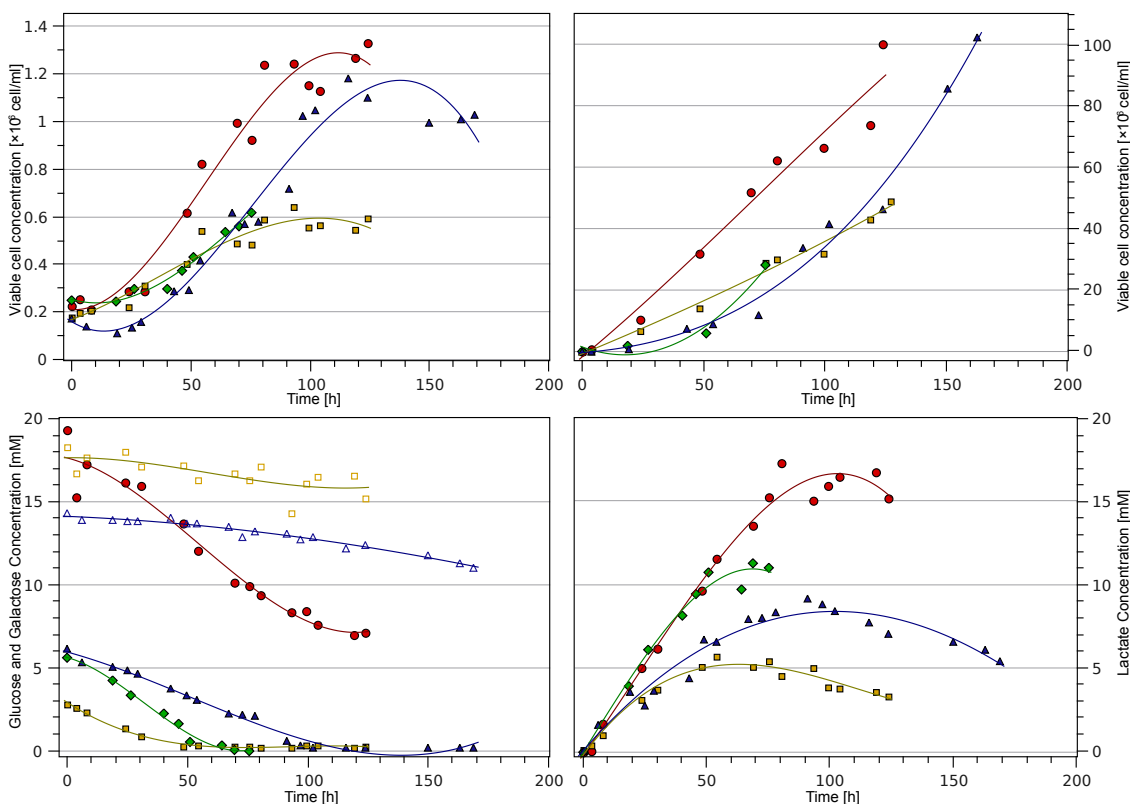


Figura 1.3: Curvas de crecimiento de células CHO en cultivo *batch* a distintas concentraciones de glucosa y galactosa: Glc 20 mM (●), Glc 6 mM Gal 14 mM (▲), Glc 2 mM Gal 18 mM (■) y Glc 6 mM (◆) (Wilkens et al., 2011).

En cultivos de fuentes de carbono combinadas (Figura 1.3) (Wilkens et al., 2011) los transportadores de galactosa ingresan este azúcar a una baja velocidad de forma de que se hace necesaria la incorporación de lactato para satisfacer las necesidades del metabolismo. El transporte, además de ser beneficioso dado que disminuye su concentración en el medio, influye aumentando el pH debido a que se co-transporta un protón (H^+) con lo que se revierte el efecto negativo que posee lactato sobre el pH del cultivo. Mediante la acción de la lactato dehidrogenasa (LDH) este metabolito inhibitorio puede ser utilizado como sustrato para la

síntesis de piruvato, el que reingresa al ciclo de Krebs; adicionalmente el flujo a través de malato y piruvato disminuye de forma de minimizar los carbonos que salen del ciclo (ver Figura 1.1) y la producción de biomasa baja considerablemente. Con lo que el metabolismo se centra en su mantención, por lo que se observan bajas velocidades de crecimiento (μ) para la etapa de crecimiento en galactosa (Wilkins et al., 2011).

1.2.2.2 Estrategias e ingeniería celular

Dada la gran importancia comercial de los productos sintetizados en el área de cultivo se han diseñado distintas estrategias para la mejora de los rendimientos obtenidos: el tratamiento de las células con butirato de sodio (Hendrick et al., 2001; Kim & Lee, 2000, 2002; Laubach et al., 1996), el uso de *shift* de temperatura para la sobre-expresión de proteína recombinante (Hendrick et al., 2001; Moore et al., 1997; Kaufmann et al., 1999). En particular, existe una gran variedad de estrategias orientadas a la reducción de metabolitos secundarios tales como el uso de modalidades de cultivo *fed-batch* donde glucosa o glutamina son agregados al medio a medida que este transcurre de forma de mantener bajas concentraciones y, como consecuencia, bajas tasas de consumo de estos metabolitos (Ljunggren & Häggström, 1994; Xie & Wang, 1994; Bibila & Robinson, 1995; Zhou et al., 1997, 1995) y la reformulación de medios de cultivo en búsqueda de fuentes de carbono cuyo consumo sea más eficiente que el de glucosa (Altamirano et al., 2000, 2006).

Fuentes de carbono como galactosa y fructosa son metabolizadas eficientemente conduciendo a una menor acumulación de metabolitos secundarios a un costo menor, debido a que no se incurre en gastos de instrumentación y alteraciones mayores en el proceso de producción. Como se mencionó anteriormente, se ha observado que el uso de galactosa y glutamato como componentes principales del medio producen una reducción de metabolitos inhibitorios dado que presentan menores tasas de consumo que glucosa y glutamina. Además, el lactato producido en el crecimiento en este azúcar es re-metabolizado por las células ingresando al ciclo de krebs (*shift* metabólico). Sin embargo, en estos cultivos se observan menores velocidades de crecimiento, las que finalmente se traducen en una productividad similar (Altamirano et al., 2004; Wilkins et al., 2011).

Existen distintos enfoques que han sido utilizados para mejorar el rendimiento de estos cultivos que corresponden a modificar los niveles de expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de distintas fuentes de carbono: la ingeniería de hibridomas y mielomas con el gen de la glutamina sintetasa de forma que las células puedan crecer en base a glutamato, el cual, al contrario de glutamina, es consumido eficientemente (Bibila & Robinson, 1995); la sobre-expresión de la enzima piruvato carboxilasa en células BHK-21 permite aumentar el flujo de carbonos entre la glucólisis y el ciclo de krebs (Irani et al., 2002); y el *knock-out* de una isoforma de la lactato dehidrogenasa (LDH) enzima encargada de la producción de lactato a partir de piruvato (Chen et al., 2001).

Adicionalmente, se han implementado estrategias para mejorar el metabolismo de fuentes alternativas de carbono, de forma de llegar a un punto intermedio entre el caso base y el metabolismo de glucosa el cual es indeseable debido a su ineficiencia reflejada en las

altas tasas de consumo de esta fuente de carbono, lo que genera un agotamiento rápido de esta fuente de energía y una gran acumulación de lactato en el medio de cultivo. Una de ellas corresponde a la expresión del transportador de fructosa GLUT5 en células CHO con el fin de aumentar la disponibilidad de este azúcar a nivel intracelular y optimizar su desempeño disminuyendo la concentración de lactato, obteniéndose clones que alcanzan mayores densidades celulares en cultivo (Wlaschin & Hu, 2007).

1.2.3 Metabolismo de la galactosa

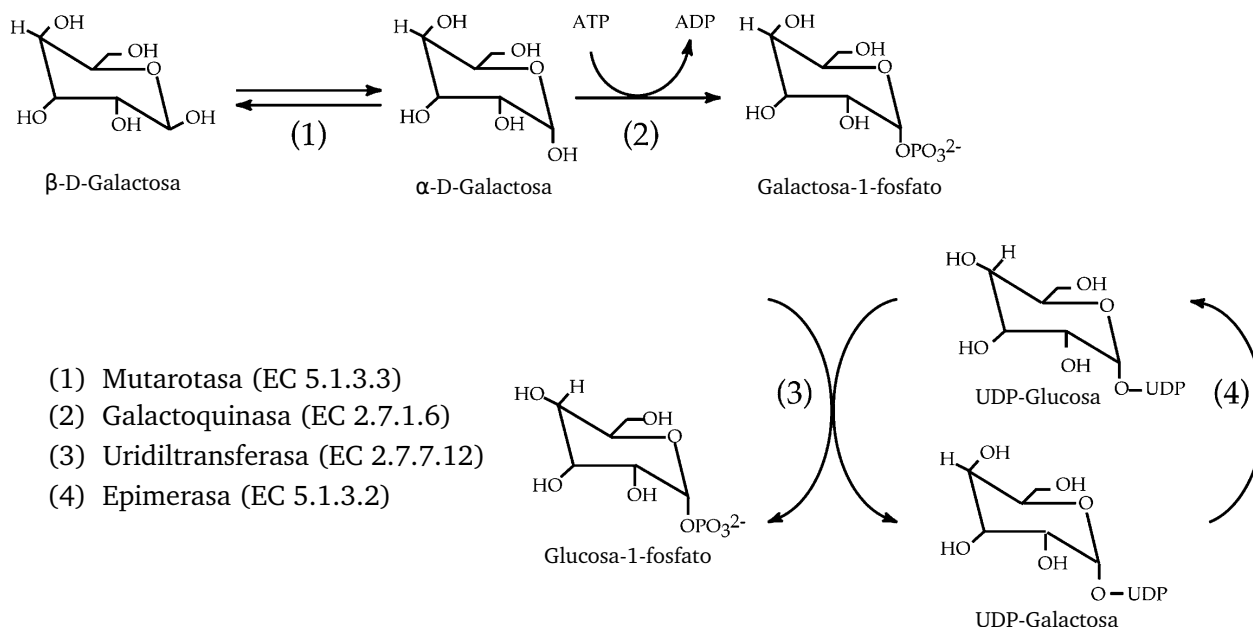


Figura 1.4: Vía de Leloir. Adaptado de Holden et al. (2004).

En la mayoría de los organismos, incluyendo las células CHO, la conversión de β -D-galactosa a glucosa-1-fosfato, es llevada a cabo por la acción de cuatro enzimas que constituyen la vía de Leloir (Figura 1.4) (Holden et al., 2004).

Existen dos puntos en la metabolización de este azúcar que han sido señaladas como etapas limitantes: el transporte de galactosa al interior de la célula (Craik & Elliott, 1980), y la acción de la galactoquinasa, encargada de catalizar la conversión de α -D-galactosa a galactosa-1-fosfato (Keiding, 1973) (Reacción 2, Figura 1.4).

1.2.3.1 Transportador de galactosa: GLUT8

Al igual que la glucosa y la fructosa, la galactosa es incapaz de difundir a través de la membrana celular, por lo que requiere de transportadores para ello. La familia de transportadores GLUT (Tabla 1.2) permite el traslado de distintos azúcares utilizando el

gradiente de concentración como fuerza impulsora, siendo la mayoría de ellos es capaz de transportar más de un azúcar.

Tabla 1.2: Algunos integrantes de la familia de transportadores GLUT (for Biotechnology Information, 2011).

Nombre	Sustrato(s)
GLUT 1	Glucosa
GLUT 2	Glucosa, fructosa
GLUT 3	Glucosa (alta afinidad)
GLUT 4	Glucosa (alta afinidad)
GLUT 5	Fructosa
GLUT 8	Glucosa, fructosa, galactosa
GLUT 9	Glucosa, fructosa
GLUT 10	Glucosa, galactosa

Esta familia de transportadores puede ser subdividida en clases basándose en su estructura. En la clase 1 se encuentran transportadores asociados al transporte de glucosa (GLUT1-4); los transportadores de clase 2 están caracterizados por la carencia de un triptófano en la posición 388 (GLUT5); y los transportadores de clase 3 (GLUT6, 8, 10 y 12) poseen una serie de características estructurales en común (Figura 1.5) (Uldry & Thorens, 2004).

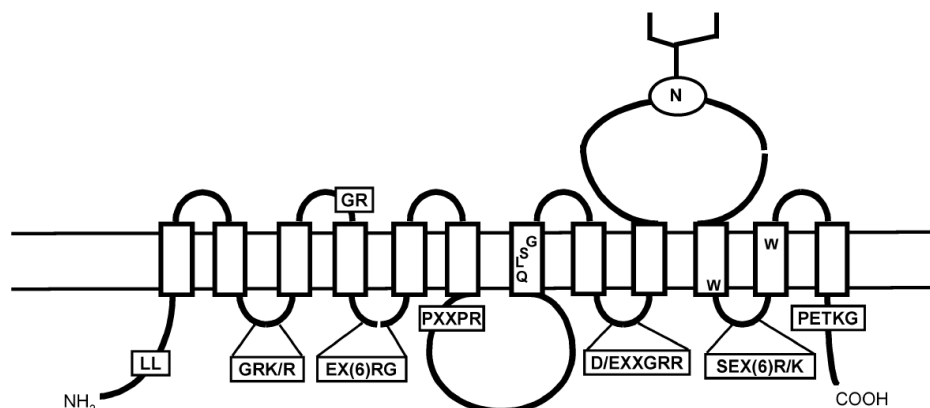


Figura 1.5: Modelo esquemático de los transportadores de la familia GLUT clase 3 (Uldry & Thorens, 2004).

El transportador GLUT8 (codificado por el gen *Slc2a8*) es capaz de transportar glucosa (k_m 2 mM); siendo la actividad transportadora de este azúcar inhibida por la presencia de otras que este transporta, tales como fructosa y galactosa (Schmidt et al., 2009). Su secuencia aminoacídica posee un conjunto de elementos comunes a su clase tales como 12 hélices que atraviesan la membrana donde este se ubica, residuos de glutamato y arginina

en los *loops* 4 y 10, y los motivos PESPR y PETKG en después de las hélices 6 y 12 respectivamente; entre otros (Figura 1.5) (Doege et al., 2000; Scheepers et al., 2004).

Adicionalmente, GLUT8 posee un motivo de dileucina en su extremo amino que dirige su expresión a un nivel intracelular. En particular se ha encontrado que para células CHO la ubicación de este transportador es a nivel lisosomal (Augustin et al., 2005). Trabajos posteriores en este ámbito encontraron que una mutación de este motivo, cambiando las leucinas por alaninas, permite la expresión de este transportador a nivel de la membrana plasmática (Ibberson et al., 2000; Lisinski et al., 2001; Schmidt et al., 2006; Flessner & Moley, 2009).

1.2.3.2 Galactoquinasa: GALK1

La galactoquinasa es la enzima requerida para catalizar la reacción que tiene como sustrato a α -D-galactosa y producto a galactosa-1-fosfato, siendo de gran interés científico por su importancia en el desarrollo de enfermedades tales como la galactosemia (Holden et al., 2004). Su mecanismo catalítico requiere de la unión de una molécula de ATP para la fosforilación del sustrato, cuya especificidad varía dependiendo del organismo de origen de esta proteína. En particular para *S. cerevisiae* se posee un gran nivel de especificidad sin habilidad de catalizar la fosforilación de glucosa, manosa, galactitol, arabinosa, fucosa, lactosa e incluso 2-deoxi-D-galactosa que sí es utilizado como sustrato para la enzima extraída de hígado de ratón (Schell & Wilson, 1979; Walker & Khan, 1968).

1.2.4 Análisis de flujos metabólicos

El análisis de flujos metabólicos (*Metabolic flux analysis: MFA*) es una herramienta que permite caracterizar el estado en que se encuentra la célula a partir de la distribución de flujos en sus vías metabólicas. Este tipo de análisis es utilizado generalmente en términos comparativos al contrastar dos distribuciones de flujo obtenidas en distintas condiciones ambientales o cepas en cultivo, por ejemplo. Así es posible evaluar el impacto de perturbaciones genéticas y ambientales en el metabolismo celular (Gregory N. Stephanopoulos, 1998).

La distribución de flujos es calculada a partir de un modelo estequiométrico y balances de masas efectuados sobre los metabolitos involucrados en las reacciones del metabolismo en estudio. Para ello todas las reacciones involucradas en el modelo de estudio son representadas en una matriz estequiométrica (S), en la que cada columna corresponde a una reacción y cada fila a un metabolito. Adicionalmente, los flujos que consideran transporte a través de la membrana celular son llamados flujos externos, y las reacciones que ocurren en el medio intracelular son llamadas flujos internos. Una de las principales características de los sistemas metabólicos analizados es que el número de reacciones en general es mayor que el número de compuestos. Así, se tiene el siguiente balance de masa para cada uno de los compuestos representados en el siguiente sistema de ecuaciones

$$\frac{dX}{dt} = S \cdot v - b \quad (1.2)$$

donde X es el vector de las concentraciones de metabolitos, S es una matriz de $n \times m$ llamada matriz estequiométrica, n es el número de metabolitos, n es el número de reacciones, v es el vector de los m flujos existentes en la red, y b es el vector de tasas conocidas de producción y consumo. Suponiendo un estado pseudoestacionario se obtiene lo siguiente:

$$S \cdot v = b \quad (1.3)$$

Este sistema tiene solución si todas las ecuaciones que lo conforman son linealmente independientes; es decir: ninguna de ellas corresponde a una combinación lineal de las filas de la matriz. Para comprobar esto es necesario calcular el rango de la matriz: si la matriz posee rango completo (igual a n) esta es invertible; sin embargo si el rango resulta ser menor a n nos encontramos en un sistema subdeterminado. Esto sucede cuando:

1. Existe un conjunto de reacciones cuyas estequiometrías son linealmente dependientes. Para este caso es necesario eliminar todas las reacciones que cumplan esta condición o incluir información adicional para la resolución del sistema.
2. Otra alternativa es que algunos flujos medidos sean redundantes, por lo que es necesario variar qué flujos se medirán para la realización de este análisis.

Por otro lado, un sistema puede ser sobre o sub determinado, es decir, poseer más o menos ecuaciones que incógnitas respectivamente. Para el primer caso se tiene una mayor cantidad de flujos medidos que grados de libertad del sistema. Para este caso la matriz estequiométrica (S) no es cuadrada, por lo que no es invertible. En este caso es necesario calcular una pseudoinversa mediante la regresión lineal de mínimos cuadrados, es decir:

$$S^{-1} \approx (S^T S)^{-1} S^T \quad (1.4)$$

La pseudoinversa definida en la Ecuación 1.4 corresponde, además a la matriz de sensibilidad del sistema. Esta matriz muestra cómo afecta un error en la medición de las tasas específicas medidas en la resolución del sistema.

Por otro lado, si el número de flujos medidos es menor que los grados de libertad del sistema, nos encontramos con un sistema sub determinado. La resolución de este tipo de sistemas está dada por el uso de programación lineal y otros métodos de optimización (Gregory N. Stephanopoulos, 1998).

El análisis de flujos metabólicos ha sido utilizado, por distintos autores, para el estudio del metabolismo de células animales y su aplicación en la industria farmacéutica (Boghigian et al., 2010). En particular, se ha usado esta técnica para comparar la distribución de flujos en células CHO productoras de tPA entre una etapa caracterizada por el consumo de glucosa y producción de lactato y una segunda fase donde existe consumo de galactosa y lactato simultáneamente (Altamirano et al., 2006; Wilkens et al., 2011). También se ha utilizado para el estudio de la producción de IgG por células de hibridoma en distintos estados metabólicos definidos por distintos valores de $\Delta L/\Delta G$ (Europa et al., 2000), entre otras aplicaciones.

1.3 Objetivos

Principal

Estudiar la influencia de la enzima galactoquinasa (GALK1) y el transportador de galactosa (GLUT8) en el crecimiento y producción de proteína recombinante en células CHO productoras de tPA (CHO tPA).

Específicos

1. Caracterizar la dinámica del crecimiento de CHO tPA en medio a distintas concentraciones de glucosa y galactosa.
2. Estudiar el efecto de la sobre-expresión individual de GALK1 y GLUT8 en la dinámica de crecimiento.
3. Estudiar el efecto de la sobreexpresión de los genes mencionados en la producción de la proteína recombinante (tPA).
4. Comparar el efecto de las perturbaciones realizadas en el estado metabólico de la célula mediante análisis de flujos metabólicos (MFA).

1.4 Alcances

Los alcances de este trabajo contemplan el diseño y la generación de líneas celulares que sobre-expresen el gen de la galactoquinasa y el transportador de galactosa de forma de optimizar el crecimiento en medios con galactosa. Para ello se caracterizará el estado metabólico de los clones obtenidos mediante la realización de curvas de crecimiento y la medición de metabolitos tales como glucosa, galactosa y lactato.

Los conocimientos generados podrían ser de gran impacto a la industria de producción de biofármacos, debido a que soluciona una problemática presente en esta área: la acumulación de metabolitos inhibitorios, tales como el lactato, que afectan la productividad de estos procesos.

Además, entregará mayor información sobre la utilización de fuentes de carbono alternativas en la producción de proteínas recombinantes en células animales a nivel metabólico, lo que podría sugerir nuevas modificaciones a nivel de ingeniería celular.

