



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

**CARACTERIZACIÓN DE CLONES DE CÉLULAS CHO PRODUCTORAS  
DE IGG MEDIANTE ANÁLISIS METABÓLICO Y EXPRESIÓN  
TRANSCRIPCIONAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA E  
INGENIERA CIVIL QUÍMICA

ALESSANDRA FRANCESCA BALDECCHI MONTANER

PROFESORA GUÍA:  
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
BARBARA ANDREWS FARROW  
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

ESTA MEMORIA HA SIDO FINANCIADA POR:  
CONICYT PROYECTO FONDECYT INICIACIÓN 11090268

SANTIAGO DE CHILE  
ENERO, 2013

# Resumen

---

Debido a la gran demanda de proteínas recombinantes y en particular de anticuerpos para el uso terapéutico en humanos, se busca optimizar los cultivos celulares para obtener mayor producción de proteínas y menores costos de producción. Uno de los métodos utilizados en el mejoramiento de los cultivos es la ingeniería celular donde, mediante la inserción o eliminación de un gen, se modifican las vías metabólicas de las células. Las líneas celulares animales tienen la desventaja de que su metabolismo es incapaz de oxidar la glucosa completamente a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . La mayor parte de la glucosa, es oxidada a piruvato y finalmente a lactato, el que tiene un impacto negativo en el crecimiento celular y en la producción de proteínas.

El trabajo consistió en caracterizar los clones CHO MDHII y CHO PYC generados a partir de una línea celular CHO productora de IgG, que sobreexpresan los genes MDHII y PYC2 las cuales han mostrado mejorar la eficiencia del metabolismo en otras líneas celulares, produciendo menos lactato y aumentando el flujo de carbonos desde la glicólisis hacia el ciclo del TCA. Para ello fue necesario hacer una selección previa de clones, de tal forma de escoger a los que presentaran mayor productividad específica de IgG y mayor eficiencia metabólica, caracterizada por valores bajos de producción de lactato por glucosa consumida ( $\Delta\text{L}/\Delta\text{G}$ ). Luego se procedió a realizar las curvas de crecimiento para los clones y las células CHO *wild-type* que se utilizó como control. Para la caracterización del metabolismo, se midió la glucosa consumida, la producción de lactato, IgG y amonio, y se calcularon las tasas de consumo y producción de los metabolitos. La caracterización de la expresión transcripcional se realizó mediante un PCR en tiempo real, para el que fue previamente necesario extraer el RNA de las muestras, seguida de la síntesis de cDNA.

Los resultados mostraron una menor producción de biomasa y anticuerpo IgG en los clones en comparación al control CHO *wild-type*, debido a un aumento inesperado en la producción de este último. Por otro lado, sí fue posible demostrar una mayor eficiencia metabólica de los clones debido a la disminución en la producción de lactato, en el caso del clon CHO MDHII y a una menor diferencia entre las tasas de producción de lactato y consumo de glucosa, en el clon CHO PYC. Al comparar las eficiencias de ambos clones, las células CHO MDHII mostraron una mayor eficiencia metabólica lo que se debería a un mayor flujo de carbonos desde la glicólisis al ciclo del TCA. Se cree que el clon CHO PYC no mostró una mayor eficiencia metabólica debido a que se generaría una acumulación de malato que no podría ser procesada por la enzima MDHII en el ciclo del TCA. Los cálculos de productividad específica de IgG demostraron que la producción de proteína recombinante estaría asociada al crecimiento celular y se cree que el consumo de glutamina cumpliría un rol importante en la producción de biomasa e IgG debido a que se obtuvieron mayores concentraciones de amonio en las células con mayor densidad y producción de proteína.

El análisis de la expresión transcripcional no permitió detectar diferencias en la amplificación de los genes MDHII y PYC2, principalmente debido a la variación en los resultados obtenidos y a que no fue posible amplificar un producto específico para el gen PYC2.

Del trabajo se puede concluir que el clon CHO MDHII presentó una mayor eficiencia metabólica debido a la menor producción de lactato y exhibió mayor producción de biomasa e IgG que el clon CHO PYC.