2 | Materiales y Métodos

2.1 Metodología General

La metodología general se presenta en la Figura 2.1. Para la caracterización tanto de los clones como del control se consideran los siguientes pasos:

- Curva de crecimiento
- Análisis de metabolitos y fuentes de carbono
- Concentración de producto (tPA)

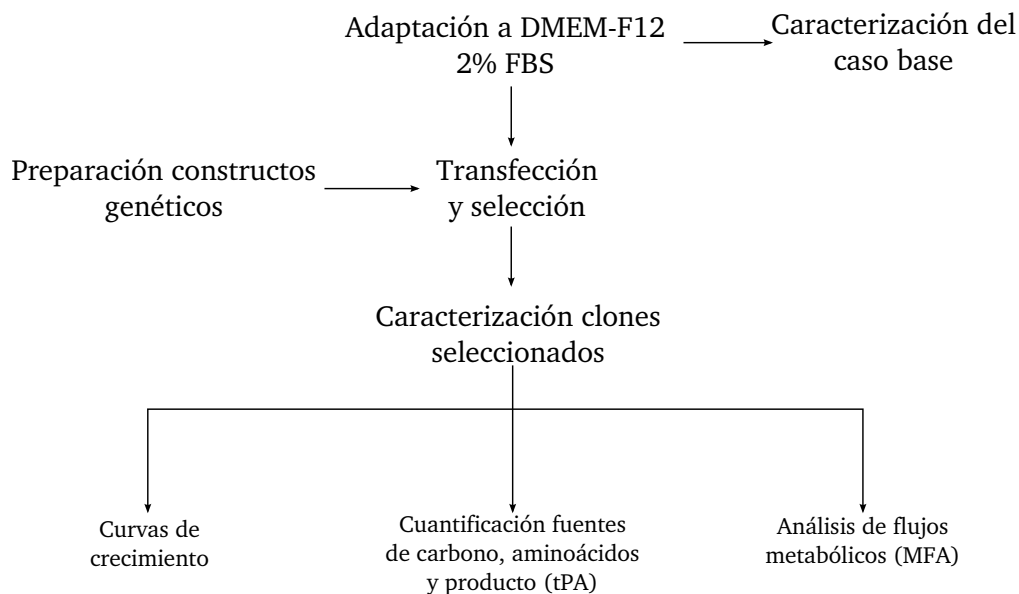


Figura 2.1: Metodología general

La transfección será realizada con los genes de la galactoquinasa (*Galk1*) y el transportador de galactosa (*Slc2a8*) por separado y, posteriormente, con ambos genes para observar los efectos acumulativos de la sobre-expresión de éstos.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Materiales

2.2.1.1 Reactivos

1. Cultivo de células animales

- 2-mercaptoetanol (Sigma, M3148-250)
- Agua Milli Q
- Anticuerpo monoclonal tPA
- Azul tripán (Sigma, T-0776)
- BSA (Perbio, 23209)
- Buffer para YSI 2700
- Carbonato de sodio (Merck, 1.06392.1000)
- CO₂ (Agas)
- Dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma, D2650)
- Etanol grado HPLC (Merck, 1.11727.2500)
- Galactosa (Sigma, G5388)
- Geneticina, G418 (Invitrogen, 11811-031)
- Glucosa (Sigma, G5146)
- Glutamato (Sigma, G8415)
- Kit de medición de Glucosa GLUC-PAP (Randox, GL 364)
- Kit de medición de Lactato LAC-PAP (Randox, LC 2389)
- Medio DMEM/F12 (HAM) 1:1 (GIBCO, ME090283L)
- PBS (Gibco, 21600-010)
- Pluronic F68(Sigma, P1300)
- Suero fetal bovino (Hyclone, SH30910.03)
- Tripsina (GIBCO, 15400-054)
- Zeocina (Invitrogen, R250-01)

2. Biología molecular

- Ampicilina (Calbiochem, 171254-5GM)
- Enzimas de restricción
 - BamHI (Fermentas, ER0051)
 - EcoRI (Fermentas, ER0271)
 - XbaI (Fermentas, ER0681)
- Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, 27104)

- Kit extracción de geles QIAquick (Qiagen, 28704)
- Kit purificación de PCR QIAquick (Qiagen, 28104)
- Ligasa pGEM
- Ligasa T4
- Medio de cultivo LB
- Plasmidios
 - pcDNA 3.1 (Invitrogen, V795-20)
 - pcDNA 3.1 zeo (Invitrogen, V865-20)
 - pGEM-T Easy (Promega, A1360)
- Polimerasas
 - *Taq* (Promega, M8293)
 - KOD Hot Start (Novagen, 71086-3)
- Xgal

2.2.1.2 Equipos

- Agitador magnético (Barnstead Thermolyne, 45600 cellgro™ Stirrer)
- Baño térmico (Labtech)
- Cámara de flujo laminar (Nuare, Nu201330E)
- Centrífuga Boeco C-28
- Centrífuga Eppendorf 5403
- Columna Aminex® HPX-87H (Bio-Rad)
- Computador
- Lector de placa
- HPLC Shimadzu controlador CBM20A
- Incubadora (Shel Lab, TC2323)
- Refrigerador -80°C (SO-LOW, U85-13)
- Sensor de oxígeno (Mettler Toledo)
- Tanque N₂ líquido (Taylor Wharton XT20)
- YSI 2700 Analyzer

2.2.1.3 Materiales de laboratorio

- Filtros de 0.2 μm , Advantec
- Jeringas 20 mL
- Balanza digital, 10 mg de precisión
- Agitador magnético con temperatura
- Propipeta (Drummond)
- Pipetas plásticas estériles de 1, 2, 5, 10 y 25 mL
- Micropipetas
- Vasos precipitados
- Botellas
- Tubos eppendorf
- Cámara Naubauer
- Contador
- Placas T25 y T75
- Placas 60 mm
- Placas 96 pocillos
- Crioviales
- Tubos Falcon 15 y 50 mL estériles
- Membrana galactosa para YSI 2700
- Placas elisa (Nunc-Inmuno Plate Maxisorp Cat. No 442404)
- Filtros de membrana 0,45 μm .

2.2.1.4 Software

- LibreOffice Calc, para el análisis de datos.
- Shimadzu LC Driver Ver. 2.0, para controlar HPLC Shimadzu
- qtiplot, para la generación de gráficos
- Inkscape, para crear figuras

2.2.2 Vectores utilizados

En este trabajo se utilizan dos vectores: pGEM T-easy como paso intermedio en el proceso de clonamiento del gen de interés en el vector de expresión y pcDNA3.1(+) para la sobre-expresión de los genes en células animales. Sus características se presentan en las siguientes secciones:

2.2.2.1 pGEM T-easy

pGEM-T Easy es un vector de alto número de copias que contiene los promotores T7 y SP6 para ARN polimerasa, los que rodean un sitio de multiclonamiento, el cual a su vez interrumpe la secuencia que codifica para la región alfa de la enzima beta-galactosidasa (Figura 2.2).

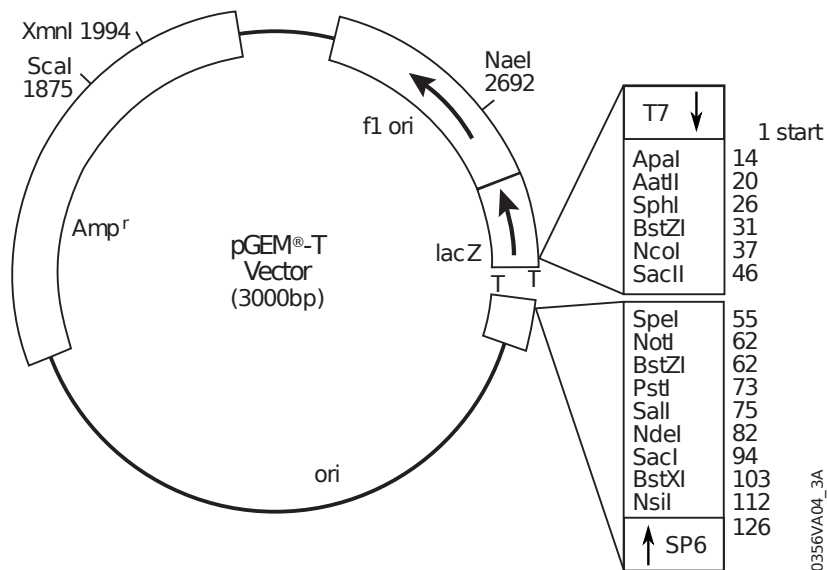


Figura 2.2: Esquema del vector pGEMT-easy

La *Taq* polimerasa es capaz de agregar adeninas adicionales en los extremos de los fragmentos replicados en una reacción de PCR. La presencia de timinas en el sitio de clonamiento de este vector, permite la ligación del producto de interés, de forma de interrumpir la secuencia de la beta-galactosidasa. Así, los clones que hayan integrado el vector vacío serán capaces de degradar X-gal, un análogo de galactosa que, al ser utilizado como sustrato por esta enzima tiene como producto 5-bromo-4-cloro-3-hidroxindol, el cual es oxidado para formar un compuesto azul insoluble, con lo que estas colonias pueden ser distinguidas a simple vista en una placa de agar con X-gal.

Adicionalmente, este vector presenta el origen de replicación f1, y resistencia a ampicilina para su clonamiento y selección en *E. coli*.

2.2.2.2 pcDNA 3.1

El vector pcDNA 3.1 es un vector derivado de pcDNA 3, diseñado para la sobre-expresión estable y transiente en células animales. Posee un tamaño de 5,4 kb, el promotor de citomegalovirus humano (CMV) y del papovavirus SV40 (SV40); presenta resistencia a ampicilina para selección en *E. coli*; y a otro antibiótico para selección en células animales. En particular en este trabajo se utilizarán los plasmidios pcDNA 3.1(+) y pcDNA 3.1(+)-zeo, que poseen resistencia a la neomicina y zeocina respectivamente.

Adicionalmente el vector posee un sitio de multi clonamiento el que se presenta en la Figura 2.3. El cual puede presentarse en dos direcciones: - o +, como es el caso en este trabajo.

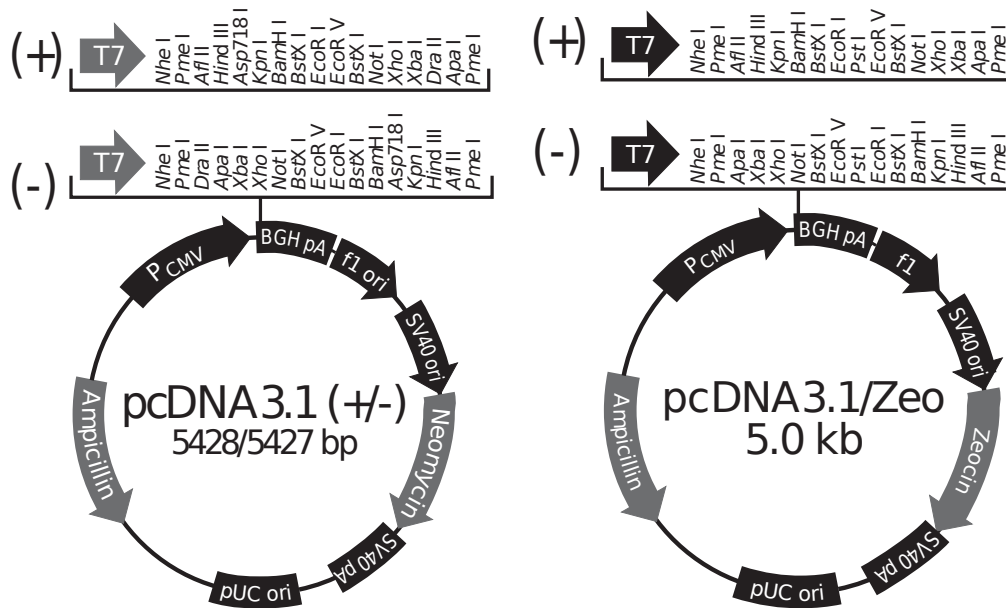


Figura 2.3: Esquema de los vectores pcDNA 3.1 a utilizar

2.2.3 Preparación Constructos Genéticos

2.2.3.1 Galactoquinasa (GALK1)

La metodología general para la generación del constructo pcDNA3.1-Galk1, que es utilizado posteriormente en la transfección de células animales, se presenta en la Figura 2.4.

Se inocula una cepa conteniendo el vector (pSPORT1) con el gen de la galactoquinasa proveniente de *Mus musculus* (GALK1) y el plasmidio a utilizar para la expresión del gen en células animales (pcDNA3.1); en medio LB con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. Este cultivo es crecido durante la noche y sometido a una reacción de extracción de ADN plasmidial utilizando el kit de QIAprep Miniprep.

El ADN plasmidial obtenido a partir de ambos cultivos, es digerido con las enzimas

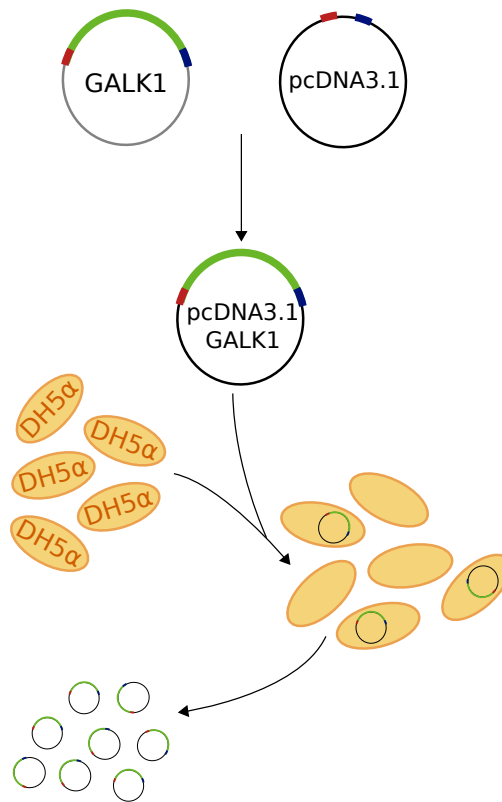


Figura 2.4: Metodología general para la generación del constructo Galk1: tanto el plasmidio pSPORT1 como pcDNA3.1 son digeridos con las enzimas BamHI (■) y EcoRI (■), los fragmentos obtenidos son ligados y utilizados para transformar células electrocompetentes.

de restricción BamHI y EcoRI (Tabla A.1). El producto de esta digestión es analizado electroforéticamente en Agarosa al 1% y posteriormente purificado usando el kit "QIAEX II Gel Extraction Kit".

El producto purificado obtenido es luego ligado al vector pcDNA3.1 utilizando T4 ADN ligasa (Tabla A.2) y el producto de ligación es introducido en células DH5- α por electroporación.

Los clones obtenidos en placas de medio LB con ampicilina son transferidos a 4 mL de medio LB líquido con este antibiótico y crecidos durante la noche. Se realiza un stock en glicerol (125 μ L de glicerol al 80% y 375 μ L de cultivo) y se extrae el ADN plasmidial del cultivo obtenido mediante el kit de QIAprep Miniprep. Este ADN plasmidial es digerido con enzimas de restricción de acuerdo a lo expuesto en la Tabla A.1 y analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% donde se observa la presencia o ausencia del inserto.

2.2.3.2 Transportador GLUT8 (Slc2a8)

La metodología general para la generación del constructo pcDNA3.1-Slc2a8 utilizado en la transfección de células animales se presenta en la Figura 2.5.

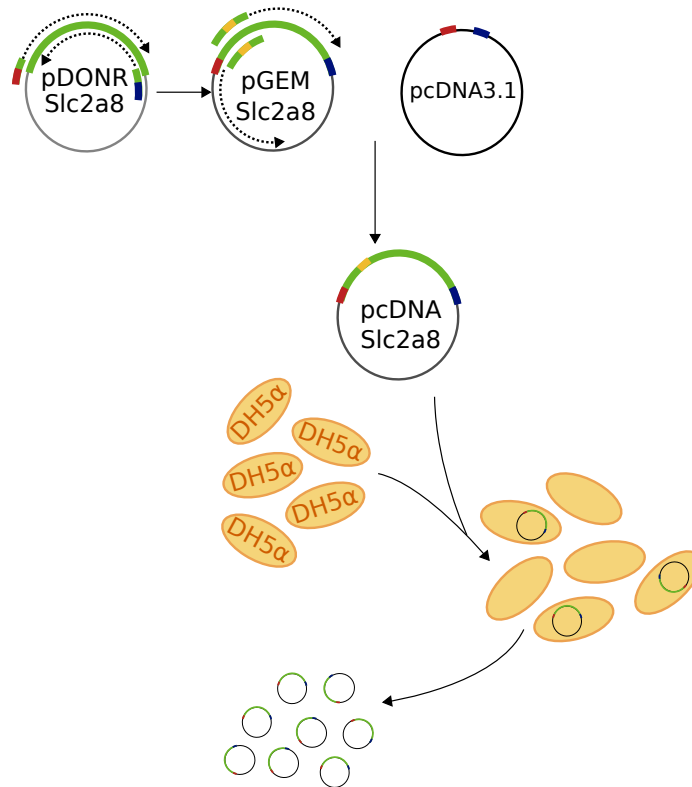


Figura 2.5: Metodología general para la generación del constructo *Slc2a8*. El plasmidio pDONR es sometido a una reacción de PCR para integrar los sitios de restricción de BAMHI (■) y XbaI (■); los fragmentos obtenidos son ligados y utilizados para transformar células electrocompetentes. Posteriormente, otra reacción de PCR es realizada para la mutación que permite la expresión del transportador a nivel de membrana plasmática. Tanto pGEM como pcDNA3.1 son digeridos y sometidos a una ligación para transformar células DH5α.

Para la preparación del constructo se inocula una cepa conteniendo el vector (pDONR 201) que contiene el gen del transportador de galactosa (*Slc2a8*) proveniente de *Mus musculus* y el plasmidio a utilizar en la expresión del gen en células animales (pcDNA3.1 zeo), en medio LB con 50 μg/mL de kanamicina y 100 μg/mL de ampicilina, respectivamente. Este cultivo es crecido durante la noche y sometido a una reacción de extracción de ADN plasmidial utilizando el kit de QIAprep Miniprep.

Se realiza una reacción de PCR con la enzima *Taq* polimerasa para la integración de los sitios de restricción (BamHI y XbaI) requeridos para la clonación en el vector de expresión (Tabla A.3).

El producto de esta reacción es analizado electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% y purificado utilizando el kit "QIAEX II Gel Extraction Kit". Posteriormente se liga al vector PGEMT-easy de acuerdo a lo presentado en la Tabla A.4, esta reacción se deja reaccionar entre 12 y 16 horas y posteriormente se procede a electroporar células DH5- α .

Las colonias obtenidas son inoculadas en tubos con 4 mL de medio LB y ampicilina y cultivados durante la noche, su ADN plasmidial es extraído utilizando el kit de QIAprep Miniprep y se utilizan como templado para la reacción de PCR expuesta en la Tabla A.3.

Los clones que efectivamente hayan integrado los sitios de restricción se someten a una reacción de PCR con KOD polimerasa donde se integrarán las mutaciones necesarias para la expresión de este transportador en la membrana plasmática. Esta reacción es realizada con partidores diseñados para este propósito de acuerdo a lo expuesto previamente en la sección 1.2.3.1. Luego de esta se agregan 20 unidades de la enzima de restricción DpnI y se incuba a 37°C durante 4 horas, tiempo en el cual se eliminan las copias del plasmidio que no incorporaron la mutación.

El constructo obtenido es utilizado para electroporar células DH5- α , y es secuenciado con el objetivo de verificar la presencia de la mutación realizada. Posteriormente el ADN de estas colonias se somete a una digestión con las enzimas BamHI y XbaI, y posteriormente se liga al plasmidio pcDNAzeo (Tablas A.6 y A.7).

2.2.3.3 Purificación Final

Los constructos del vector a utilizar para la expresión son digeridos con la enzima ScaI para linealizar el vector, adicionalmente se realiza una precipitación de ADN con etanol frío (Apéndice A.2) y una cuantificación y medición de la pureza del ADN obtenido (Apéndice A.3), de forma de calcular cuando ADN será utilizado para la transfección (Apéndice 2.2.4.2).

2.2.4 Cultivo Celular

La línea celular CHO TF 70R, proveniente de ovario de hamster chino, productora de tPA (CHO tPA) se utiliza para los estudios realizados. Éstas células se crecen en medio DMEM/F12(HAM) 1:1 suplementado con 2,5 [mM] de glutamina, 1,7 [μ L/L] de β -mercaptoetanol, 0,1 [mL/L] de etanolamina, ácido ascórbico 0,11 [mM], putrescina 29 [nM], 2,4 [g/L] de bicarbonato de sodio, 1 [g/L] de pluronic F68 y suero fetal bovino (FBS) en algún porcentaje v/v no superior al 10% dependiendo de los experimentos realizados. A este medio se le adicionan distintas concentraciones de glucosa y galactosa de forma de definir tres medios:

- Gal20: galactosa 20 [mM]
- Glc20: glucosa 20 [mM]
- GG6/14: glucosa 6 [mM] y galactosa 14 [mM]

Las células se mantienen en una incubadora con CO₂ al 5%, manteniendo una temperatura de 37 °C y una humedad relativa de alrededor del 80 %, en placas de 25, 75 cm² de área (T 25 y T 75 respectivamente) y de 60 mm de diámetro. Luego de descongeladas, éstas son subcultivadas cada 2 días, proceso en el cual se realiza un pasaje 1:3, donde las células existentes en una placa se inoculan en 3. Esto se realiza durante un máximo de 3 meses, luego del cual se debe descongelar un nuevo vial para seguir realizando experimentos.

2.2.4.1 Adaptación a medio DMEM/F12 con bajo porcentaje de suero

Se busca minimizar la concentración de suero fetal bovino de forma de conservar una velocidad de crecimiento similar a lo reportada para esta línea celular en cultivo. A partir de esto se realizan disminuciones sucesivas de la concentración de este reactivo chequeando la viabilidad celular mediante el uso de azul de tripano.

Posteriormente se realizan curvas de crecimiento de forma de determinar la concentración adecuada de suero con la que se trabajará, que será la que mantenga un tiempo de duplicación cercano al deseado pero que minimice la concentración de este reactivo.

2.2.4.2 Transfección y selección

Previo a la transfección es necesario identificar las concentraciones de los antibióticos en que son citotóxicas. Para ello se inoculan placas de 60 [mm] a 4×10^5 [cel/mL] las cuales son sometidas a distintas concentraciones de zeocina y geneticina de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Estas placas son monitoreadas por una semana o hasta que se observe muerte celular, ya sea por observación al microscopio o por conteo celular.

Posteriormente, se siembran las placas de 60 [mm] a transfectar a una densidad celular de 4×10^5 [cel/mL] en medio con 2% de suero. Se realizan transfecciones para la generación de los siguientes clones:

- CHO *Galk1* en pcDNA3.1-gen
- CHO *Slc2a8* en pcDNA3.1-zeo
- CHO *Galk1-Slc2a8* (cotransfección de ambos plasmidios)
- Controles con vector vacío
 - CHO *pcDNA3.1-gen*
 - CHO *pcDNA3.1-zeo*
 - CHO *pcDNA3.1-gen-zeo* (cotransfección de ambos plasmidios)

La transfección se realiza al día siguiente del plaqueo de las células, de acuerdo a lo expuesto en el Apéndice B.6. La selección de clones finaliza al observar la muerte celular de las placas control ante la presencia del antibiótico. Posteriormente se procede a realizar la selección de los clones a estudiar mediante dilución al límite (Apéndice B.7), proceso en el

cual se inoculan células en placas de 96 pocillos de forma de obtener una célula (un clon) por pocillo.

La determinación de los clones seleccionados se basa en los que presenten mayor densidad celular en medio GG6/14 luego del transcurso de 2 semanas y los que posteriormente posean una menor acumulación de lactato por célula. Finalmente se realiza una selección definitiva, basada en el comportamiento de estos clones durante una curva de crecimiento en este medio.

2.2.4.3 Curvas de crecimiento

Para caracterizar el estado metabólico de las células tanto del caso base, como de los distintos clones obtenidos en la transfección, se realizan curvas de crecimiento. Con este fin, se inoculan placas de 60 mm a una concentración inicial de 2×10^5 cel/mL. Posteriormente, cada 12 horas se tripsina (Sección B.2) una placa para desprender las células adheridas a ella, se realiza un conteo celular y se extrae el sobrenadante para análisis de metabolitos, tales como glucosa, lactato, etc.

A partir de las mediciones obtenidas, y el número de células vivas (X_v), es posible calcular la tasa específica de crecimiento de consumo (q_c) o de producción (q_p) de metabolitos, la tasa específica de reproducción celular (μ), y la velocidad máxima característica de la etapa de crecimiento exponencial (μ_{\max}). Las ecuaciones utilizadas para estos fines corresponden a:

$$X_v = X \times V \quad (2.1)$$

$$\mu = \frac{1}{X_v} \frac{dX_v}{dt} \quad (2.2)$$

Donde X representa la densidad celular de células viables determinada por el medio de exclusión utilizando Azul de Tripano y V el volumen en el cual éstas se encuentran.

Para el cálculo de los parámetros q_c y q_p es necesario realizar una curva acumulativa sumando las diferencias de cantidad de metabolito presente en el medio entre dos tiempos consecutivos y se ajusta un polinomio a la curva resultante. Las tasas específicas se calculan de acuerdo a las ecuaciones 2.3 y 2.4.

$$q_c = \frac{-1}{X_v} \frac{dC}{dt} \quad (2.3)$$

$$q_p = \frac{1}{X_v} \frac{dP}{dt} \quad (2.4)$$

A partir del estudio de estos valores en la mitad de la fase exponencial del cultivo, es posible calcular el valor de la razón $\Delta L / \Delta H_{\text{ex}}$ como:

$$\frac{\Delta L}{\Delta H_{\text{ex}}} = \frac{-q_{\text{lac}}}{q_{\text{hex}}} \quad (2.5)$$

En particular, en este trabajo se realizarán curvas de crecimiento en medios de cultivo suplementados con distintas fuentes de carbono (Glc20, Gal20 y GG6/14) para células CHO sin transfectar, y para células transfectadas con el gen *Galk1*, *Slc2a8*, *Galk1-Slc2a8*, además de los controles con vector vacío (pcDNA3.1-gen, pcDNA3.1-zeo y pcDNA3.1-zeo-gen).

2.2.4.4 Determinación de metabolitos

A partir del sobrenadante obtenido de las curvas de crecimiento, se realizan mediciones de la concentración de glucosa, y lactato utilizando los kits para este objetivo. La cantidad de galactosa presente en cada uno de los puntos de la curva de crecimiento es evaluada utilizando el equipo YSI 2700 con una membrana específica para la medición de esta hexosa. La concentración de tPA es determinada mediante un ensayo de ELISA (Ver Apéndice B.8).

Adicionalmente es necesario determinar la concentración de los amino ácidos presentes en el medio celular. Para ello se utiliza cromatografía HPLC (*High performance liquid chromatography*) previa a la cual se realiza una derivatización de los amino ácidos con o-phtaldehído (OPA) la que permite su lectura luego de su paso por la columna de litio, donde éstos son separados mediante un intercambio catiónico (Ver Apéndice B.9).

Con esto se tienen las siguientes especies medidas para la realización del análisis de flujos metabólicos.

tPA	Glicina
Biomasa	Histidina
Galactosa	Isoleucina
Glucosa	Leucina
Lactato	Lisina
Alanina	Metionina
Arginina	Prolina
Asparagina	Serina
Aspartato	Tirosina
Cisteína	Treonina
Fenilalanina	Valina
Glutamina	

Las tasas específicas correspondientes a CO₂ y amonio son estimadas a partir de reportes realizados para células animales (Wilkins et al., 2011; Altamirano et al., 2006; Gray et al., 1996; Deshpande & Heinzle, 2004; Hayter et al., 1991; Yang & Butler, 2000; Altamirano et al., 2000) y ajustadas para cumplir con el balance de carbono y nitrógeno del sistema.

2.2.5 Análisis de flujos metabólicos

Con los datos obtenidos a partir de las mediciones se realiza un análisis de flujos metabólicos de acuerdo a la red metabólica presente en la Figura 2.6. Para esto se consideran las siguientes reacciones:

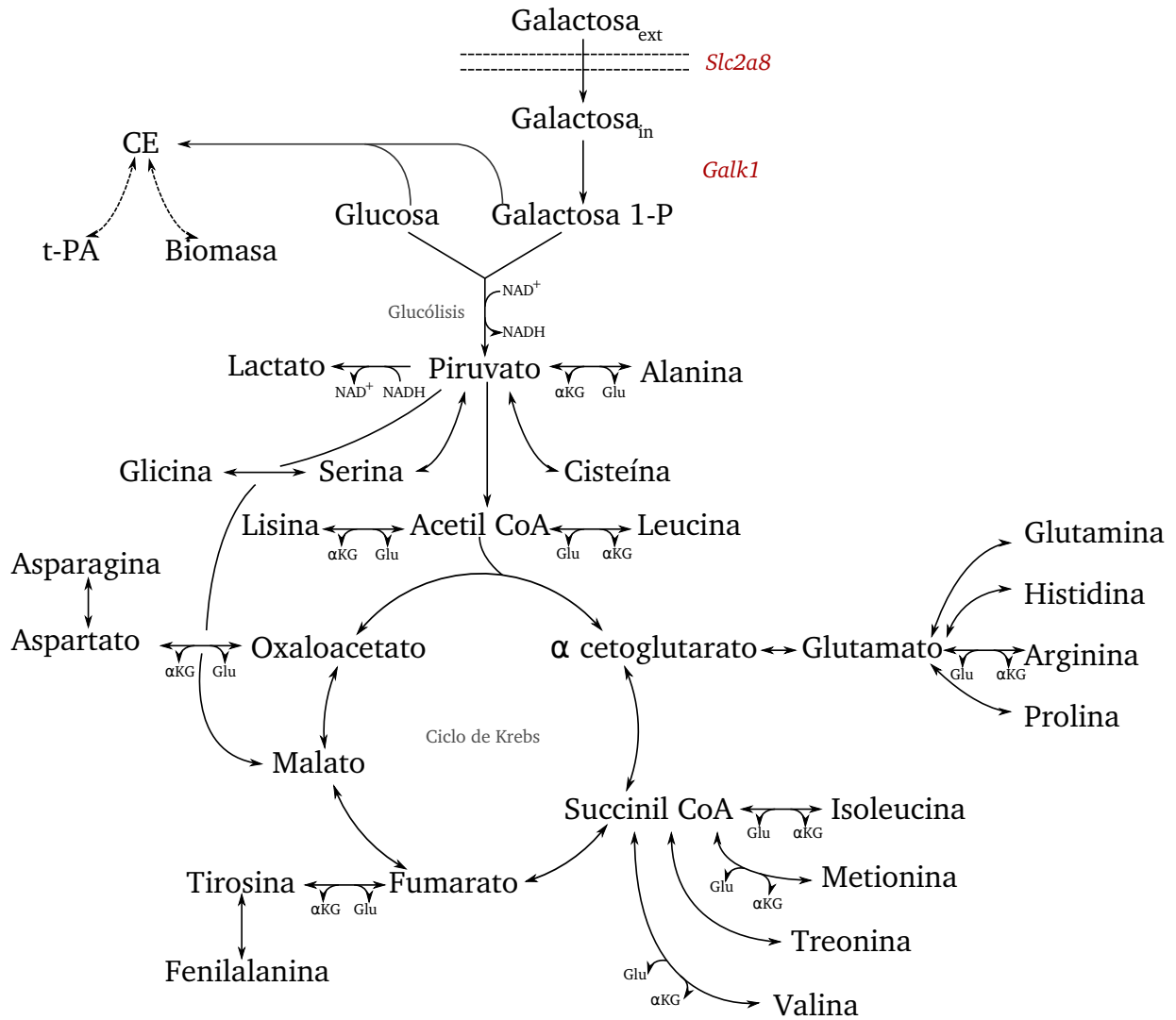


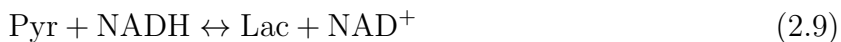
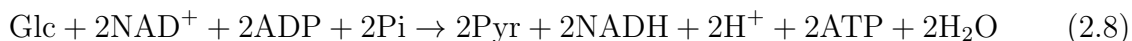
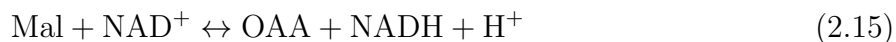
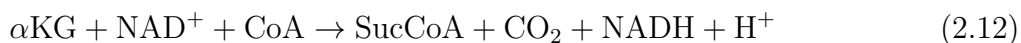
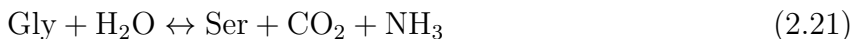
Figura 2.6: Red metabólica a utilizar para el análisis de flujos metabólicos

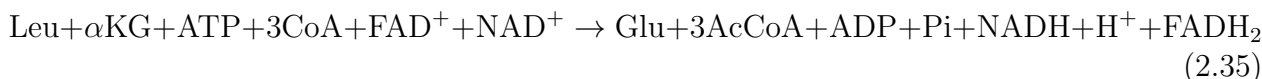
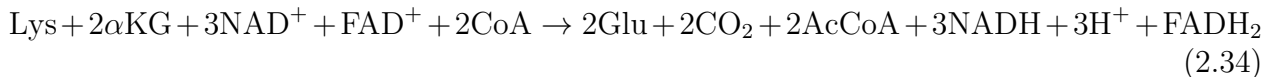
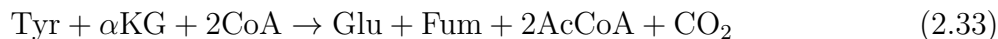
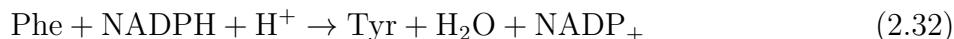
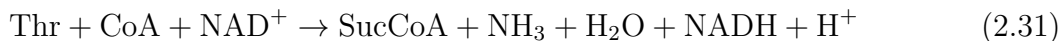
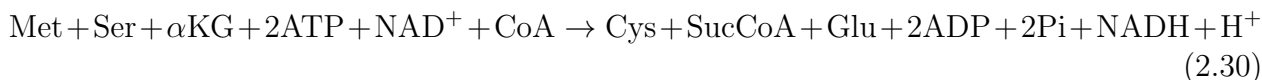
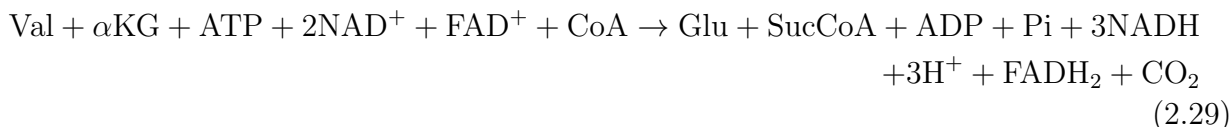
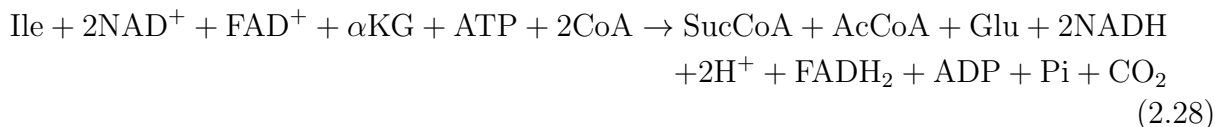
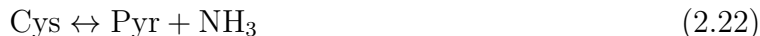
2.2.5.1 Metabolismo de galactosa

Se tienen dos reacciones que están directamente relacionadas con la expresión de los genes *Slc2a8* (Ecuación 2.6) y *Galk1* (Ecuación 2.7). La primera consiste en el transporte de galactosa al interior de su célula, el cual es realizado de forma pasiva (Uldry & Thorens, 2004) por lo cual no hay gasto de ATP en el proceso, al contrario de la fosforilación de este azúcar, la que requiere del traspaso del grupo fosfato a partir de una molécula de ATP.



Las reacciones restantes del metabolismo en cual se realizará el análisis se basan en el modelo expuesto en Wilkens et al. (2011), y corresponden a las siguientes:

2.2.5.2 Glucólisis**2.2.5.3 Ciclo de Krebs****2.2.5.4 Glutaminólisis****2.2.5.5 Síntesis y degradación de aminoácidos**



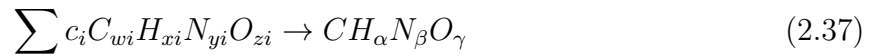
2.2.5.6 Definición de molécula equivalente energética

Adicionalmente se define lo que se llama molécula equivalente energética, para reflejar en las siguientes ecuaciones los requerimientos energéticos de la célula para la síntesis de biomasa y t-PA. Esta molécula será llamada "molécula energética CE" (*Carbon equivalent*), la cual se produce a partir de la oxidación completa de una molécula de glucosa.

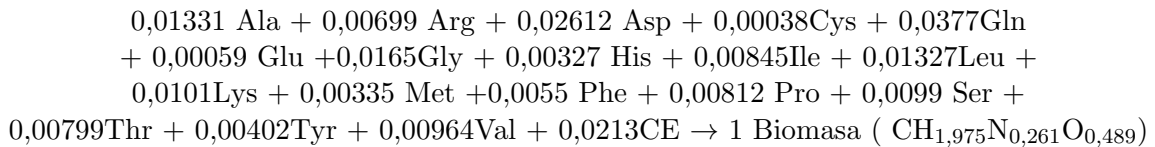


2.2.5.7 Definición de reacción de síntesis de biomasa

La reacción de síntesis de biomasa debe ser capaz de integrar las características de las células con las cuales se trabajará, es por esto que es uno de los pasos de mayor importancia y complejidad a la hora de realizar un análisis de flujo metabólico. Ésta debe considerar la síntesis de las macromoléculas que conforman la célula como son los proteínas, lípidos en general y ácidos nucleicos a partir de la contribución de distintos precursores. La ecuación es de la forma:

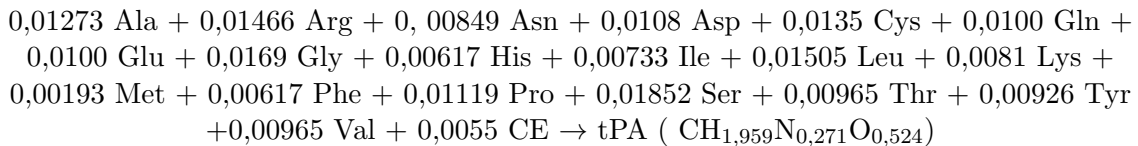


De acuerdo a lo expuesto en Gambhir et al. (2003) el peso molecular de las células CHO corresponde a 25,474 g/mol. Este dato junto con la suma de las reacciones del anabolismo de estas células (expuestas anteriormente), da lugar a la siguiente reacción en base molar:



2.2.5.8 Definición de reacción de síntesis de t-PA

La ecuación que sintetiza los requerimientos para la síntesis de t-PA son calculados a partir de la conformación aminoacídica de esta proteína junto con los requerimientos energéticos para su síntesis (energía asociada a la generación de enlaces peptídicos). A partir de esto se obtiene lo siguiente:



2.2.5.9 Matriz estequiométrica

En base a la estequiometría de las reacciones previamente mencionadas se construye una matriz estequiométrica donde cada fila representa un metabolito, mientras que las columnas representan cómo estos interactúan. En ella las reacciones adicionales específicas para las alteraciones del metabolismo de galactosa son acopladas a la reacción del ingreso de ésta, su conversión a glucosa y posterior glucólisis, debido a que no existen otros posibles destinos para los intermediarios (Gal_{in}) y Gal1-P. Esto es con el fin de evitar redundancia entre los

flujos obtenidos.

Se obtiene una matriz no singular de 33 filas y 31 columnas cuyo número de condicionamiento es 31, lo que indica que existirá una baja propagación de errores en la resolución del sistema. Con estos antecedentes se realiza un análisis de sensibilidad que determina los flujos cuyo cálculo se encuentra propenso a errores en la estimación de flujos de Pyr-AcCoA, OAA- α KG, α KG-SucCoA, Mal-OAA y Ser-Pyr, los que son sensibles a errores en las mediciones de leucina, lisina y metionina.

3 | Resultados y discusión

3.1 Preparación Constructos Genéticos

3.1.1 Galactoquinasa Galk1

De la digestión del constructo que contenía el gen de la galactoquinasa en el vector pcDNA3.1 se obtuvieron los resultados presentados en la Figura 3.1a, donde se observa el patrón de migración esperado dado los pesos moleculares de los fragmentos involucrados.

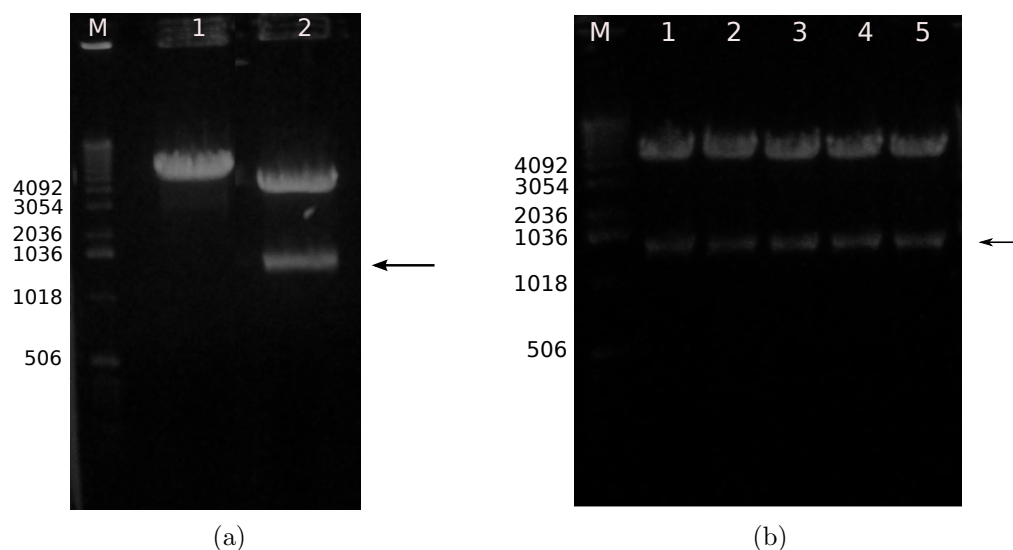


Figura 3.1: Digestiones con las enzimas BamHI y EcoRI, para la liberación del gen de la galactoquinasa (a) y para verificar la existencia del inserto en los clones obtenidos (b). M: Marcador de peso 1 kb, (a): Carril 1: Vector pcDNA3.1(+). Carril 2: Vector pSPORT1 conteniendo el gen de la Galactoquinasa. (b): Carril 1-5: digestiones de distintos clones obtenidos luego de la ligación de este gen al plasmidio de expresión en células animales. El gen de la galactoquinasa se encuentra indicado con una flecha.

A partir de la electroporación se obtuvieron 5 clones. La digestión del ADN plasmidial de estos clones genera los patrones de migración observados en la Figura 3.1b, que son consistentes con el peso molecular teórico del gen que expresa la proteína de la galactoquinasa (1 kb). Se seleccionó el clon 1 para las etapas posteriores de purificación y transfección.

3.1.2 Transportador GLUT8

3.1.2.1 Diseño de partidores

Se diseñaron partidores tanto para la integración de sitios de restricción requeridos para el clonamiento como para la mutación requerida para la expresión de esta proteína a nivel de membrana celular, los que se presentan a continuación:

Partidores para integrar sitios de restricción BamHI y XbaI

Glut8BamHIF (para clonamiento en vector pcDNA 3.1)

Secuencia: 5'- AGC ATG GAT CCC GGG CCC CAA ATA ATG - 3'

Longitud: 25 bases

Tm: 64.7 °C

Contenido GC: 55.5%

Glut8XbaIR (para clonamiento en vector pcDNA 3.1)

Secuencia: 5'- CAG AGA TTT CTA GAC ACG GGC CAG AGC TG - 3'

Longitud: 29 bases

Tm: 63.2 °C

Contenido GC: 55.1%

Partidores para mutar el gen

MutGlut8F

Secuencia: 5'- CCC CCA GGA GAC GCA GCC GCT ATT G - 3'

Longitud: 25 bases

Tm: 67.2 °C

Contenido GC: 68%

MutGlut8R

Secuencia: 5'- GTC CTG GCT TCC GGT GGC CGC AAT AG - 3'

Longitud: 26 bases

Tm: 67.1 °C

Contenido GC: 65.3%

Un análisis posterior de la secuencia, reveló la existencia de potenciales secuencias de unión al ribosoma donde se iniciaría la transcripción del gen, por lo que se re-diseñó el partidor Glut8BamHIF, obteniéndose.