Para comprender mejor el comportamiento de estos clones, se debe llevar a cabo un estudio de los flujos en las vías metabólicas y buscar métodos de cultivo que optimicen el crecimiento celular y la producción de proteína, para obtener el máximo beneficio de los clones. Por otro lado, es importante que en el proceso de la selección de clones, la productividad de proteína recombinante de los clones se compare con una muestra control, de tal manera de verificar que estos presentan una mejora. Además se deben seleccionar los clones que presenten una mayor densidad celular y menor producción de lactato, ya que se ha visto que estas características mejoran la productividad.

# Agradecimientos

---

A mis padres Rodrigo y Francisca, y a mi hermana Paola, sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Gracias por su apoyo incondicional, cariño y paciencia.

A mis abuelos, por su fe en mí y preocupación.

A mis amigas de la vida Jessica y Fernanda, por siempre estar presente, en las buenas y en las malas.

A mis amigos de la Universidad. Mis bachiamigas, Eli y Estefa, con quienes compartí largas jornadas de estudio y grandes momentos de esparcimiento en los pastos. A mis amigos de carrera: Ivette, Yasna, Chipi y Moisés. Sin ustedes todo hubiera sido más difícil, gracias por todos los momentos compartidos.

A Cristian, por acompañarme en esta etapa tan importante. Gracias por todo tu apoyo y cariño, por siempre darme ánimo y motivación cuando más lo necesitaba.

A mis compañeros del Lab. Cami, gracias por tu disposición y paciencia, eres una excelente profe. Camilo, gracias por auxiliarme siempre! Por tu buena onda y por hacer más entretenida las largas jornadas de trabajo. Naty, gracias por tu ayuda, tips e historias. A todos ustedes, por ser un excelente grupo de personas y futuros colegas. Les deseo mucho éxito en todo lo que se propongan.

A quienes trabajan en el CIBYB y en el DIQBT, en especial a Nancy y a Gina, por su enorme disposición y voluntad.

A las profesoras Bárbara y Oriana por su disposición, y a la profesora Ziomara por su tiempo, disposición y conocimientos. Fue una excelente guía en todo este proceso. Gracias por su apoyo y por darme la posibilidad de trabajar en este proyecto.

A la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) por el apoyo financiero a través del proyecto FONDECYT Iniciación 11090268.

Por último a la facultad y a la Universidad de Chile, me siento orgullosa de haber estudiado en esta gran institución.

# Índice de Contenidos

---

Resumen .....	i
Agradecimientos .....	iii
Índice de Contenidos .....	iv
Índice de Gráficos.....	vii
Índice de Figuras .....	viii
Índice de Tablas.....	ix
Nomenclatura y abreviaciones.....	x
CAPÍTULO I. Introducción y Antecedentes Generales .....	1
1.1.    Introducción.....	1
1.2.    Antecedentes Bibliográficos.....	3
1.2.1.    Metabolismo central del carbono .....	3
1.2.1.1.    Glicólisis.....	4
1.2.1.2.    Vía pentosas fosfatos (PPP) .....	4
1.2.1.3.    Ciclo del TCA .....	5
1.2.2.    Eficiencia metabólica .....	5
1.2.3.    Ingeniería celular .....	6
1.2.3.1.    Malato deshidrogenasa.....	6
1.2.3.2.    Piruvato Carboxilasa .....	8
1.2.4.    Análisis expresión transcripcional.....	9
1.3.    Objetivos.....	12
1.3.1.    Objetivo general .....	12
1.3.2.    Objetivos específicos.....	12
1.4.    Alcances.....	13
CAPÍTULO II. Materiales y Metodología .....	14
2.1.    Materiales .....	14
2.1.1.    Reactivos .....	14
2.1.2.    Equipos.....	14
2.1.3.    Material de Laboratorio .....	15
2.1.4.    Herramientas Computacionales.....	15
2.2.    Metodología.....	16
2.2.1.    Medio de cultivo.....	16
2.2.2.    Curvas de crecimiento .....	17