Glut8BamHIF2 (para clonamiento en vector pcDNA 3.1)

Secuencia: 5'- GGA TCC GAG TAG AAA GCT CGC CCG - 3'

Longitud: 24 bases

Tm: 63.1 °C

Contenido GC: 62.5%

3.1.2.2 Generación constructo pcDNA-*Slc2a8*

Luego de la reacción de PCR con los partidores que permiten la integración de los sitios de restricción requeridos para la clonación de este gen, se realiza un análisis en geles con agarosa (Figura 3.2a) donde se observa una banda del tamaño del gen *Slc2a8* que codifica para el transportador GLUT8 (2,8 kb). Posteriormente se observa una banda de este tamaño en los clones obtenidos luego de la electroporación con el constructo que contiene al transportador modificado para su expresión a nivel de membrana plasmática (Figura 3.2b).

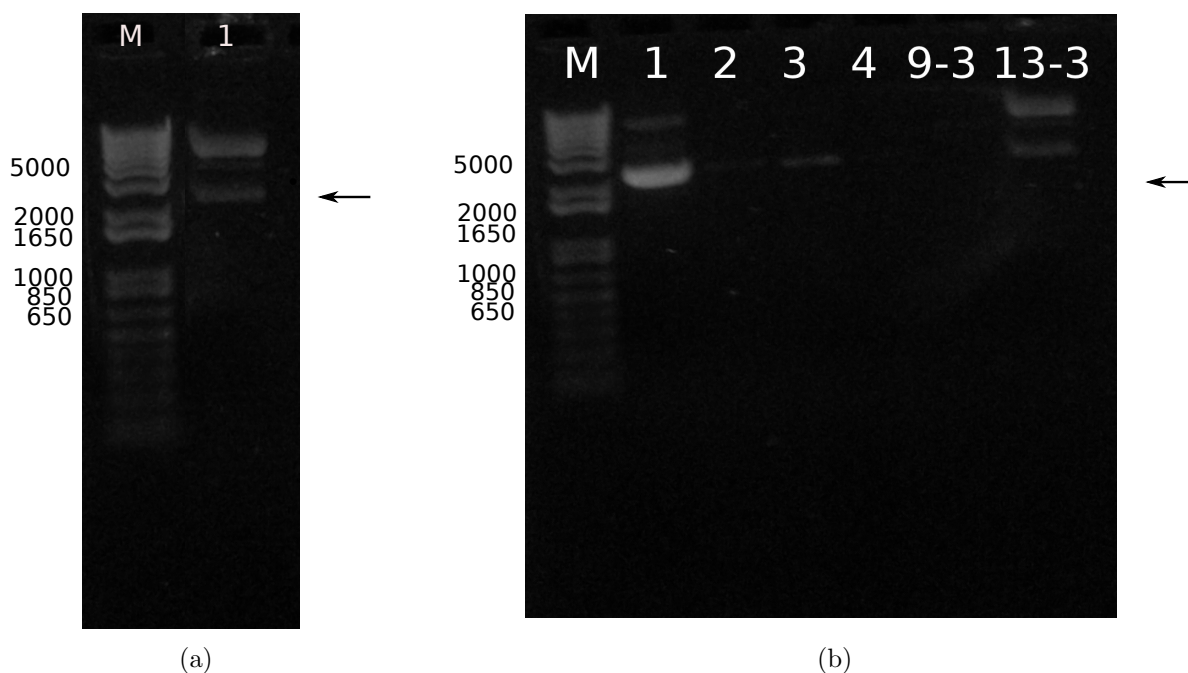


Figura 3.2: Generación del constructo pcDNA-*Slc2a8*: (a): reacción de PCR para la adición de sitios de restricción; (b): verificación de presencia del gen en los clones obtenidos. El plasmidio o gen de interés está indicado con una flecha.

Estos resultados, junto con la verificación mediante secuenciación, muestran que efectivamente se clonó el gen que codifica para el transportador GLUT8 el cual será utilizado para la transfección de células CHO en etapas posteriores de este trabajo.

3.2 Curvas de crecimiento

3.2.1 Adaptación a medio bajo en suero

Se desea adaptar la línea celular CHO tPA a crecer en medio con bajas concentraciones de suero fetal bovino (FBS), para ello se realizaron 3 curvas de crecimiento en medios suplementados con distintas concentraciones de FBS (5%, 2% y 1%). A partir de estos resultados se calcula la velocidad máxima de crecimiento en su fase exponencial, la cual es comparada con el comportamiento observado en medio libre de suero CHOSFMII (CHO

Serum Free Media II, Apéndice C).

Los resultados se presentan en la Tabla 3.1 y con estos antecedentes se opta por el uso de 2% de suero, dado que es la menor concentración medida, que no genera cambios significativos en el valor de la velocidad máxima de crecimiento, μ_{\max} (Calculada de acuerdo a la metodología expuesta en la sección 2.2.4.3).

Tabla 3.1: Cálculo de μ_{\max} para cultivos con distintas concentraciones de suero fetal bovino.

Suero [%]	μ_{\max} [$10^{-2}/\text{h}$]
0% (CHOSFMII)	2,7
5%	2,46
2%	2,29
1%	1,78

3.2.2 Comportamiento de células CHO tPA

Con el fin de caracterizar el crecimiento celular en células CHO tPA, previas a la transfección, en medio de cultivo con distintas combinaciones de glucosa y galactosa (Glc20, Gal20 GG6/14) se realizan las curvas de crecimiento presentes en la Figura 3.3. En esta figura se evidencian las características previamente descritas para los distintos tipos de cultivos: crecimiento más rápido para el caso de crecimiento en glucosa como única fuente de carbono en comparación con cultivos con fuentes mixtas (GG6/14) (Tabla 3.2), donde además se produce una etapa estacionaria extendida en el tiempo. Se puede verificar también la incapacidad de éstas células de crecer en medio con galactosa como única fuente de energía (Gal20) (Wilkins et al., 2011).

Con respecto al consumo de fuentes de carbono, para el caso del cultivo en GG6/14, se distinguen dos etapas: una primera donde se consume glucosa hasta agotarla, y una segunda de consumo de galactosa, iniciada a las 50 [h], donde se produce el *shift* metabólico que lleva al uso de lactato como fuente de carbono adicional (Figura 3.3b), lo que se refleja en un valor de $\Delta L/\Delta \text{Gal}$ negativo (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Parámetros μ_{\max} y $\Delta L/\Delta \text{Hex}$ para cultivos de células CHO tPA.

Cultivo	μ_{\max} [$10^{-2}/\text{h}$]		$\Delta L/\Delta \text{Hex}$	
	Glc	Gal	Glc	Gal
Glc20	2,6	-	1,5	-
GG6/14	2,4	0,93	1,2	-2,5

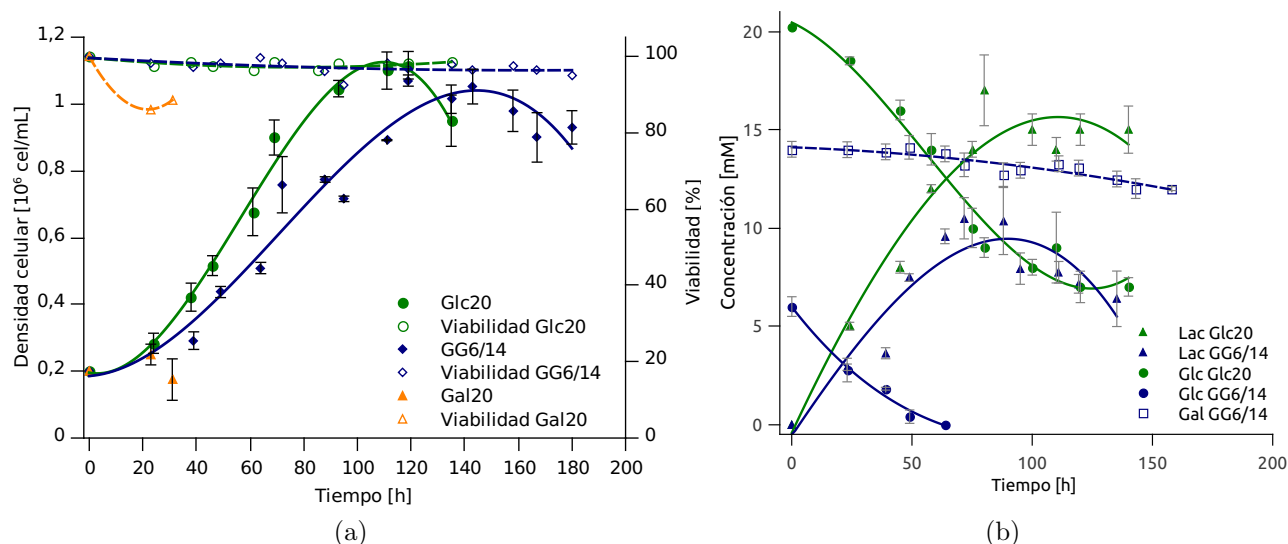


Figura 3.3: Curva de crecimiento de células CHO tPA en medio Glc20, GG6/14 y Gal20: (a): densidad celular, (b): concentración de glucosa, galactosa y lactato.

3.2.3 Comportamiento de células transfectadas CHO-Galk1

Se realiza una curva de crecimiento para el conjunto de clones obtenidos luego de la transfección con el gen de la galactoquinasa (CHO-Galk1). Los resultados son presentados en las Figuras 3.4 y 3.5, donde se observa el comportamiento de estos clones en un cultivo *batch* con los medios mencionados anteriormente.

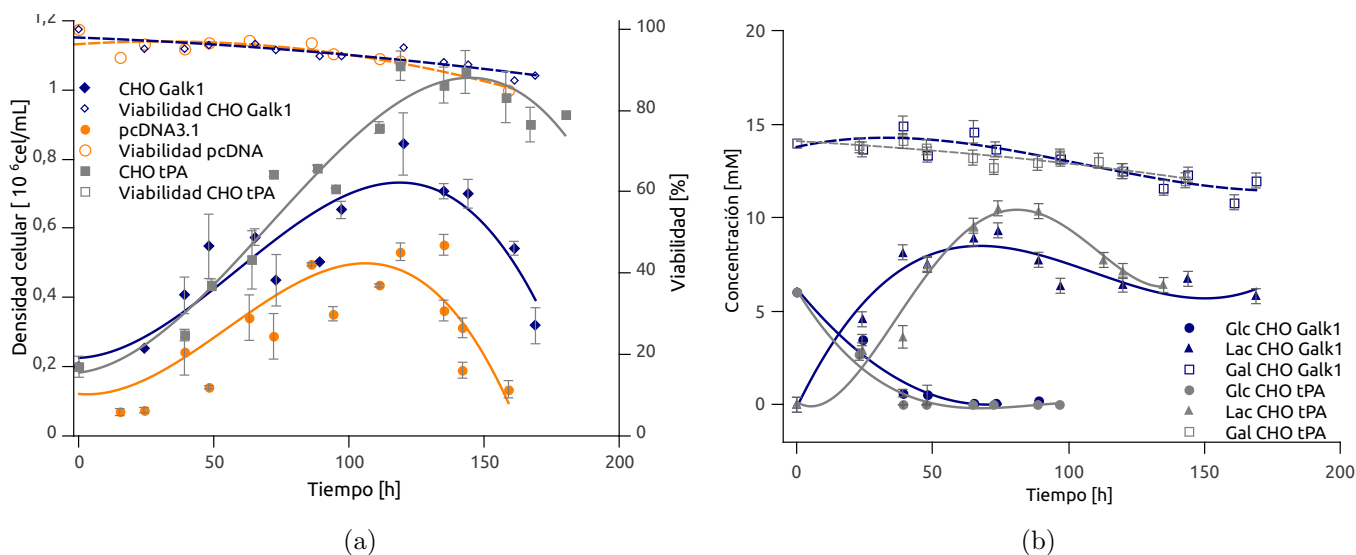


Figura 3.4: Curva de crecimiento de *pool* de clones Galk1 en medio GG6/14: (a): densidad celular, (b): concentración de glucosa y lactato.

Las células que sobre-expresan el gen *Galk1* alcanzan una mayor densidad celular que las del control utilizado (vector vacío) en medio GG6/14 (Figura 3.4), aún cuando la máxima densidad celular alcanzada corresponde al 84,4% de la obtenida en los cultivos realizados anteriormente con un medio de la misma composición (Figura 3.3). Con respecto a este último punto, existen estudios que asocian la sobre-expresión de proteínas heterólogas con estrés metabólico en células CHO (Gu et al., 1995), en el cual se observaron disminuciones en la velocidad de crecimiento de hasta un 62% utilizando un constructo que incluía la presencia del promotor del citomegalovirus (CMV) para la sobre-expresión constitutiva de un gen, codificando para la enzima β -galactosidasa. La reducción observada en la velocidad de crecimiento tras la sobre-expresión de *Galk1* podría atribuirse a este hecho.

Para la obtención del pool de clones CHO-Galk1, se utilizó un constructo que incluía el promotor previamente mencionado, observándose una velocidad de crecimiento correspondiente al 62% de la previamente reportada (Tablas 3.2 y 3.3) en la fase de consumo de glucosa. Sin embargo, en la segunda etapa de crecimiento se observa un aumento de este parámetro en un 40% con respecto a las células sin transfectar. Esta diferencia podría ser un indicador preliminar del efecto de la sobre-expresión de la galactoquinasa en el metabolismo de galactosa, y motiva la selección de clones aislados de forma de analizar los efectos de esta modificación en detalle.

Por otro lado, las células transfectadas con el vector vacío sólo expresan la resistencia al antibiótico de selección utilizado por lo que no deberían presentar una disminución de su velocidad de crecimiento o de la máxima densidad celular alcanzada en cultivo, teoría que se contradice con los resultados en la Figura 3.4. Esto puede deberse a la obtención de un pool de clones cuyo comportamiento predominante está caracterizado por bajas velocidades de crecimiento y una menor densidad celular luego de la transfección con dicho plasmidio.

Con respecto al consumo de fuentes de carbono, se observa que tanto las células control como las transfectadas con el gen de la galactoquinasa poseen un consumo comparable de glucosa, agotando su presencia en el medio de cultivo alrededor de las 49 y 47 [h] respectivamente, etapa en la cual lactato es producido con un $\Delta L/\Delta \text{Glc}$ de 1,22 (Tabla 3.3) al igual que lo obtenido en el cultivo control (Tabla 3.2).

Posteriormente se observa una diferencia en el valor de este parámetro en la fase de crecimiento en galactosa, donde el valor de $\Delta L/\Delta \text{Gal}$ es de -1,35, lo que refleja un consumo de lactato en esta fase pero en menor magnitud a lo registrado para la línea celular parental. Este comportamiento puede explicarse por la presencia de clones en este *pool* que presenten un alto flujo de consumo de galactosa por efecto de la sobre-expresión de *Galk1*, generando un metabolismo ineficiente y con ello síntesis de lactato al nivel extracelular, o bien, que el efecto de la sobre-expresión de esta enzima genere un metabolismo mejorado de galactosa de forma de que no se requiera un una fuente de carbono adicional para mantener el metabolismo celular.

Otro punto a analizar es el comportamiento de estas células en medio que contiene galactosa como única fuente de carbono (Figura 3.5). En él las células CHO-Galk1

presentaron crecimiento celular, al contrario de lo observado en las células *wild-type* las que no lograron subsistir en este medio (Figura 3.3). El *pool* de células obtenidas alcanza una densidad celular del orden de $0,5 \times 10^{-6}$ [cel/mL] a las 70 horas, luego de lo cual comienzan una rápida fase de muerte celular la que finaliza a las 160 horas, donde se observa una viabilidad del orden del 20% (Información no incluida en la figura). Durante este tiempo, el *pool* de clones consume galactosa, sin agotar su existencia en el medio de cultivo, produciendo como consecuencia una acumulación de lactato que se mantiene constante en 5 [mM]. Esta concentración es menor a la reportada como inhibitoria en cultivos de células animales (Lao & Toth, 1997) y corresponde a un 33% de la concentración máxima de este metabolito en cultivos con glucosa como única fuente de carbono (Figura 3.3). Este comportamiento es consistente con la existencia de un metabolismo mejorado de galactosa debido a la sobre-expresión de la galactoquinasa 1.

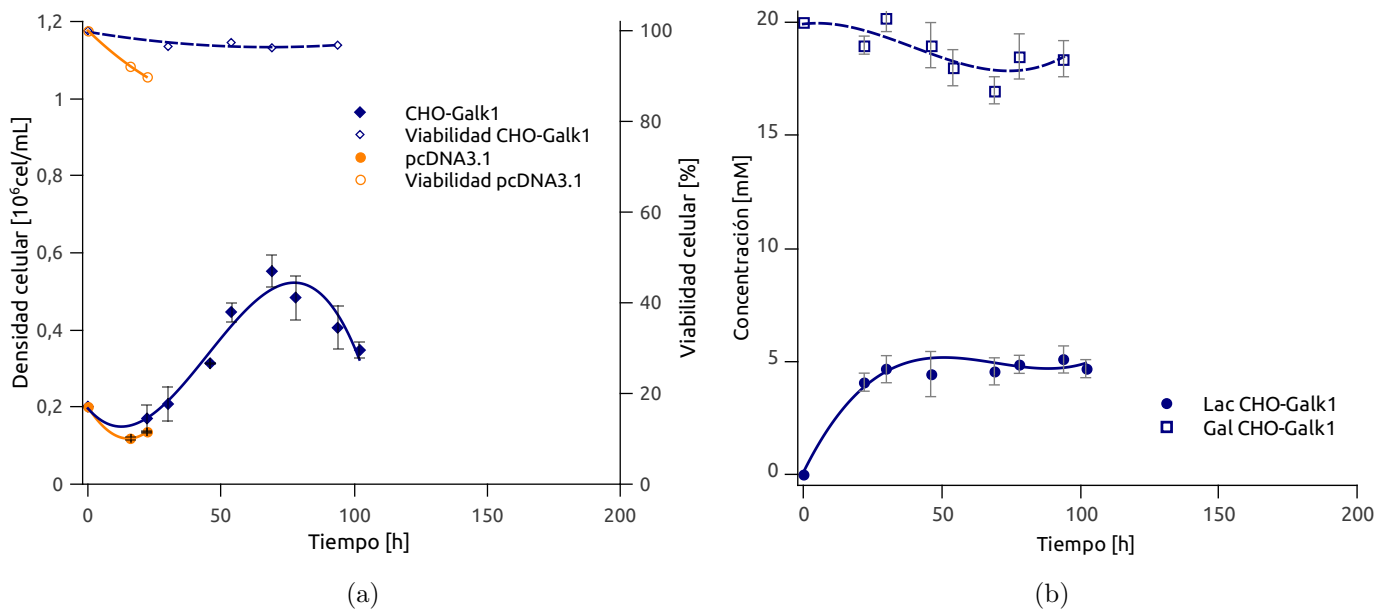


Figura 3.5: Curva de crecimiento de *pool* de clones Galk1 en medio Gal20: (a): densidad celular, (b): concentración de lactato.

Tabla 3.3: Parámetros μ_{\max} y $\Delta L/\Delta Hex$ para cultivos utilizando el *pool* de células CHO-Galk1.

Cultivo	μ_{\max} [$10^{-2}/h$]		$\Delta L/\Delta Hex$	
	Glc	Gal	Glc	Gal
GG6/14	1,62	1,3	1,22	-1,35
Gal20	-	1,4	-	0,27
GG6/14 pcDNA (Control)	3,1	1,82	0,78	

3.2.3.1 Comportamiento de los clones seleccionados

Con estos antecedentes se aislan clones individuales, para lo cual se pre-seleccionan 20 clones, de éstos 8 son elegidos de acuerdo al criterio que minimiza la razón ΔL /densidad celular (Figura D.1 en Apéndices). Las curvas de crecimiento de los clones seleccionados (1-5, 12, 15, 19) se presentan en la Figura D.2 (Ver Apéndices). A partir de estos resultados se seleccionan los clones 1, 2 y 5 utilizando como criterio la maximización de la concentración celular alcanzada por los distintos clones en cultivo.

Los clones CHO-Galk1-1, 2 y 5 alcanzan una mayor densidad celular que el *pool* previamente analizado en medio GG6/14 (Figura 3.6), llegando a duplicar este parámetro para el caso del clon 2 (CHO-Galk1-2). Esto es esperable debido a que se han aislado los clones que se ajustan al objetivo deseado: células que alcancen una mayor densidad celular y que acumulen bajas concentraciones de lactato.

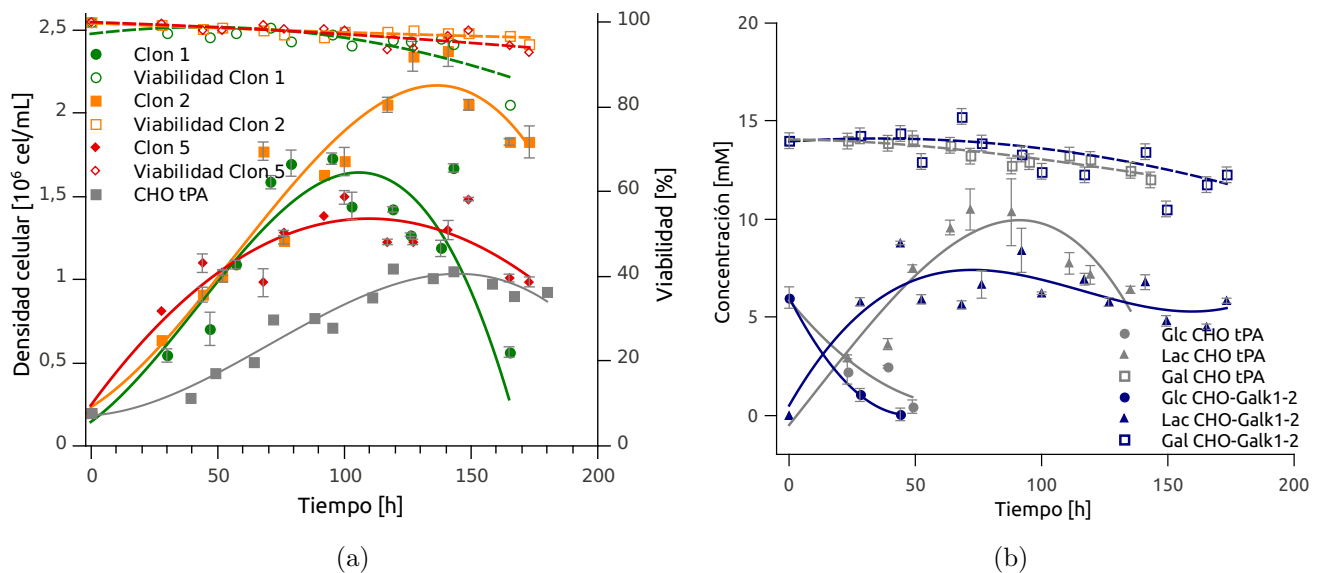


Figura 3.6: Curva de crecimiento para clones CHO-Galk1 seleccionados en medio GG6/14: (a): densidad celular, (b): concentración de galactosa, glucosa y lactato para el clon seleccionado y el control¹.

Adicionalmente, los cultivos realizados presentan un aumento en su velocidad de crecimiento (μ_{\max}) en la fase de consumo de glucosa (Tabla 3.4) con respecto a los valores calculados para el *pool* (Tabla 3.3), llegando a superar los valores calculados para el control en esta etapa. El mayor aumento registrado corresponde al presentado por CHO-Galk1-2 con un 14%, el que se observa claramente en la densidad celular alcanzada luego del agotamiento de esta fuente de carbono: $1,02 \times 10^6$ [cel/mL] para este clon y $0,5 \times 10^6$ [cel/mL] para las

¹Los perfiles de concentración para galactosa, glucosa y lactato de los clones no seleccionados se encuentran en la sección de Apéndices, Figura D.3

células no transfectadas.

Esta diferencia no es el comportamiento esperado al sobre-expresar este gen, dado que el transporte de galactosa es inhibido por la presencia de glucosa en el medio de cultivo (Uldry & Thorens, 2004); información acorde a lo presentado en la Figura 3.6, por lo que en esta fase la concentración de galactosa debería ser muy baja a nivel intracelular.

Sin embargo, se ha reportado que algunas variedades de galactoquinasas (en particular GalkSPe4 proveniente de *Streptococcus pneumoniae* TIGR4) puede aceptar como sustrato galactosa, glucosa e incluso N-acetilgalactosamina (GalNAc) (Zou et al., 2012). Esta enzima posee un 37% de homología respecto a GALK1 expresada en *Mus musculus* de acuerdo a lo arrojado por un alineamiento específico para *S. pneumoniae*, la que no considera si el mayor porcentaje de similitud entre ambas enzimas se encuentra en algún sitio de importancia para su especificidad tal como el sitio de unión a sustrato. Por lo tanto existe la posibilidad de que esta enzima se encuentre catalizando una reacción de fosforilación de glucosa alterando el metabolismo celular. Esta alternativa será discutida posteriormente en la Sección 3.3.

Para la fase de consumo de galactosa, sólo el clon CHO-Galk1-2 presentó una velocidad de crecimiento superior a la observada en el control (Tabla 3.2), correspondiendo a un aumento del 35%. Al comparar este parámetro con el calculado para el pool de células transfectadas (Tabla 3.3) no se encuentra una variación de la tasa específica de crecimiento, lo que se relaciona directamente con el criterio de selección elegido, donde se considera tanto la velocidad de crecimiento (reflejada en la densidad celular alcanzada en los cultivos celulares) como la producción de lactato como un indicador de la eficiencia del metabolismo.

En la fase de consumo de galactosa, todos los clones presentan un valor de $\Delta L/\Delta Gal$ negativo (Tabla 3.5), pero en menor medida al obtenido para cultivos *wild-type*. En particular para CHO-Galk1-2 se tiene la menor magnitud de este parámetro, teniéndose una disminución del 99,7% en relación a lo obtenido para el control. Se postula que puesto que este clon presenta un metabolismo mejorado de galactosa no requiere del consumo de lactato como fuente adicional de energía para la mantención del cultivo de la misma forma que este requerido por las células no transfectadas. Cabe destacar que esta modificación no es suficiente para alterar el metabolismo de forma de generar clones con altas velocidades de crecimiento y consumo ineficiente de galactosa asociado a una alta producción de lactato, así como se observa para las células sin transfectar en glucosa.

Al igual que el *pool* CHO-Galk1, estas células son capaces de crecer en medio Gal20 (Figura 3.7), donde mantienen su viabilidad durante 100 horas aproximadamente, tiempo en el que alcanzan una densidad celular de $0,8 \times 10^6$ [cel/mL] correspondiente al 160% de la alcanzada por CHO-Galk1 previo a la selección en este medio de cultivo. Adicionalmente, los clones obtenidos no presentan acumulación de lactato en este medio de cultivo, presentando un $\Delta L/\Delta Gal$ máximo de 0,12 (Tabla 3.4), lo que refleja la efectividad de la sobre-expresión del gen de la galactoquinasa en el cultivo de células animales. El aumento de niveles de Galk1 genera un metabolismo más eficiente, en el cual toda o la mayor parte de la galactosa consumida es destinada a mantener el metabolismo y soportar el crecimiento

celular (Jimenez et al., 2011).

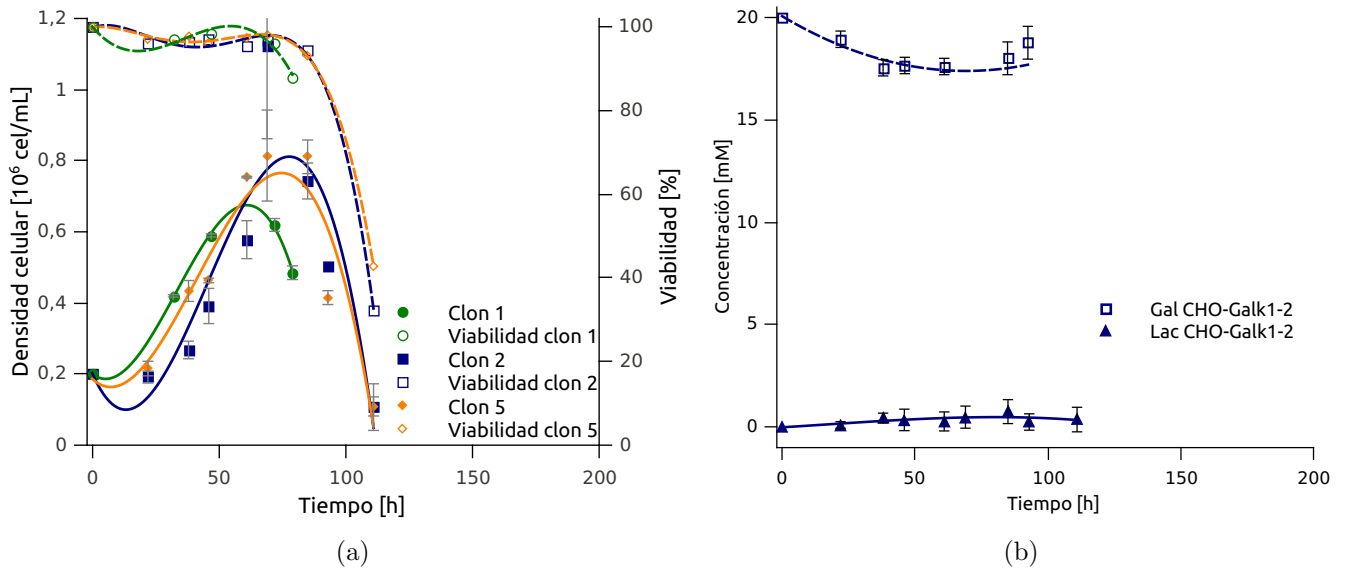


Figura 3.7: Curva de crecimiento de *pool* de clones Galk1 en medio Gal20: (a): Densidad celular clones 1, 2 y 5 (b) concentración de galactosa y lactato para el clon seleccionado (CHO-Galk1-2)².

Tabla 3.4: Parámetros μ_{\max} para clones CHO Galk1 seleccionados.

Clon	μ_{\max} [10 ⁻² /h]	
	GG6/14 Glc	Gal20 Gal
Clon 1	2,49	0,85
Clon 2	2,74	1,36
Clon 5	1,9	0,62
CHO tPA	2,4	0,93

Los efectos positivos de la sobre-expresión de este gen confirman la hipótesis previa de que la fosforilación de la galactosa corresponde a un paso limitante del metabolismo de esta hexosa, por lo que con su expresión aumenta la disponibilidad de galactosa-1-fosfato, que mediante la acción de la uridiltransferasa ingresa a glucólisis en forma de glucosa-1-fosfato (Figura 1.4).

La reacción catalizada por *Galk1* está asociada al gasto de una molécula de ATP (Holden et al., 2004). Este punto es de gran importancia dado que si esta reacción no correspondiera

²Los perfiles de concentración para galactosa, glucosa y lactato de los clones no seleccionados se encuentran en la Figura D.4

a un cuello de botella del metabolismo, podría producirse un gasto innecesario de energía en este proceso, lo que tendría efectos perjudiciales para la eficiencia del metabolismo y el desarrollo del cultivo celular.

Tabla 3.5: Cálculo de $\Delta L/\Delta Hex$ para clones CHO Galk1 seleccionados.

Clon	$\Delta L/\Delta Hex$		
	GG6/14		Gal20
	Glc	Gal	
Clon 1	1,46	-0,26	0,03
Clon 2	1,5	-0,07	0,08
Clon 5	1,84	-1,25	0,12
CHO tPA	1,2	-2,5	-

3.2.3.2 Síntesis de producto recombinante (tPA)

En base a los resultados obtenidos, se analiza la concentración de producto en los cultivos realizados para el clon seleccionado (CHO-Galk1-2) y el control, los que se presentan en la Figura 3.8a. Allí se observa que la línea celular modificada produce una mayor concentración de tPA llegando a un máximo del 142% del control. Sin embargo, las células CHO-Galk1-2 presentan menor concentración específica de tPA debido a las altas densidades alcanzadas en cultivo (Figura 3.8b).

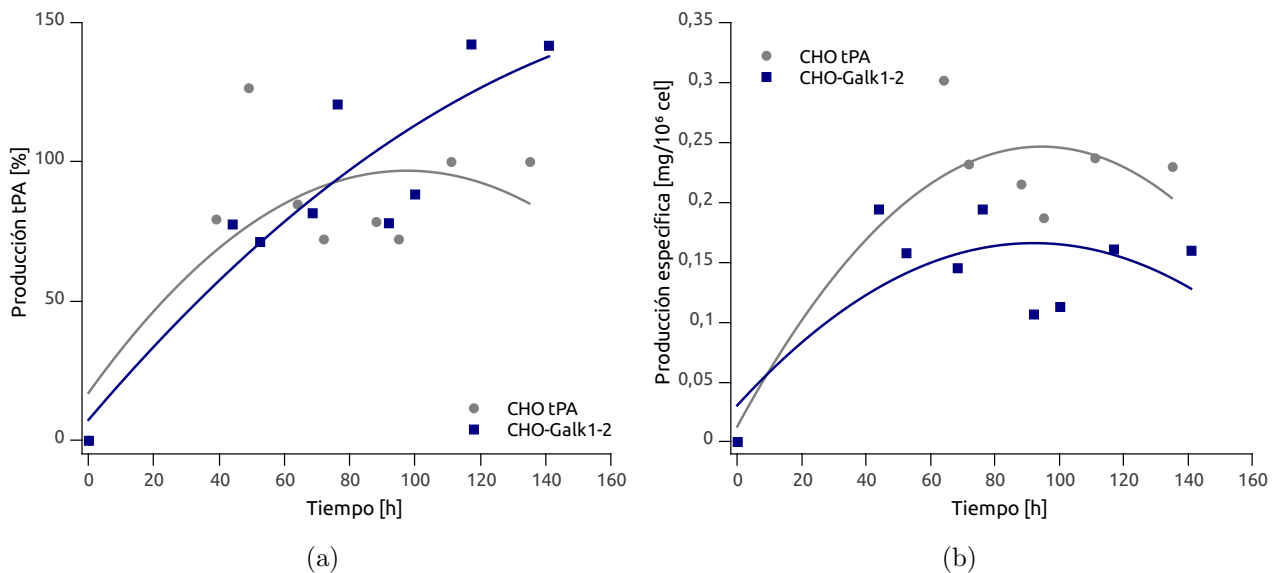


Figura 3.8: Producción de tPA en cultivos realizados con medio GG6/14 para el clon seleccionado CHO-Galk1-2 y control (CHO tPA): (a): concentración relativa al control, (b): producción específica

Respecto a este último punto, existen antecedentes que relacionan la velocidad específica de crecimiento y la producción de tPA de una forma inversamente proporcional (Takagi et al., 2001), lo que concuerda con lo presentado anteriormente (Tabla 3.4, Figura D.5). La línea celular modificada CHO-Galk1 presenta una mayor velocidad específica de crecimiento en la fase de galactosa, por lo que en esta etapa la maquinaria celular está enfocada en la síntesis de biomasa más que en la síntesis de producto.

3.2.4 Transportador de galactosa GLUT8 (*Slc2a8* y co-expresión *Galk1-Slc2a8*)

Luego de la obtención del plasmidio que expresa el gen del transportador de galactosa *Slc2a8* se procede a utilizarlo para la transfección de células CHO. El *pool* de clones obtenidos posterior a la selección con antibiótico, no fue capaz de sobrevivir en cultivo, presentando una viabilidad menor al 80% a las 72 [h] transcurridas del cultivo celular en medio GG6/14. Adicionalmente se realizó la co-transfección de ambos genes obteniéndose resultados similares.

El efecto negativo que tiene la sobre-expresión de este gen en el metabolismo celular, puede relacionarse con un transporte descontrolado de glucosa y galactosa hacia el medio intracelular debido a una gran cantidad de proteínas transportadoras presentes en la membrana plasmática. Una alta disponibilidad a nivel citoplasmático de estas fuentes de carbono podría traducirse en un alto flujo en glucólisis, el que como se mencionó anteriormente dirige el exceso de carbonos hacia una acumulación de lactato y a la muerte celular por el agotamiento de estos azúcares en el medio de cultivo.

A pesar de los resultados desfavorables en los puntos previamente mencionados, se continuará con el desarrollo de estudios para la sobre-expresión de este gen, debido al potencial teórico que éste tiene al aumentar la disponibilidad a nivel intracelular de galactosa (Wlaschin & Hu, 2007), lo que junto a la sobre-expresión del gen que codifica para la galactoquinasa podría tener efectos positivos en la eficiencia del metabolismo de la galactosa en cultivo.

Una alternativa para cumplir con este objetivo sería tener algún grado de control sobre la expresión de la enzima de interés lo que puede ser logrado mediante la implementación de un sistema que permita inducir la síntesis de la proteína, o bien promotores que generen clones con menor expresión del gen estudiado.

3.3 Análisis de flujos metabólicos

En base a los resultados obtenidos, se procedió a realizar un análisis de los flujos metabólicos presentes en los distintos cultivos obtenidos. Con este fin, se selecciona el clon 2 para realizar un estudio comparativo en relación al control (CHO tPA: Figura 3.3) en medio GG6/14. Los tiempos estudiados corresponden a los que se encuentran en la mitad de la

fase exponencial para el crecimiento en glucosa (49 y 44 [h]) y en galactosa (111 y 92 [h]). Los valores obtenidos son utilizados para resolución del análisis de flujos metabólicos, cuyos resultados se presentan en la Figura 3.9.

Tabla 3.6: Tasas específicas para análisis de flujo metabólico en [mmol/10⁹ células/h].

Especies	CHO tPA	GG6/14	CHO-Galk1-2	GG6/14
	49 [h]	111 [h]	44 [h]	92 [h]
tPA	$7,21 \times 10^{-4}$	$4,58 \times 10^{-4}$	$2,15 \times 10^{-4}$	$4,78 \times 10^{-4}$
Biomasa	$1,41 \times 10^{-1}$	$3,99 \times 10^{-2}$	$3,03 \times 10^{-1}$	$3,68 \times 10^{-1}$
Glc/Gal	$-1,00 \times 10^{-1}$	$-1,61 \times 10^{-2}$	$-1,46 \times 10^{-2}$	$-1,53 \times 10^{-1}$
Lac	$3,26 \times 10^{-1}$	$-4,77 \times 10^{-2}$	$5,84 \times 10^{-2}$	$-3,57 \times 10^{-2}$
Ala	$3,70 \times 10^{-4}$	$-3,12 \times 10^{-4}$	$5,33 \times 10^{-4}$	$3,05 \times 10^{-3}$
Arg	$3,13 \times 10^{-3}$	$-7,44 \times 10^{-3}$	$-6,48 \times 10^{-3}$	$-1,14 \times 10^{-3}$
Asn	$-1,07 \times 10^{-3}$	$-5,42 \times 10^{-4}$	$1,75 \times 10^{-4}$	$-1,23 \times 10^{-4}$
Asp	$7,24 \times 10^{-4}$	$-2,02 \times 10^{-3}$	$-2,99 \times 10^{-5}$	$2,42 \times 10^{-3}$
Cys	$6,10 \times 10^{-3}$	$-4,17 \times 10^{-3}$	$-4,5 \times 10^{-3}$	$-9,79 \times 10^{-5}$
Gln	$-7,15 \times 10^{-3}$	$-4,71 \times 10^{-2}$	$-3,19 \times 10^{-2}$	$-3,72 \times 10^{-2}$
Glu	$7,17 \times 10^{-3}$	$-5,58 \times 10^{-3}$	$1,13 \times 10^{-3}$	$1,41 \times 10^{-4}$
Gly	$-1,07 \times 10^{-2}$	$-3,19 \times 10^{-2}$	$-8,91 \times 10^{-4}$	$-2,21 \times 10^{-1}$
His	$-2,46 \times 10^{-3}$	$-3,25 \times 10^{-4}$	$-4,22 \times 10^{-3}$	$7,75 \times 10^{-2}$
Ile	$-3,17 \times 10^{-3}$	$-3,80 \times 10^{-3}$	$-3,34 \times 10^{-3}$	$-2,58 \times 10^{-2}$
Leu	$2,23 \times 10^{-2}$	$-1,40 \times 10^{-2}$	$-9,27 \times 10^{-4}$	$-1,99 \times 10^{-2}$
Lys	$-1,89 \times 10^{-2}$	$8,04 \times 10^{-2}$	$-6,53 \times 10^{-2}$	$-1,4 \times 10^{-2}$
Met	$-1,32 \times 10^{-2}$	$1,72 \times 10^{-3}$	$-4,06 \times 10^{-4}$	$-1,88 \times 10^{-2}$
Phe	$3,34 \times 10^{-3}$	$1,20 \times 10^{-2}$	$-4,81 \times 10^{-4}$	$-2,07 \times 10^{-3}$
Pro	$-5,04 \times 10^{-2}$	$7,44 \times 10^{-3}$	$-1,33 \times 10^{-2}$	$2,58 \times 10^{-2}$
Ser	$-1,07 \times 10^{-3}$	$-5,42 \times 10^{-4}$	$1,75 \times 10^{-4}$	$-1,23 \times 10^{-5}$
Thr	$-5,61 \times 10^{-2}$	$8,44 \times 10^{-3}$	$-1,76 \times 10^{-3}$	$-4,17 \times 10^{-4}$
Tyr	$4,23 \times 10^{-3}$	$-4,46 \times 10^{-3}$	$-3,58 \times 10^{-3}$	$-8,78 \times 10^{-4}$
Val	$-1,01 \times 10^{-2}$	$-2,75 \times 10^{-2}$	$-2,44 \times 10^{-3}$	$-1,4 \times 10^{-3}$

Las tasas específicas de consumo y producción de aminoácidos y fuentes de carbono presentan comportamientos similares a los reportados en literatura en orden de magnitud y comportamiento general en la tendencia a consumo o producción de las distintas etapas de cultivo (Altamirano et al., 2006; Wilkens et al., 2011), con diferencias marcadas para el caso de la producción de biomasa asociada al crecimiento celular y a los valores correspondientes a la línea celular CHO-Galk1 (Tabla 3.6).