2.2.3.	Densidad y viabilidad celular .....	17
2.2.4.	Medición de Metabolitos extracelulares .....	17
2.2.4.1.	Medición de Glucosa y Lactato.....	17
2.2.4.2.	Medición de Amonio.....	18
2.2.4.3.	Medición de Anticuerpo IgG .....	18
2.2.4.4.	Determinación de tasas específicas .....	18
2.2.5.	Análisis Transcripcional .....	19
2.2.5.1.	Extracción de RNA .....	19
2.2.5.2.	Medición de la concentración y pureza del RNA .....	19
2.2.5.3.	Síntesis de cDNA .....	20
2.2.5.4.	Diseño de partidores.....	20
2.2.5.5.	PCR en tiempo real .....	20
CAPÍTULO III. Resultados y Discusiones.....		23
3.2	Selección de Clones.....	23
3.3	Caracterización metabólica de los clones seleccionados.....	26
3.3.1	Densidad celular .....	26
3.3.2	Estados metabólicos .....	28
3.3.3	Producción de amonio .....	30
3.3.4	Producción de anticuerpo IgG .....	32
3.3.5	Tasas específicas de consumo y producción .....	34
3.4	Caracterización transcripcional de los clones seleccionados .....	35
3.4.1	Integridad y cuantificación del RNA.....	35
3.2.1	Diseño de partidores .....	37
3.2.1	Expresión transcripcional .....	38
3.2.2	Análisis estadístico de la expresión transcripcional .....	40
CAPÍTULO IV. Conclusiones.....		43
3.2	Recomendaciones .....	44
Referencias .....		45
Anexos.....		49
Anexo A. Metodología .....		49
Anexo A.1. Composición del medio de cultivo DMEM/F-12 .....		49
Anexo A.2. Descongelación de células CHO .....		50
Anexo A.3. Pasaje de células .....		50
Anexo A.4. Toma de muestras en curva de crecimiento.....		51

Anexo A.5. Determinación de concentración celular y viabilidad .....	51
Anexo A.6. Determinación de la concentración de glucosa y lactato.....	52
Anexo A.7. Determinación de la concentración de Amonio.....	52
Anexo A.8. Determinación de la concentración de anticuerpo IgG.....	53
Anexo A.9. Extracción de RNA.....	55
Anexo A.10. Electroforesis en gel de agarosa .....	56
Anexo A.11. Digestión con DNasa .....	56
Anexo A.12. Síntesis de cDNA.....	57
Anexo A.13. Secuencias de los genes medidos en el PCR en tiempo real .....	58
Anexo B. Resultados y Discusiones .....	62
Anexo B.1. Selección de Clones .....	62
Anexo B.2. Productividad específica de Amonio .....	63
Anexo B.3 Productividad específica de anticuerpo IgG .....	64
Anexo B.4. Rendimientos de anticuerpo IgG y biomasa .....	64
Anexo B.5. Caracterización transcripcional de los clones seleccionados.....	66
Anexo B.6. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el qPCR.....	68
Anexo B.7. qPCR con partidores específicos para la amplificación de PYC2. ....	70

# Índice de Gráficos

---

Gráfico 1. Curvas de crecimiento de los clones CHO MDHII.....	24
Gráfico 2. Curvas de crecimiento de los clones CHO PYC.....	24
Gráfico 3. Productividad específica de anticuerpo IgG de los clones CHO MDHII.....	25
Gráfico 4. Productividad específica de anticuerpo IgG de los clones CHO PYC.....	25
Gráfico 5. Comparación del crecimiento y viabilidad celular.....	27
Gráfico 6. Comparación del consumo de glucosa.....	28
Gráfico 7. Comparación de la producción de lactato.....	28
Gráfico 8. Comparación de la concentración de amonio.....	31
Gráfico 9. Comparación de la producción de anticuerpo IgG.....	32
Gráfico 10. Expresión relativa de los genes PYC, PYC2 y MDHII en los clones CHO PYC y CHO MDHII.....	38
Gráfico 11. Consumo de glucosa de los clones CHO MDHII.....	62
Gráfico 12. Producción de lactato de los clones CHO MDHII.....	62
Gráfico 13. Consumo de glucosa de los clones CHO PYC.....	62
Gráfico 14. Producción de lactato de los clones CHO PYC.....	62
Gráfico 15. Producción total de IgG de los clones CHO MDHII.....	63
Gráfico 16. Producción total de IgG de los clones CHO PYC.....	63
Gráfico 17. Comparación de la productividad específica de amonio.....	63
Gráfico 18. Comparación de la productividad específica de IgG.....	64
Gráfico 19. Comparación de la producción de IgG por glucosa consumida.....	64
Gráfico 20. Comparación de la producción de biomasa por glucosa consumida.....	65