Las células control presentan el comportamiento esperado de acuerdo a lo expuesto en la literatura (Altamirano et al., 2006; Wilkens et al., 2011). Durante la fase de consumo de glucosa, la metabolización ineficiente de esta hexosa lleva a una acumulación de piruvato que no es requerida para la mantención de la maquinaria celular. Este flujo de carbonos

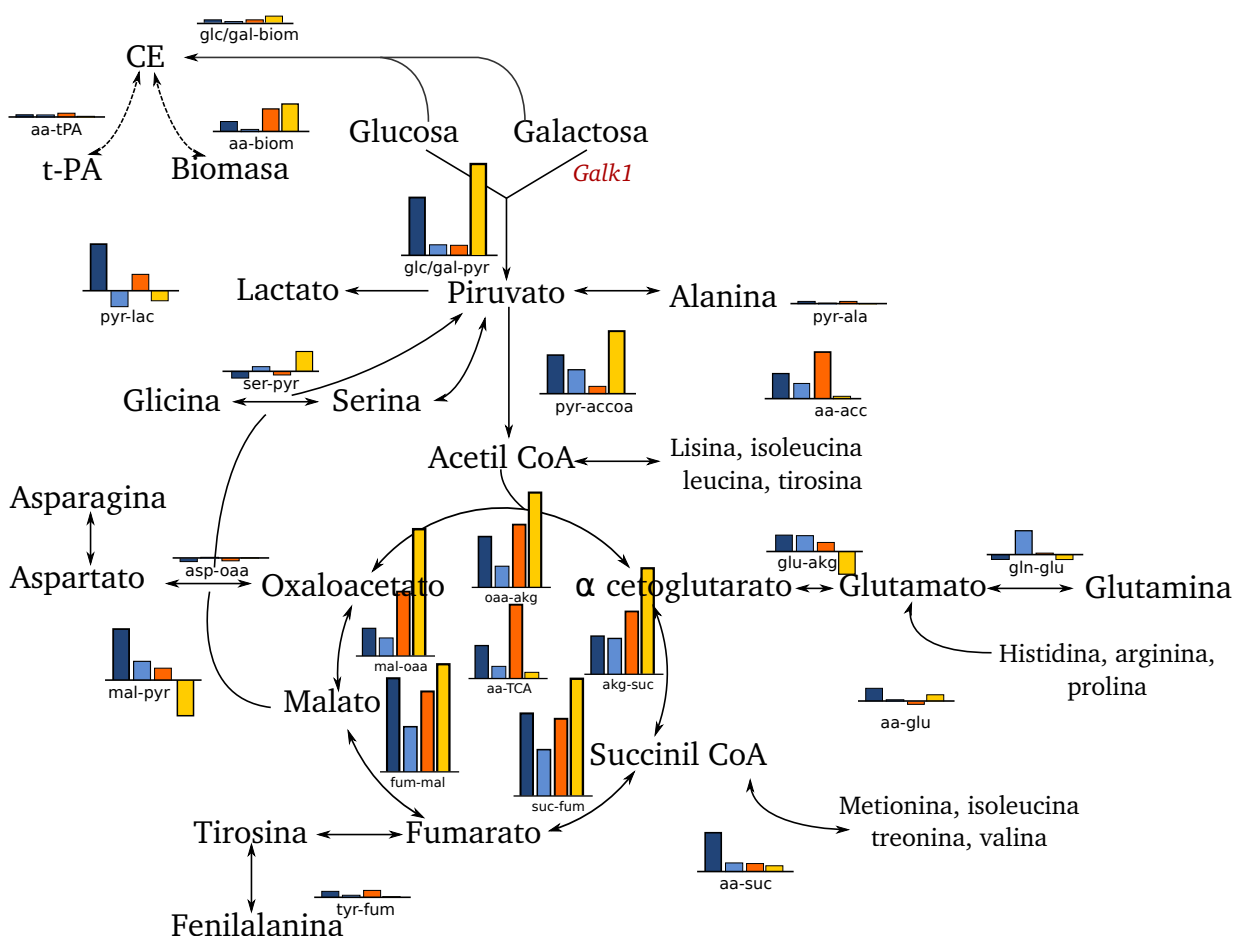


Figura 3.9: Análisis de flujos metabólicos para cultivo control (CHO tPA) en fase de crecimiento en glucosa (■) y galactosa (■) y para CHO-Galk1-2 (■ glc y ■ gal).

es canalizado hacia la formación de alanina y, en mayor medida, de lactato la cual es característica de esta etapa del cultivo.

Con respecto a la distribución de los flujos de carbono, existe una diferencia entre la fracción de carbonos destinados a la producción de lactato con respecto a los valores descritos en Altamirano et al. (2006), donde se reporta que 97% del piruvato generado en glucólisis es destinado a la síntesis de este metabolito inhibitorio, mientras que en este caso el porcentaje desciende a un 77%. Este comportamiento se repite para otros flujos asociados al nodo de piruvato, tales como la producción de alanina y el ingreso al ciclo de Krebs donde se registran flujos menores con una diferencia de alrededor del 1%. Estas diferencias son asociadas a la mayor tasa específica de producción de biomasa presente en estos cultivos.

La línea celular que sobre-expresa la enzima galactoquinasa presenta menores flujos que

el control, lo que se explica matemáticamente por el hecho de que existe una mayor densidad celular en esta fase. El flujo asociado al consumo de glucosa se encuentra normalizado por la gran cantidad de células presentes en el cultivo. Esto no concuerda con lo esperado en un sentido biológico dado que la sobre-expresión de esta enzima no debería afectar el metabolismo de glucosa, aunque es consistente con lo observado en la Figura 3.6 donde se evidencia un aumento de la densidad celular en el cultivo en la fase de consumo de glucosa.

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que en otros organismos galactokinasa, puede catalizar la fosforilación de glucosa en ausencia de galactosa. Ensayos con *Galk* proveniente de *S. pneumoniae* en presencia de glucosa se observa que durante 20 [h] en condiciones óptimas (45°C, pH 8.0) reacciona con un 25% de este azúcar, obteniéndose como producto glucosa-1-fosfato (Zou et al., 2012; Chen et al., 2011). Este metabolito puede ser utilizado por fosfoglucomutasa para su conversión a glucosa-6-fosfato de forma de ingresar a la glucólisis, reacción que requiere la presencia de α -D-glucosa 1,6 bifosfato (Glc-1,6P₂) para actuar como intermediario en este proceso, de otra forma la conversión se lleva a cabo pero a una menor velocidad (Ray & Roscelli, 1964; Cleland, 1963). Glc-1,6P₂ es producido por la acción de la α -D-glucosa 1,6 bifosfato sintetasa y no es utilizado por ninguna otra reacción en el metabolismo de *Mus musculus* (Kammen & Koo, 1969). Por lo tanto, existe la posibilidad de que esa reacción se realice lentamente al no sintetizarse el intermediario, o que se produzca Glc-1,6P₂, el que al no ser utilizado por otra vía metabólica se acumule a nivel intracelular.

Además, glucosa-1-fosfato puede ser utilizada como sustrato para distintas vías metabólicas tales como la síntesis de aminoácidos, nucleótidos, e incluso reacciones asociadas al metabolismo de galactosa, por lo que esta alteración podría afectar otros procesos no contemplados específicamente en el modelo previamente planteado.

Otra posibilidad que podría explicar este comportamiento sería que la enzima sobre-expresada sea similar a otra presente en el metabolismo de glucosa. Para descartar esta teoría se realiza un análisis de homología en el cual sólo se comprueba su similitud con Galactoquinasa 2 en *Mus musculus*.

Para ser concluyente respecto a este tópico es necesario realizar un análisis de flujos metabólicos con un modelo que incluya estas reacciones, sin embargo la hipótesis de acumulación de Glc-1,6P₂ se contradice con el supuesto de estado estacionario para los flujos intracelulares del sistema, por lo que se requerirían de mediciones específicas tanto para este metabolito como para glucosa-1-fosfato para corroborar los supuestos previamente elaborados.

Además de la diferencia asociada al flujo de carbonos a través de glucólisis, la que se traduce en una menor acumulación de lactato, la línea celular CHO-Galk1 presenta una alta actividad en el ciclo de Krebs asociada a altas tasas de ingreso de aminoácidos al ciclo por parte de lisina, isoleucina, leucina y tirosina (Figura 3.9). La mayor diferencia registrada se encuentra en la reacción entre malato y oxaloacetato donde el flujo registrado por CHO-Galk1 corresponde a un 280% del control lo que es consistente con un menor

flujo en la reacción conocida como *malate shunt* por parte de la línea celular modificada. Esta reacción corresponde a un regulador de la actividad del ciclo, lo que sugiere que el aumento de flujo en el ciclo de Krebs es requerido por el metabolismo para su mantención y crecimiento de CHO-Galk1-2.

El cultivo que sobre-expresa la enzima galactoquinasa, presenta mayor síntesis de biomasa como producto de los flujos de glucosa y aminoácidos hacia el crecimiento celular, lo que es consistente con lo observado en la Figura 3.6a. Por el contrario, la producción de tPA es similar a la observada para el cultivo control en esta etapa (Figura 3.8). Esta información es consistente con lo expuesto en la literatura, donde se afirma que la mantención del metabolismo celular posee una mayor prioridad que la síntesis de biomasa (Wilkins et al., 2011) y de producto recombinante (Takagi et al., 2001). En este caso se observa un metabolismo que se centra en la mantención y síntesis de biomasa, pero no de producto.

Luego del consumo de la glucosa presente en el medio se inicia una segunda fase de crecimiento, donde un bajo consumo de galactosa se traduce en una baja disponibilidad de piruvato para la producción de ATP, lo que gatilla la inversión de la reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa, provocando el consumo de lactato para la producción del precursor del ciclo de Krebs, fenómeno conocido como *shift* metabólico. Esto se observa tanto para CHO tPA como para CHO-Galk1-2, en menor medida, a pesar de que esta línea celular presenta un alto consumo de la fuente principal de carbono.

En particular para el caso de las células CHO tPA, el 40% del flujo de los carbonos que ingresan al ciclo del TCA está dado por el piruvato producido en la reacción catalizada por LDH, valor similar al reportado en otras publicaciones (47% Altamirano et al. (2006) y 46,4% Wilkins et al. (2011)).

La síntesis de lactato mediante lactato deshidrogenasa (LDH) es realizada con el fin de restaurar el poder reductor consumido en la vía de glucólisis (Costa Leite et al., 2007). Si en esta fase tenemos un mayor flujo de asociado a la síntesis de piruvato mediante glucólisis surge la interrogante de por qué se mantiene el *shift* metabólico observado en el control. Se han realizado modificaciones al metabolismo celular de forma de inhibir la producción de esta enzima mediante un *knock-out* por recombinación homóloga, observándose como resultado bajas velocidades de crecimiento asociadas al desbalance redox generado como consecuencia de la inhibición de esta reacción (Chen et al., 2001).

Adicionalmente, la reacción de salida del ciclo de Krebs mediante malato posee un flujo negativo con lo que se tiene un ingreso adicional de carbonos al ciclo del TCA y la producción de NAD^+ asociada a esta reacción, de forma de ayudar a restaurar el balance redox producido por el consumo de lactato y un alto flujo en la vía glicolítica. Este balance puede restaurarse por la oxidación de NADH en la fosforilación oxidativa que se lleva a cabo en la mitocondria (Kanehisa et al., 2012; Kanehisa & Goto, 2000).

Para el caso de la línea celular modificada, se presentan altos flujos asociados al metabolismo central de carbono. Al contrario de lo observado en caso del control, en

particular para la glucólisis, donde se presenta un aumento del 60% en la cantidad de carbonos circulantes por esta vía. En el ciclo de Krebs el aumento de flujos llega a ser hasta de un 7 veces para el caso de la reacción entre malato y oxaloacetato. Este aumento en los flujos del metabolismo central de carbono se ve reflejado en una alta producción de biomasa y velocidad de crecimiento celular.

Esta etapa se encuentra caracterizada por una menor tasa de consumo de aminoácidos, la que se debe en parte a menores concentraciones presentes en el medio como consecuencia del crecimiento celular. Por esto las entradas al ciclo se encuentran en mayor medida asociadas al ingreso carbonos mediante Acetil CoA. El exceso de carbonos en esta vía es llevado a piruvato, por la salida de carbonos desde malato a piruvato (*malate shunt*), mediante la acción de la enzima piruvato carboxilasa. Este flujo ha sido reportado como un regulador del ciclo de Krebs puesto que desvía carbonos de esta vía manteniendo una cantidad de carbono necesario para la mantención de la maquinaria celular (Wilkins et al., 2011). El flujo asociado a esta reacción se invierte en la fase de consumo de galactosa de tal forma de alimentar al ciclo del TCA.

Adicionalmente glutamina, que corresponde a una fuente adicional de carbono y nitrógeno para la fase de consumo de glucosa en el cultivo de control, es relegada a un aspecto secundario debido a los altos flujos presentados en el ciclo del TCA por el ingreso de acetil CoA vía piruvato.

En esta etapa el flujo de síntesis de producto llega a ser cerca del 260% de lo presente en esta fase para el control, al igual que la producción de biomasa que aumenta en un 77%, con lo que los cultivos alcanzan altas concentraciones. Esto puede ser explicado por el porcentaje importante de carbono destinado al ingreso al ciclo de krebs con el fin de generar energía para el crecimiento celular.

Una de las principales motivaciones de este trabajo corresponde a mejorar el rendimiento de cultivos en galactosa considerando el metabolismo en glucosa como caso base, en el que existe una alta actividad glucolítica que se traduce en una alta velocidad de crecimiento (Bonarius et al., 1996), y como consecuencia gran acumulación de lactato lo que inhibe el crecimiento celular.

La línea celular obtenida presenta altas velocidades de crecimiento, como consecuencia de un gran flujo en glucólisis que corresponde al 130% de lo observado en CHO tPA en la fase de consumo de glucosa. Por otro lado, el aumento de actividad en el ciclo de Krebs llega a superar las 5 veces con respecto al control estudiado en la reacción entre malato y oxaloacetato (Figura 3.9). Estos aumentos se traducen en mayor crecimiento celular, con lo que hay un aumento de la síntesis de proteína recombinante a nivel absoluto pero no en un nivel específico a las altas densidades celulares alcanzadas en este cultivo (Figura 3.6a).

4 | Conclusiones

Cultivos en alta concentración de glucosa presentan un metabolismo ineficiente, lo que tiene como consecuencia la inhibición del crecimiento celular. Al utilizar fuentes de carbono combinadas se produce un *shift* metabólico que permite una extensión de la viabilidad del cultivo celular.

La sobre-expresión de la enzima galactoquinasa (Galk1) tiene efectos positivos en el desempeño de cultivos en medios que contengan esta hexosa como fuente de carbono. Los clones seleccionados alcanzan densidades del orden de 2×10^6 [cel/mL], duplicando lo observado en las células sin transfectar en medio GG6/14. Además, estas células son capaces de crecer en un medio con galactosa como única fuente de carbono, sin acumulación de lactato.

Con respecto a la síntesis del producto recombinante de interés, la concentración obtenida en los cultivos que sobre-expresaban la galactoquinasa aumentó en un 42% con respecto a la observada en las células *wild type* al finalizar el cultivo, observándose un mayor aumento en la tasa de producción de tPA en la fase de crecimiento en galactosa de un 260%. Sin embargo, al realizar un análisis considerando la densidad celular alcanzada por estos cultivos se observa que existe una disminución de la tasa de producción específica con respecto a CHO tPA.

Mediante análisis de flujos metabólicos es posible concluir que la introducción de esta modificación afecta directamente el metabolismo central del carbono de las células estudiadas y en menor medida el del consumo y producción de aminoácidos. La línea celular modificada tiene como principal objetivo la producción de energía en el ciclo de Krebs, síntesis de biomasa y de producto.

La sobre-expresión de Galk1 se traduce en un aumento de flujo en la glucólisis tanto para el crecimiento en glucosa como en el de galactosa donde el aumento de flujo llega a ser hasta un 30% en comparación con el metabolismo de células CHO tPA creciendo en glucosa, lo que se traduce en un aumento de la velocidad de crecimiento y de la densidad celular alcanzada por el cultivo de la línea celular modificada.

El clon seleccionado, CHO-Galk1-2, realiza el cambio metabólico asociado al consumo de lactato en la fase de consumo de galactosa, pero este cambio es menor al reportado en células CHO tPA. Se postula que el desbalance redox provocado por esta reacción sería remediado por el flujo existente entre malato y piruvato.

Por otro lado, el análisis correspondiente al desempeño del cultivo CHO-Galk1 en la fase de consumo de glucosa no arrojó resultados concluyentes por lo que se requiere continuar con el estudio de posibles alteraciones adicionales al metabolismo por la sobre-expresión de esta enzima en el metabolismo de glucosa.

Los resultados de la sobre-expresión del transportador de galactosa *Slc2a8* y de la expresión simultánea de Galk1 y el transportador no fueron concluyentes. Se recomienda continuar con su estudio en etapas posteriores, reduciendo los niveles de expresión, utilizando un sistema que permita la inducción de la expresión de los genes de interés o un promotor débil para no generar una sobre producción de esta proteína que altere negativamente el funcionamiento del metabolismo celular.

Dados los resultados obtenidos en relación al comportamiento de los clones seleccionados CHO-Galk1 es posible concluir que la reacción catalizada por la galactoquinasa, corresponde a un paso limitante del metabolismo de la galactosa, con lo que su sobre-expresión altera el metabolismo celular haciéndolo más eficiente en la síntesis de biomasa y producto. Y un candidato factible para la generación de nuevas líneas celulares para la producción de biofármacos.

Referencias

- Altamirano, C., Illanes, A., Becerra, S., Cairó, J. J., & Gòdia, F. (2006). Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *Journal of Biotechnology*, 125(4), 547 – 556.
- Altamirano, C., Paredes, C., Cairó, J. J., & Gòdia, F. (2000). Improvement of CHO cell culture medium formulation: Simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnology Progress*, 16(1), 69 – 75.
- Altamirano, C., Paredes, C., Illanes, A., Cairó, J. J., & Gòdia, F. (2004). Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. *Journal of Biotechnology*, 110(2), 171 – 179.
- Augustin, R., Riley, J., & Moley, K. H. (2005). GLUT8 contains a [DE]XXXL[LI] sorting motif and localizes to a late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic*, 6(12), 1196–1212.
- Bibila, T. A. & Robinson, D. K. (1995). In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production. *Biotechnology Progress*, 11(1), 1–13. PMID: 7765983.
- Boghigian, B. A., Seth, G., Kiss, R., & Pfeifer, B. A. (2010). Metabolic flux analysis and pharmaceutical production. *Metabolic Engineering*, 12(2), 81 – 95. Metabolic Flux Analysis for Pharmaceutical Production Special Issue.
- Bonarius, H. P. J., Hatzimanikatis, V., Meesters, K. P. H., de Gooijer, C. D., Schmid, G., & Tramper, J. (1996). Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balances. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(3), 299–318.
- Butler, M. (2005). Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 283–291. 10.1007/s00253-005-1980-8.
- Chen, K., Liu, Q., Xie, L., Sharp, P. A., & Wang, D. I. C. (2001). Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(1), 55–61.
- Chen, M., lei Chen, L., Zou, Y., Xue, M., Liang, M., Jin, L., yi Guan, W., Shen, J., Wang, W., Wang, L., Liu, J., & Wang, P. G. (2011). Wide sugar substrate specificity of galactokinase from *streptococcus pneumoniae* TIGR4. *Carbohydrate Research*, 346(15), 2421 – 2425.

- Cleland, W. (1963). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: I. nomenclature and rate equations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects*, 67(0), 104 – 137.
- Costa leite, T., Da silva, D., Guimarães coelho, R., Zancan, P., & Sola-penna, M. (2007). Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis. *Biochem J*, 408(1), 123–130.
- Craik, J. & Elliott, K. (1980). Transport of D-fructose and D-galactose into isolated rat hepatocytes. *The Biochemical Journal*, 192(1), 373–375.
- David L. Nelson, M. M. C. (2008). *Lehninger: Principles of Biochemistry*, (pp. 528–531). W. H. Freeman and Company, fifth edition.
- Deshpande, R. & Heinzle, E. (2004). On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors. *Biotechnology Letters*, 26, 763–767.
- Doege, H., Schürmann, A., Bahrenberg, G., Brauers, A., & Joost, H.-G. (2000). GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(21), 16275–16280.
- Duval, D., Demangel, C., Munier-Jolain, K., Miossec, S., & Geahel, I. (1991). Factors controlling cell proliferation and antibody production in mouse hybridoma cells: I. influence of the amino acid supply. *Biotechnology and Bioengineering*, 38(6), 561–570.
- Eagle, H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122(3168), 501–504.
- Eagle, H., Barban, S., Levy, M., & Schulze, H. O. (1958). The utilization of carbohydrates by human cell cultures. *Journal of Biological Chemistry*, 233(3), 551–558.
- Enders, J. F., Weller, T. H., & Robbins, F. C. (1949). Cultivation of the lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science*, 109(2822), 85–87.
- Europa, A. F., Gambhir, A., Fu, P.-C., & Hu, W.-S. (2000). Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(1), 25–34.
- Flessner, L. B. & Moley, K. H. (2009). Similar [DE]XXXL[LI] motifs differentially target GLUT8 and GLUT12 in chinese hamster ovary cells. *Traffic*, 10(3), 324–333.
- for Biotechnology Information, N. C. (2011). Gene: Genes and mapped phenotypes.
- Freshney, R. (1998). *Culture of Animal Cells*. New York: Wiley-Liss.
- Gambhir, A., Korke, R., Lee, J., Fu, P.-C., Europa, A., & Hu, W.-S. (2003). Analysis of cellular metabolism of hybridoma cells at distinct physiological states. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(4), 317 – 327.

- Glacken, M. W., Fleischaker, R. J., & Sinskey, A. J. (1986). Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(9), 1376–1389.
- Gray, D., Chen, S., Howarth, W., Inlow, D., & Maiorella, B. (1996). CO₂ in large-scale and high-density CHO cell perfusion culture. *Cytotechnology*, 22, 65–78.
- Gregory N. Stephanopoulos, A. A. A. (1998). *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*, (pp. 309–351). Academic Press, 1 edition.
- Gu, M. B., Todd, P., & Kompala, D. S. (1995). Metabolic burden in recombinant CHO cells: effect of gene amplification and lacZ expression. *Cytotechnology*, 18, 159–166. 10.1007/BF00767763.
- Hacker, D. L., Jesus, M. D., & Wurm, F. M. (2009). 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells – Where do we go from here? *Biotechnology Advances*, 27(6), 1023 – 1027. Biotechnology for the Sustainability of Human Society - Invited Papers from IBS 2008.
- Hassell, T., Gleave, S., & Butler, M. (1991). Growth inhibition in animal cell culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 30, 29–41.
- Hayter, P., Curling, E., Baines, A., Jenkins, N., Salmon, I., Strange, P., & Bull, A. (1991). Chinese hamster ovary cell growth and interferon production kinetics in stirred batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 559–564.
- Hendrick, V., Winnepenninckx, P., Abdelkafi, C., Vandeputte, O., Cherlet, M., Marique, T., Renemann, G., Loa, A., Kretzmer, G., & Werenne, J. (2001). Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis. *Cytotechnology*, 36, 71–83. 10.1023/A:1014088919546.
- Holden, H. M., Thoden, J. B., Timson, D. J., & Reece, R. J. (2004). Galactokinase: structure, function and role in type II galactosemia. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 2471–2484. 10.1007/s00018-004-4160-6.
- Hu, W.-S. (2011). An advanced course in cellular bioprocess technology.
- Ibberson, M., Uldry, M., & Thorens, B. (2000). GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 4607–4612.
- Irani, N., Beccaria, A. J., & Wagner, R. (2002). Expression of recombinant cytoplasmic yeast pyruvate carboxylase for the improvement of the production of human erythropoietin by recombinant BHK-21 cells. *Journal of Biotechnology*, 93(3), 269 – 282.
- Jimenez, N., Wilkens, C., & Gerdtzen, Z. (2011). Engineering CHO cell metabolism for growth in galactose. *BMC Proceedings*, 5(Suppl 8), P119.

- Kammen, H. O. & Koo, R. (1969). Phosphopentomutases: I. identification of two activities in rabbit tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 244(18), 4888–4893.
- Kanehisa, M. & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30.
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2012). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D109–D114.
- Kaufmann, H., Mazur, X., Fussenegger, M., & Bailey, J. E. (1999). Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(5), 573–582.
- Keiding, S. (1973). Galactose elimination capacity in the rat. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 31(3), 319–325.
- Kim, N. S. & Lee, G. M. (2000). Overexpression of bcl-2 inhibits sodium butyrate-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells resulting in enhanced humanized antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 71(3), 184–193.
- Kim, N. S. & Lee, G. M. (2002). Inhibition of sodium butyrate-induced apoptosis in recombinant Chinese hamster ovary cells by constitutively expressing antisense RNA of caspase-3. *Biotechnology and Bioengineering*, 78(2), 217–228.
- Korke, R., de Leon Gatti, M., Lau, A. L. Y., Lim, J. W. E., Seow, T. K., Chung, M. C. M., & Hu, W.-S. (2004). Large scale gene expression profiling of metabolic shift of mammalian cells in culture. *Journal of Biotechnology*, 107(1), 1 – 17.
- Kretzmer (2002). Industrial processes with animal cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 135–142. 10.1007/s00253-002-0991-y.
- Köhler, G. & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495–497.
- Lao, M.-S. & Toth, D. (1997). Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology Progress*, 13(5), 688–691.
- Laubach, V. E., Garvey, E. P., & Sherman, P. A. (1996). High-level expression of human inducible nitric oxide synthase in chinese hamster ovary cells and characterization of the purified enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218(3), 802 – 807.
- Lisinski, I., Schürmann, A., Joost, H. G., Cushman, S. W., & Al-Hasani, H. (2001). Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells. *Biochem. J.*, 358(2), 517–522.
- Ljunggren, J. & Häggström, L. (1994). Catabolic control of hybridoma cells by glucose and glutamine limited fed batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(7), 808–818.

- Matasci, M., Hacker, D. L., Baldi, L., & Wurm, F. M. (2008). Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects. *Drug Discovery Today: Technologies*, 5(2-3), e37 – e42. Protein therapeutics.
- Miller, W. M., Blanch, H. W., & Wilke, C. R. (1988). A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: Effect of nutrient concentration, dilution rate, and ph. *Biotechnology and Bioengineering*, 32(8), 947–965.
- Moore, A., Mercer, J., Dutina, G., Donahue, C. J., Bauer, K. D., Mather, J. P., Etcheverry, T., & Ryll, T. (1997). Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures. *Cytotechnology*, 23, 47–54. 10.1023/A:1007919921991.
- Neermann, J. & Wagner, R. (1996). Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *Journal of Cellular Physiology*, 166(1), 152–169.
- Omasa, T., Higashiyama, K.-I., Shioya, S., & Suga, K.-i. (1992). Effects of lactate concentration on hybridoma culture in lactate-controlled fed-batch operation. *Biotechnology and Bioengineering*, 39(5), 556–564.
- Ozturk, S. S. & Palsson, B. O. (1990). Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: effect of media type, ph, and serum concentration. *Biotechnology Progress*, 6(2), 121–128.
- Pascoe, D. E., Arnott, D., Papoutsakis, E. T., Miller, W. M., & Andersen, D. C. (2007). Proteome analysis of antibody-producing CHO cell lines with different metabolic profiles. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(2), 391–410.
- Ray, W. J. & Roscelli, G. A. (1964). A kinetic study of the phosphoglucomutase pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 239(4), 1228–1236.
- Scheepers, A., Joost, H., & Schürmann, A. (2004). The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 28(5), 364–371.
- Schell, M. A. & Wilson, D. B. (1979). Purification of galactokinase mRNA from *saccharomyces cerevisiae* by indirect immunoprecipitation. *Journal of Biological Chemistry*, 254(9), 3531–6.
- Schmidt, S., Joost, H.-G., & Schürmann, A. (April 2009). GLUT8, the enigmatic intracellular hexose transporter. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 296(4), E614–E618.
- Schmidt, U., Briese, S., Leicht, K., Schürmann, A., Joost, H.-G., & Al-Hasani, H. (2006). Endocytosis of the glucose transporter GLUT8 is mediated by interaction of a dileucine motif with the β 2-adaptin subunit of the AP-2 adaptor complex. *Journal of Cell Science*, 119(11), 2321–2331.

- Takagi, M., Hia, H. C., Jang, J. H., & Yoshida, T. (2001). Effects of high concentrations of energy sources and metabolites on suspension culture of Chinese hamster ovary cells producing tissue plasminogen activator. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(5), 515 – 521.
- Uldry, M. & Thorens, B. (2004). The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 448, 259–260. 10.1007/s00424-004-1264-7.
- Walker, D. G. & Khan, H. H. (1968). Some properties of galactokinase in developing rat liver. *Biochem. J.*, 108(2), 169–175.
- Wilkens, C., Altamirano, C., & Gerdtzen, Z. (2011). Comparative metabolic analysis of lactate for CHO cells in glucose and galactose. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16, 714–724. 10.1007/s12257-010-0409-0.
- Wlaschin, K. F. & Hu, W.-S. (2007). Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport. *Journal of Biotechnology*, 131(2), 168 – 176.
- Xie, L. & Wang, D. I. C. (1994). Fed-batch cultivation of animal cells using different medium design concepts and feeding strategies. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(11), 1175–1189.
- Yang, M. & Butler, M. (2000). Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(4), 370–380.
- Zhou, W., Chen, C.-C., Buckland, B., & Aunins, J. (1997). Fed-batch culture of recombinant NS0 myeloma cells with high monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(5), 783–792.
- Zhou, W., Rehm, J., & Hu, W.-S. (1995). High viable cell concentration fed-batch cultures of hybridoma cells through on-line nutrient feeding. *Biotechnology and Bioengineering*, 46(6), 579–587.
- Zou, Y., Wang, W., Cai, L., Chen, L., Xue, M., Zhang, X., Shen, J., & Chen, M. (2012). Substrate specificity of galactokinase from streptococcus pneumoniae TIGR4 towards galactose, glucose, and their derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22(10), 3540 – 3543.

Anexos

A Protocolos para la preparación de constructos genéticos

A.1 Digestiones y reacciones de PCR

Tabla A.1: Digestión para la extracción del gen de la galactoquinasa (*Galk1*)

Reactivo	Volumen [μL]
DNA	10
BAMHI	1
EcoRI	1
BSA	0.5
Buffer EcoRI 10x	5
H ₂ O	32.5
Total	50

Tabla A.2: Ligación del gen *Galk1* con su vector de expresión

Reactivo	Volumen [μL]
Buffer 5x	4
Inserto	8
Vector	2
Ligasa	0.5
H ₂ O	5.5
Total	20

Tabla A.3: Reacción de PCR para la integración de sitios de restricción BamHI y XbaI en *Slc2a8*

Reactivo	Volumen [μL]	Paso	Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	Tiempo
Buffer 5x (Taq)	10	1	97	5 m
MgCl ₂ (25 mM)	5	2	97	30 s
dNTPs (10 μM)	1	3	64	30 s
Partidor BamHI -F	2.5	4	68	1 m
Partidor XbaI - R	2.5	5	Volver a paso 2 30 veces	
DNA plasmidial	2.5	6	68	5 min
Taq Polimerasa	0.5	7	4	∞
Agua	26			
Total	50			

Tabla A.4: Ligación de *Slc2a8* a PGEMT-easy

Reactivo	Volumen [μL]
Inserto	7
Ligasa	2
PGEMT-easy	1
Buffer 2x	10
Total	20

Tabla A.5: Protocolo para incorporación de mutaciones en *Slc2a8* utilizando KOD polimerasa

Compuesto	Volumen μL	Paso	Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	Tiempo
Buffer 10x	4	1	94	5 m
MgSO ₄ (25 mM)	1.6	2	94	30 s
dNTPs (10 μM)	0.8	3	57	30 s
Agua	25.4	4	72	2 m
Primer F (10 μM)	1.6	5	Volver a paso 25 veces	
Primer R (10 μM)	1.6	6	94	30 s
DNA	4	7	65	30 s
KOD DNA Polimerasa	1	8	72	2 m
Total	40	9	Volver a paso 6 25 veces	
		10	72	10 m
		11	4	∞

Tabla A.6: Digestión de PGEMT-*Slc2a8*-SR-Mut y pcDNA zeo

Compuesto	Volumen μL
DNA	5
Buffer 10x Tango	2
BamHI	0.5
XbaI	0.5
H ₂ O	12
Total	20

Tabla A.7: Ligación *Slc2a8*-SR-Mut a pcDNA zeo (1 hr a 23°C)

Compuesto	Volumen μL
Buffer 5x	4
Inserto	8
Vector	2
Ligasa	0.5
H ₂ O	5.5
Total	20

A.2 Precipitación de DNA con Etanol frío

1. Se agrega volumen de Buffer Acetato de Sodio 3M pH 7.2 igual al 10% del volumen de la mezcla de DNA
2. Se agrega 3 veces el volumen de etanol absoluto
3. Se deja reposar a -20°C durante toda la noche
4. Se centrifuga a 4°C, 12700 rpm durante 10 a 15 minutos
5. Se retira el sobrenadante con pipeta pasteur
6. Se agregan 500 μL de etanol absoluto al 70% en agua estéril
7. Se centrifuga a 4°C, 12700 rpm durante 10 minutos
8. Retirar el sobrenadante y dejar secar el alcohol
9. Resuspender en agua MiliQ estéril

A.3 Cuantificación y pureza del DNA

1. Se diluyen 5 μL de DNA en 65 μL de agua MiliQ estéril
2. Se mide la absorbancia en cubetas de cuarzo a 260 y 280 nm

3. Se utilizan las siguientes relaciones para el cálculo de pureza y concentración de DNA

$$\text{Pureza} = \frac{\text{OD}(260 \text{ nm})}{\text{OD}(280 \text{ nm})} > 1.8 \quad (\text{A.1})$$

$$[\text{DNA}] = \frac{\text{OD}(260 \text{ nm}) * 5 * 14 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}{0.1} \quad (\text{A.2})$$

B Protocolos cultivo celular

B.1 Preparación de medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado en este trabajo es DMEM/F12(HAM) 1:1, el cual es suplementado de acuerdo a lo expuesto anteriormente en la metodología, para ello se agregan, para cada litro de medio preparado:

- 2,4385 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_4)
- 0,1 mL de etalonamina
- 0,1 g de ácido ascórbico
- 1 μL de solución stock de selenio de sodio (5 g/L)
- 1,65 μL de β -mercaptoetanol
- 0,001 g de putrescina
- 0,384 g de glutamina

Luego de la adición de estos suplementos, el pH del medio es ajustado a 7 y es filtrado. Adicionalmente es necesario agregar una fuente de carbono para el crecimiento celular, para ello se prepara un stock de medio a alta concentración de glucosa y galactosa, de forma de adicionarlos al medio en las proporciones que sean requeridas para la formación de los medios Glc20, Gal20 y GG6/14.

B.2 Subcultivos

Los cultivos son realizados en placas puesto que las células crecen en adhesión, para ello se deben realizar pasajes cada 3 a 4 días como máximo, con el fin de no alterar la viabilidad celular. Para realizar un pasaje es necesario tripsinar las células, para lo cual se deben seguir los siguientes pasos para una placa de 75 cm^2 :

1. Extraer el medio de la placa.
2. Lavar la placa con 5 mL de PBS.
3. Agregar 1 mL de tripsina.

4. Incubar a 37°C durante alrededor de 5 minutos.
5. Mover y golpear suavemente la placa para liberar las células.
6. Resuspender la solución de tripsina y células en medio o suero.
7. Extraer parte de esta solución para determinar su densidad celular (Ver Apéndice B.5).
8. Reinocular las células de forma de tener una densidad celular que se encuentre entre 0,15 y $1,2 \times 10^6$ cel/mL.

B.3 Congelación de células

Para almacenar las células es necesario que éstas se encuentren en la mitad de la fase exponencial de crecimiento. Luego se deben seguir los siguientes pasos:

1. Se tripsinan las células (Apéndice B.2).
2. Se determina su densidad celular (Apéndice B.5).
3. Se prepara el medio de congelación consistente en:
 - 1 mL de DMSO
 - 1 mL de suero fetal bovino
 - 8 mL de medio de cultivo sin suero
4. Se centrifugan las células a 1000 g durante 5 minutos
5. Se resuspenden las células en medio de congelación de forma de obtener entre 8 y 10×10^6 cel/mL, posteriormente este volumen es dividido en crioviales de 1 mL.
6. Estos crioviales mantenidos a -80 °C durante la noche y al día siguiente son almacenados en nitrógeno líquido (-160 °C)

B.4 Descongelación de células

Para descongelar las células se deben seguir los siguientes pasos:

1. Se toma un vial del banco de células y se incuba a 37°C por 5 minutos
2. Luego de chequear que el vial se haya descongelado, se extrae el contenido del vial (1 mL aproximadamente) y se lleva a un tubo de centrífuga de 15 mL de capacidad, homogenizando cuidadosamente
3. Se incuba a 37°C en un baño termorregulado durante 5 minutos
4. Posteriormente se duplica el volumen mezclándolo con 2 mL de medio fresco, homogenizando la mezcla y nuevamente se deja en el baño termorregulado por 5 minutos
5. Este paso es repetido hasta que el volumen final sea de 8 mL

6. Se centrifuga durante 5 minutos a 700 rpm
7. El sobrenadante es descartado, y las células son resuspendidas en 12 mL de medio fresco, mezcla con la cual se inocula una placa T-75
8. Luego de 6 horas, se elimina el medio de la placa y se repone con 247 mL de medio fresco

B.5 Determinación de densidad celular

Para la determinación de la densidad celular se utiliza el método de exclusión por tinción con azul de tripano, la cual permite determinar la viabilidad del cultivo, debido a que las células vivas son impermeables al colorante por lo que se observan brillantes al microscopio óptico, mientras que las células muertas son permeables a este colorante, con lo que quedan teñidas de azul.

1. Se prepara una solución de azul tripán al 0,2% en Buffer fosfato salino (PBS)
2. Se mezclan 50 μ L de esta solución con 50 μ L de muestra, obteniéndose una dilución de 1:2
3. Se colocan 20 μ L de la mezcla en una cámara de Neubauer
4. Se cuentan las células vivas y muertas en los 8 campos del hemocitómetro.

La concentración celular se determina según la siguiente fórmula:

$$X \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{conteo células vivas} \cdot \text{dilución} \cdot 10.000}{\text{Número de campos (En general 8)}} \quad (\text{B.1})$$

Adicionalmente se calcula la viabilidad utilizando la siguiente relación:

$$\text{Viabilidad}(\%) = \frac{\text{conteo células vivas}}{\text{conteo células vivas} + \text{conteo células muertas}} \cdot 100 \quad (\text{B.2})$$

B.6 Transfección con Lipofectamina 2000

Previo a la transfección se requiere tener los elementos a transfectar linearizados, en particular para el caso de las transfecciones presentes en este trabajo se realizó una digestión utilizando la enzima de restricción ScaI.

Día 1

En placas de 60 mm sembrar 4×10^5 células en 5 mL de medio

Número de placas	Id
1	Control, sin vector
1	Control, pcDNA3.1(+)
2	pcDNA3.1(+)-GALK1

Día 2

Mezclas por placa

1. Mezclar 5 μg DNA con medio sin suero ni antibiótico hasta completar 300 μL
2. Resuspender lipofectamina suavemente
3. Mezclar 75 μL de lipofectamina con medio sin suero ni antibiótico hasta completar 300 μL
4. Mezclar DNA con lipofectamina (volumen final 600 μL)
5. Incubar a temperatura ambiente por 30-45 minutos
6. Agregar medio sin suero ni antibióticos hasta completar 1,2 mL
7. Retirar medio de las células
8. Lavar con PBS
9. Agregar 1,2 mL de medio sin suero ni antibióticos a las células
10. Agregar mezcla de DNA y lipofectamina a las células (volumen final 2,4 mL)
11. Mezclar moviendo la placa
12. Incubar por 5 horas
13. Agregar 2,4 mL de medio con 2x suero sin antibiótico

Día 4

1. 48 horas post-transfección pasar células 1:10 a medio selectivo 1¹

Después de ver que las células crezcan en medio selectivo se pasan a medio selectivo 2², cambiando el medio cada 3 días hasta que las células transfectadas sin el vector hayan muerto, luego de lo cual se procede a la selección de los clones obtenidos (Apéndice B.7).

B.7 Selección de clones mediante dilución al límite

Luego de que las células no transfectadas han muerto se procede a la selección de clones individuales que sobre-expresen el gen de interés. Para ello se procede a realizar una dilución de forma de aislar estos clones, lo que se obtiene inoculando una placa de 96 pocillos tal como se presenta en la Figura B.1. Posterior a esto se realizan cambios de medio, hasta obtener una cantidad suficiente de células para hacer la selección de clones.

¹DMEM/F12 + 400 $\mu\text{L}/\text{mL}$ G418

²GG6/14 + 400 $\mu\text{L}/\text{mL}$ G418

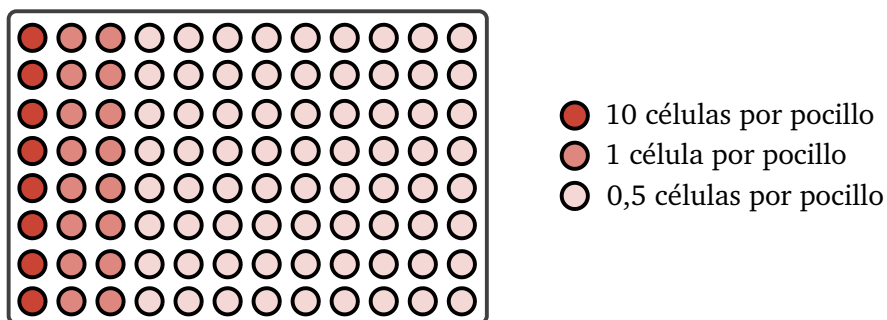


Figura B.1: Distribución de células en una placa de 96 pocillos para dilución al límite

B.8 Determinación de la concentración de t-PA por ELISA

Se preparan las siguientes soluciones:

- Buffer carbonato: 50 mg NaHCO_3 en 10 ml de H_2O
- Solución de lavado: PBS 1x + 0,05% Tween 20
- Solución de bloqueo: 250 mg BSA en 25 ml de PBS 1x
- PBS 1x: 0,15 M NaCl, 27 mM KCl, 81 mM Na_2HPO_4 , 11,5 mM KH_2PO_4

Procedimiento:

1. De ser necesario, diluir la muestra en buffer carbonato de modo que el t-PA quede en una concentración entre 1 y 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$
2. Agregar a cada pocillo de la microplaca 90 μL de buffer carbonato.
3. Agregar en cada pocillo 10 μL de la dilución de la muestra
4. Incubar por 8 horas a 4°C o 5 horas a temperatura ambiente
5. Enjuagar la placa tres veces con solución de lavado
6. Agregar 200 μL por pocillos de solución de bloqueo e incubar a 4°C durante toda la noche
7. Remover la solución de bloqueo enjuagando tres veces la placa con solución de lavado
8. Resuspender 3.1 μL del primer anticuerpo (anticuerpo monoclonal dilución 1/3300, almacenado a -20°C) en 10 mL de solución de bloqueo, agregar 100 μL por pocillo y dejar incubando una hora a 37°C
9. Lavar la placa 3 veces con solución de lavado

10. Resuspender el segundo anticuerpo (anticuerpo conjugado marcado con peroxidasa almacenado a -20°C) en PBS 1x ocupando una dilución de 1/5000 ($2\mu\text{L}$ en 10 mL). Agregar $100\mu\text{L}$ del conjugado a cada pocillo e incubar por una hora a 37°C .
11. Enjuagar tres veces con solución de lavado
12. Agregar $100\mu\text{L}$ del agente revelador DakoCytomation TMB + Substrate-Chromogen. Incubar de 30 a 60 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad
13. Detener la reacción con $50\mu\text{L}$ de H_2SO_4 4,5 N
14. Dejar reposar 5 min
15. Leer absorbancia a 405 nm

La determinación de la concentración de t-PA se realiza interpolando la absorbancia obtenida de las muestras dentro de una curva de calibración.

B.9 Determinación de concentración de amino ácidos

La determinación de la concentración de los aminoácidos presentes se realizará a través de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), mediante la derivatización de los aminoácidos que no poseen anillos aromáticos en su estructura, a través de la reacción de estos con o-Phtalaldehyde (OPA).

Previo al uso del equipo es necesario preparar las soluciones de reacción junto con la fase móvil.