# Índice de Figuras

---

Figura 1. Metabolismo central del carbono en células animales.....	4
Figura 2. Interacción de las enzimas cMDH y mMDH.....	7
Figura 3. Relación entre el aspartato y malato en células CHO mAb.....	8
Figura 4. Esquema general del metabolismo de glucosa y ciclo del TCA en células animales.....	9
Figura 5. Gráfico del modelo de PCR en tiempo real.....	10
Figura 6. Esquema del funcionamiento de los marcadores fluorescentes.....	11
Figura 7. Curva de <i>melting</i> para la medición de un gen en distintas muestras.....	11
Figura 8. Diagrama de bloques de la metodología aplicada en el trabajo.....	16
Figura 9. Gel de agarosa al 1% post-extracción de RNA.....	35
Figura 10. Gel de agarosa al 1% post-digestión de RNA con rDNase I.....	37
Figura 11. Curva de <i>melting</i> para gen PYC.....	40
Figura 12. Curva de <i>melting</i> para gen PYC2.....	40
Figura 13. Curva de <i>melting</i> para gen MDHII.....	40
Figura 14. Curva de <i>melting</i> para gen Cdc42.....	40
Figura 15. Resultado del análisis estadístico I.....	68
Figura 16. Resultado del análisis estadístico II.....	69
Figura 17. Resultado del análisis estadístico III.....	69
Figura 18. Curvas de <i>melting</i> para el nuevo partidor del gen PYC2 en el qPCR 1.....	70
Figura 19. Curvas de <i>melting</i> para el nuevo partidor del gen PYC2 en qPCR 2.....	70

# Índice de Tablas

---

Tabla 1. Reactivos principales utilizados en el trabajo .....	14
Tabla 2. Equipos principales utilizados en los procedimientos.....	14
Tabla 3. Materiales más utilizados en los procedimientos. ....	15
Tabla 4. Herramientas computacionales.....	15
Tabla 5. Distribución de los target a medir en cada PCR.....	21
Tabla 6. Distribución de la muestras en cada PCR.....	21
Tabla 7. Programa de qPCR. ....	22
Tabla 8. Parámetros de los cultivos CHO <i>wild-type</i> , CHO MDHII y CHO PYC .....	23
Tabla 9. Valores de $\Delta L/\Delta G$ para los clones CHO MDHII. ....	24
Tabla 10. Valores de $\Delta L/\Delta G$ para los clones CHO PYC. ....	24
Tabla 11. Tasa máxima de crecimiento y duración de la fase exponencial.....	27
Tabla 12. Eficiencia metabólica caracterizada por el valor $\Delta L/\Delta G$ . ....	28
Tabla 13. Productividad específica de amonio en la fase exponencial de crecimiento.....	31
Tabla 14. Productividad específica de IgG obtenida en la fase exponencial de crecimiento.....	33
Tabla 15. Tasas específicas de consumo de glucosa, producción de lactato y rendimiento de biomasa e IgG por glucosa consumida en la fase exponencial de crecimiento.....	34
Tabla 16. Concentración y pureza del RNA extraído de las muestras .....	36
Tabla 17. Concentración y pureza del RNA digerido .....	37
Tabla 18. Secuencias y parámetros de los partidores utilizados en el qPCR. ....	38
Tabla 19. Preparación de la curva de calibración de amonio. ....	53
Tabla 20. Diluciones de la muestra estándar del ensayo ELISA.....	54
Tabla 21. Volumen de RNA de cada muestra para obtener 10 $\mu\text{g}$ y la cantidad de agua necesaria para completar un volumen de reacción de 50 $\mu\text{L}$ . ....	57
Tabla 22. Volumen de RNA de cada muestra para obtener 1 $\mu\text{g}$ y la cantidad de agua necesaria para completar un volumen de reacción de 13 $\mu\text{L}$ . ....	57
Tabla 23. Preparación del mix de síntesis de cDNA. ....	58
Tabla 24. Datos y cálculos obtenidos del qPCR 1.....	66
Tabla 25. Datos y cálculos obtenidos del qPCR 2.....	67