Soluciones de Reacción

1. Preparación del *buffer* de ácido carbónico. Para 2 L:

- Na_2CO_3 : 81.4 [gr] (0.384 [M])
- H_3BO_3 : 27.1 [gr] (0.216 [M])
- K_2SO_4 : 37.6 [gr] (0.108 [M])

Procedimiento:

- (a) En una botella de aforo de 2 [L] se agregan 1.5 [L] de agua desionizada
- (b) Se pesa Na_2CO_3 y se agrega de a tercios asegurándose que se haya disuelto correctamente
- (c) Se agrega el K_2SO_4 cuidando de disolverlo correctamente antes de seguir al siguiente paso
- (d) Se agrega el H_3BO_3
- (e) Se agrega agua desionizada hasta completar los 2 [L] de solución
- (f) La solución obtenida se filtra con un filtro de membrana de $0.45\mu\text{m}$

El pH de la solución es alrededor de 10, no es necesario ajustar el pH

2. Preparación solución 10% Brij-35

- (a) Pesar 10 [gr] de Brij-35
- (b) Agregar 50 [mL] de agua desionizada a un recipiente de 100 [mL] aforado
- (c) Agregar Brij-35 al agua en un sistema agitado y calentado suavemente, esperar que se disuelva
- (d) Una vez enfriado, completar volumen a 100 [mL] y agitar

3. Preparación solución de reacción A (**AA-RA**)

- (a) Agregar 500 [mL] de buffer de ácido carbónico en una botella
- (b) Agregar 0.2 [mL] de hipoclorito de sodio (7-10%)
- (c) Mezclar
- (d) Filtrar con filtro de membrana 0.45 [μm]

No agregar Brij-35 a la solución

4. Preparación solución de reacción B (**AA-RB**)

Composición química: OPA 0.08%

- OPA 400 [mg] (4 [mL] de solución al 10 %)
- Etanol 7 [mL]
- 2-mercaptoetanol 1 [mL]
- Solución 10% Brij-35 2 [mL]

Lavar recipientes, puntas, todo el material que se utilizará con etanol.

- (a) Agitar hasta que todos los cristales se hayan disuelto
- (b) En un matraz aforado agregar 450 [mL] de buffer de ácido carbónico
- (c) Agregar solución etanol-OPA
- (d) Agregar 1 [mL] de 2-mercaptoetanol
- (e) Agregar 2 [mL] de solución 10% Brij-35
- (f) Completar volumen a 500 [mL]
- (g) Filtrar con filtro de membrana de 0.45 [μm]

La vida útil de esta solución es de 5 días.

Tabla B.8: Composición de *buffers* de la fase móvil para HPLC

		Fase Móvil Inicial (A)	Effluent (B)	Regenerador Líquido (C)
		AA-MA	AA-MB	AA-MC
Normalidad ion Litio	[N]	0.15	0.3	0.2
pH		2.6	10	Sin ajuste de pH
Citrato de Litio	[gr]	28.2	28.2	-
Hidróxido de Litio	[gr]	-	5.04	4.2
Ácido Bórico	[gr]	-	12.4	-
Éter Monometílico de etilenglicol	[mL]	140	-	-
Ácido Perclórico	[mL]	26.7	-	-
Volumen Final	[L]	2	1	0.5

5. Preparación de Fase Móvil

Las soluciones correspondiente a la fase móvil se preparan de acuerdo a lo expuesto en la Tabla B.8

Luego de realizar las mezclas estas deben ser filtradas a través de una membrana de 1.45 [μm] para retirar cualquier impureza que pudiera causar un bloqueo en la columna. La vida útil de las soluciones es de 3 semanas.

El ajuste de pH se lleva a cabo con ácido perclórico o solución LiOH 4 [N].

• Instalación del equipo

Se debe comenzar instalando la columna de litio (Shim-pack Amino-Li (100mmLx6.0mmI.D.). Shimadzu) y la trampa de amonio (Shim-pack ISC-30/S0504Na (50mmL.×4.0mmI.D.) Shimadzu) en el equipo. Luego se conectan las soluciones preparadas a sus bombas respectivas:

- 1-A: AA-MA
- 1-B: AA-MB
- B: AA-MC
- A': AA-RA
- B': AA-RB

• Preparación de muestra estándar

La solución estándar de aminoácidos (L-amino acids, LAA18, Sigma Aldrich) se debe diluir 25 veces llevándola a una concentración final de 0.1 [$\mu\text{mol}/\text{mL}$] en AA-MA. De esta manera al tomar una muestra de 10 [μL] se tiene 1 [nmol] de aminoácidos.

• Preparación de muestras

toda las muestras que se analizan mediante HPLC deben ser filtradas anteriormente por una membrana de al menos 0.45 [μm].

- **Uso**

El uso del equipo consta en tres pasos importantes, la purga del equipo para comenzar, la utilización del método para el análisis de muestras y el lavado del dispositivo al finalizar

1. Purga

La purga se encuentra programada dentro del método Amino_acid_Li. Antes de comenzar la purga siempre se debe actualizar la opción *Mobile Phase Setup* (Figura B.2), en el cual se le informa al programa los volúmenes de las soluciones que tiene el equipo a su disposición.

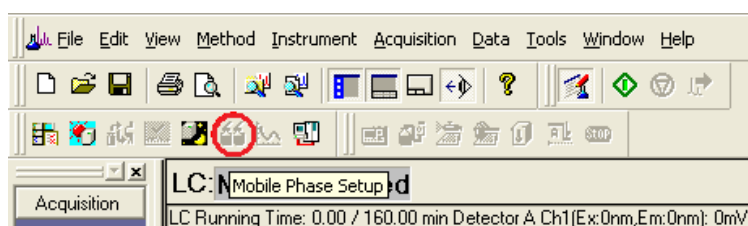


Figura B.2: Botón *Mobile Phase Setup*

Para purgar el equipo se debe comenzar limpiando primero la bomba A. Para esto se debe cuidar que la ventana de la opción *Autopurge* se vea cómo está indicado en la Figura B.3

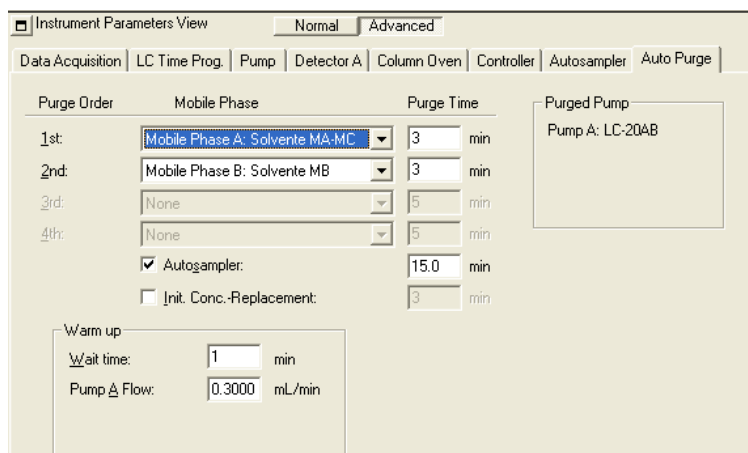


Figura B.3: Ventana *Autopurge*

La ventana *PUMP* debe tener la siguiente configuración:

- Total flow 0.6[mL/min]
- B concentration 0%
- B curve 0 %

Para realizar la autopurga se debe presionar el botón *Autopurge* como se indica en la Figura B.4

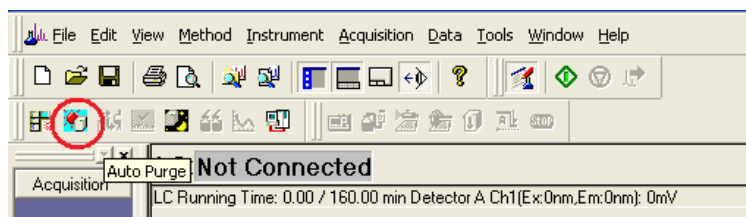


Figura B.4: Botón *Autopurge*

Una vez que termina la autopurga, se debe purgar el canal que anteriormente no se encontraba activo, en este caso la bomba B. Para esto se siguen las siguientes instrucciones:

- En la pestaña *PUMP*, cambiar de bomba A a B según se muestra en la Figura B.5. Esto permite trabajar con la bomba A-B
- Apretar *DOWNLOAD* para guardar los cambios
- En el equipo LC20AB apretar botón *PUMP*, el que activa y detiene la bomba de forma manual
- Abrir la llave del equipo LC20AB como se observa en la Figura B.6
- Presionar el botón *PURGE* en equipo LC20AB y la purga se detiene automáticamente después de 3 minutos
- En la pestaña *PUMP*, cambiar de bomba B a A para restaurar la configuración inicial
- Apretar *DOWNLOAD* para guardar los cambios
- Cerrar la llave del equipo LC20AB

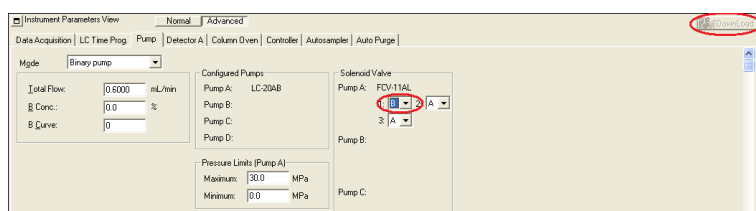


Figura B.5: Cambio de Bomba A a Bomba B



Figura B.6: Ilustraciónb de la llave del equipo abierta y cerrada

Purga Bomba peristáltica:

- (a) Se puede hacer al mismo tiempo que la autopurga
- (b) Poner el control de flujo al 50%
- (c) Purgar durante 3 minutos

2. Procedimiento

(a) Línea base

Antes de comenzar a usar la columna se debe obtener una línea base estable. Para ello se debe permitir que fluya fase móvil durante 10 minutos a través del equipo, apagando la bomba peristáltica con la solución reactante. Después de ese tiempo se aprieta el botón *BASELINE CHECK* en la interfaz del equipo en el computador. Se abre una ventana donde se observa si la base satisface los criterios de estabilizar. De no lograr la estabilidad desdeada se debe revisar la presencia de burbujas las cuales se pueden eliminar del sistema purgando nuevamente la línea involucrada y volver a intentar.

(b) Single Run y Batch processing

La opción *Single Run* instruye al equipo a tomar una muestra y obtener el cromatograma de ésta. En tanto *Batch Processing* permite programar un número demuestra analizadas consecutivamente. Para llevar a cabo cualquiera de estas dos opciones se debe entregar al programa información acerca del volumen de la muestra a analizar, nombre y otros. La opción de *Background file* debe quedar vacía ya que ésta resta a los datos obtenidos aquellos que se encuentran en el archivo seleccionado.

(c) Shutdown

La función *Shutdown* permite que una vez que termine la muestra o muestras de analizarse se lave el equipo y se apague automáticamente. Para activarla se debe apretar el botón en el menú del programa, como se observa en la Figura B.7. Debido a que la bomba peristáltica funciona independientemente se debe cuidar de conectar ésta a un timer para asegurar que se apague y no quede prendido por un tiempo indefinido de tiempo.

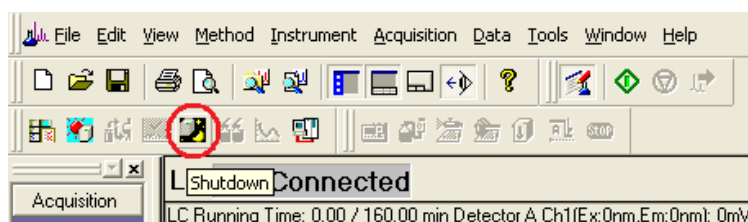


Figura B.7: Botón *Shutdown*

3. Lavado del equipo

Cuando no se ocupará el equipo por más de dos días se debe dejar todos los canales en algún solvente orgánico al 100% como metanol o alcohol isopropílico de grado para cromatografía. Para hacer esto se debe comenzar lavando las columnas con utilizando el método “Lavado aminoácido”. Una vez terminado se retiran las columnas, se tapan y guardan.

El paso siguiente consiste en remplazar las botellas con soluciones orgánicas por botellas con metanol y las inorgánicas por agua de grado HPLC. Se debe repetir la purga de todas las líneas de como se explicó anteriormente. Luego dejar todas las mangueras en recipientes con metanol para hacer fluir este líquido a través del equipo durante un tiempo suficiente para desplazar todos los líquidos inorgánicos.

C Curva de crecimiento de células CHO tPA en medio CHOSFMII

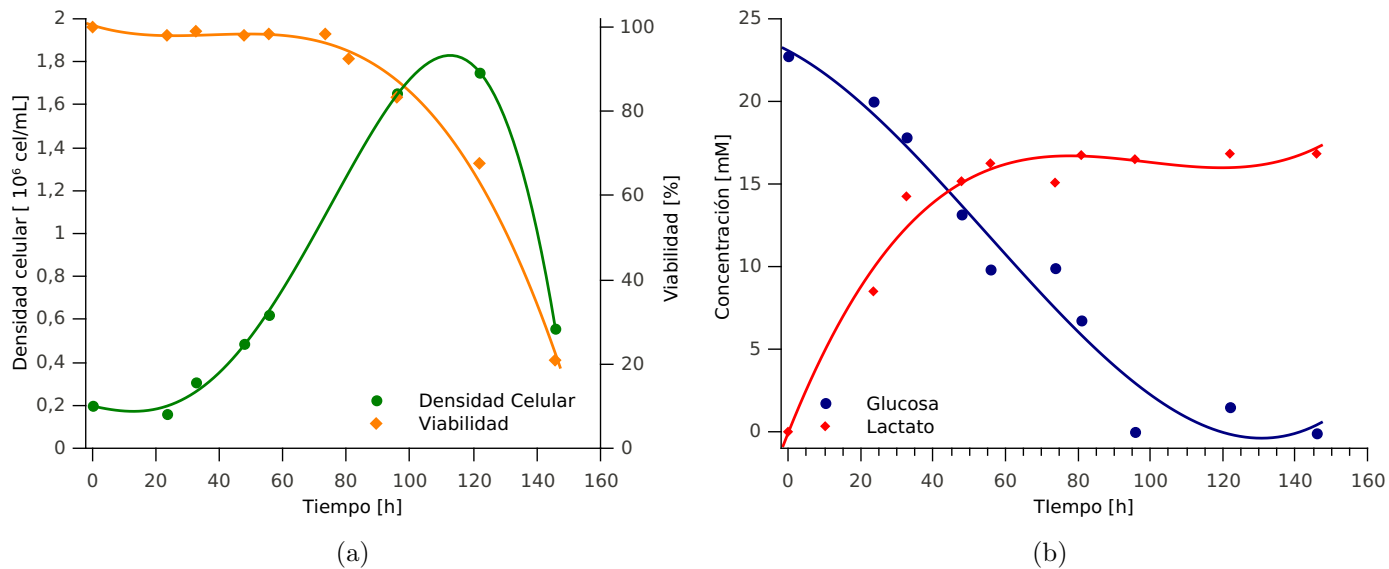


Figura C.1: Curva de crecimiento en medio CHOSFMII: (a): densidad celular, (b) concentración de glucosa y lactato.

D Selección clones CHO-Galk1

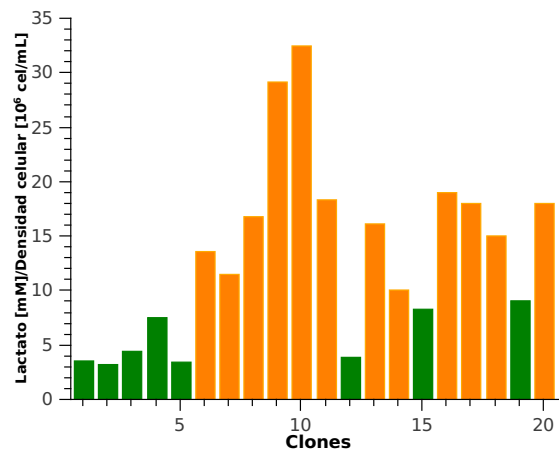


Figura D.1: Selección de clones de acuerdo a la minimización de la razón $\Delta L/\text{célula}$. ■: clones seleccionados, ■: clones no seleccionados.

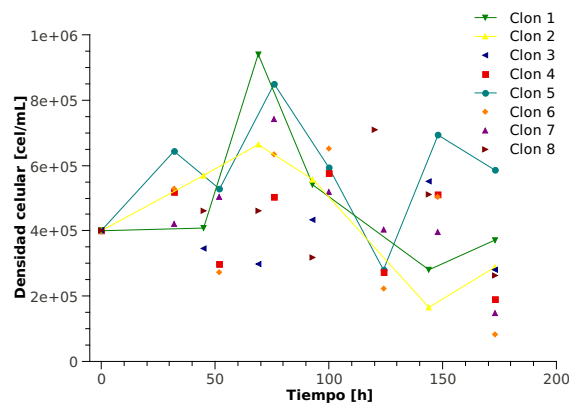


Figura D.2: Selección de clones de acuerdo a maximización de la densidad celular alcanzada en un cultivo batch en medio con 4 mM de glucosa y 16 mM de galactosa.

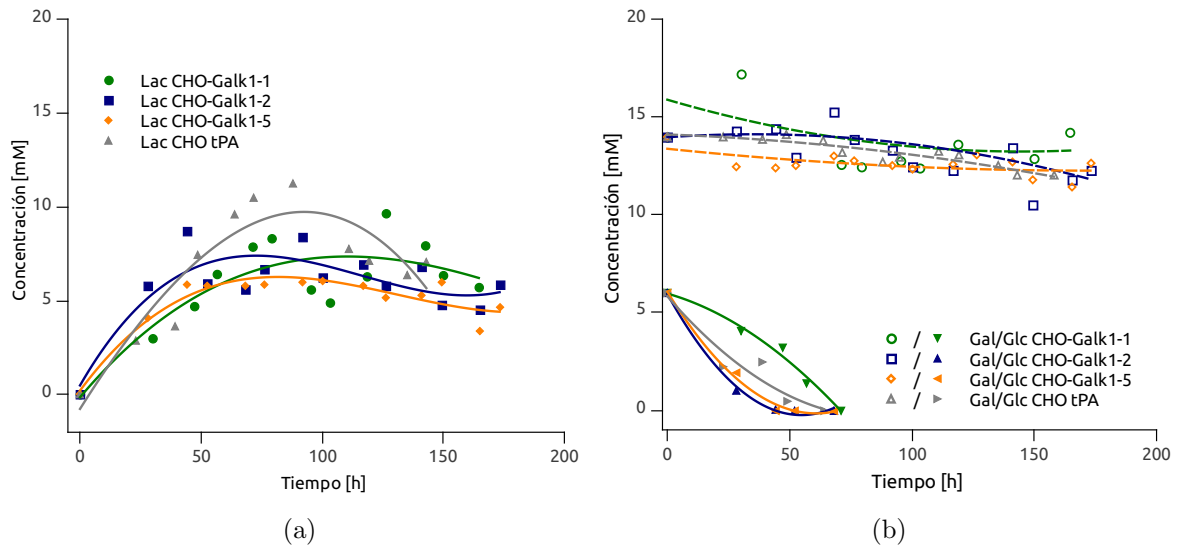


Figura D.3: Clones CHO-Galk1 seleccionados en medio GG6/14: (a): lactato, (b) concentración de glucosa y galactosa.

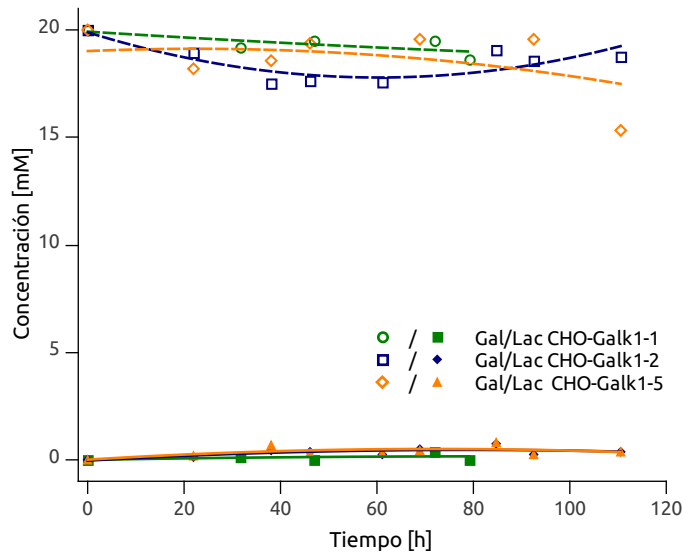


Figura D.4: Perfiles de galactosa y lactato para clones seleccionados en medio Gal20.

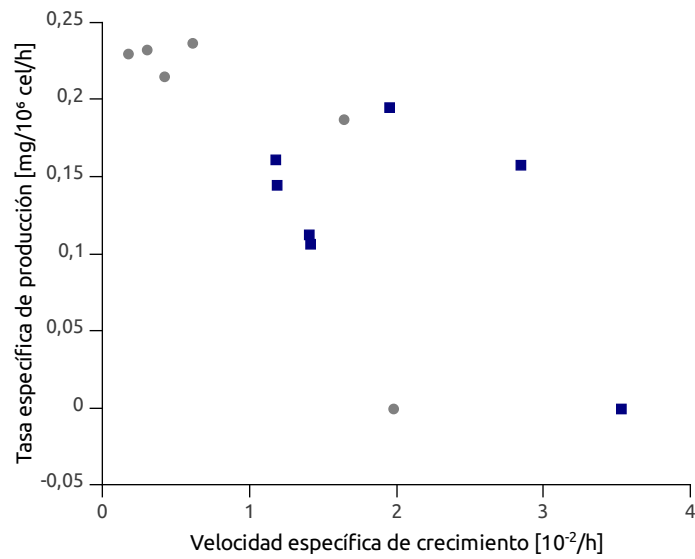


Figura D.5: Relación entre la tasa específica de producción de tPA y la velocidad de crecimiento para control y clon seleccionado