# Nomenclatura y abreviaciones

---

<b>Abreviación</b>	<b>Definición</b>
ABS	Absorbancia
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
BHK	Células de riñón de hámster bebe
cDNA	DNA complementario
CHO	Células de ovario de hámster chino
CoA	Coenzima A
Cp	Punto de corte
CSTR	Reactor continuamente agitado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Endonucleasa
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
FADH <sub>2</sub>	Dinucleótido de flavina-adenina reducido
Glc	Glucosa
GLUT5	Transportador de fructosa
GTP	Guanosina trifosfato
HEK	Células de riñón de embrión humano
IgG	Inmunoglobulina G
Lac	Lactato
LDH	Lactato deshidrogenasa
mABs	Anticuerpo monoclonal
MDH	Malato deshidrogenasa
cMDH	Malato deshidrogenasa citosólica
mMDH	Malato deshidrogenasa mitocondrial
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
NS0	Células de meiloma murino de ratón
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PER	Células de retina humana
PPP	Vía pentosas fosfatos
PYC	Piruvato deshidrogenasa
PYC2	Piruvato deshidrogenasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
rRNA	RNA ribosomal
RT	Enzima transcriptasa reversa
SFB	Suero fetal bovino

TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
UV	Ultravioleta

**Símbolo**

**Definición**

---

$\mu_{\max}$	Tasa de crecimiento máximo
$\Delta L/\Delta G$	Lactato producido por glucosa consumida
$\Delta G^\circ$	Energía libre de Gibbs
b	Números de bases
$^{13}\text{C}$	Isótopo Carbono 13
pb	Pares de bases
$q_{\text{Glc}}$	Consumo específico de glucosa
$q_{\text{IgG}}$	Producción específica de IgG
$q_{\text{Lac}}$	Producción específica de lactato
$T_m$	Temperatura de <i>melting</i>
Xv	Densidad células viables
$Y_{P/S}$	Rendimiento producto/sustrato

# CAPÍTULO I. Introducción y Antecedentes Generales

---

## 1.1. Introducción

En las últimas dos décadas las proteínas recombinantes han adquirido una gran importancia en aplicaciones terapéuticas. La primera proteína recombinante aprobada y producida fue la insulina a principio de los años 80. Su exitosa entrada en el mercado dio origen a la industria de los biofármacos. Desde entonces la FDA ha aprobado más de 100 nuevas proteínas recombinantes terapéuticas (Zhu, 2012). Dentro del mercado global de los productos farmacéuticos, un 10% corresponde a proteínas recombinantes y un 7% a anticuerpos monoclonales (mAbs) (Elvin et al., 2011); este último sector obtuvo ventas que excedieron los 40 millones de dólares en el año 2010. Para el 2015 se esperan ventas que alcancen los 70 millones de dólares (Chon and Zarbis-Papastoitsis, 2011).

Actualmente el 60% de todas las proteínas recombinantes son producidas en células animales, debido principalmente a que pueden generar proteínas de gran calidad que son similares en sus estructuras moleculares y propiedades bioquímicas a las de origen natural en humanos (Matasci et al., 2009). Muchas de estas proteínas requieren de modificaciones post-traduccionales tales como glicosilaciones, fosforilaciones, formación de puentes disulfuro y plegamientos. Las células animales tienen la capacidad de procesar y secretar proteínas maduras y funcionales mientras que otros sistemas de expresión ampliamente utilizados, como las bacterias, no son capaces (Chen et al., 2001).

La mayoría de las proteínas recombinantes producidas en la industria farmacéutica, corresponde a anticuerpos monoclonales. Existen en el comercio 18 anticuerpos monoclonales para uso terapéutico, los que han sido estudiados para el tratamiento de enfermedades oncológicas e inmunológicas (Reichert et al., 2005). Los anticuerpos pueden ser generados a partir de DNA recombinante o hibridomas y en distintos sistemas de expresión, entre los cuales se encuentran las células de ovario de hámster chino (CHO), células de mieloma murino de ratón (NS0), células de riñón de embrión humano (HEK 293), células de riñón de hámster bebé (BHK-21) y células de retina humana (PER-C6) (Butler, 2005).

El éxito clínico y comercial de los anticuerpos monoclonales ha llevado a la necesidad de una producción a gran escala en el cultivo de células animales. La productividad de los cultivos celulares ha mejorado 100 veces en los últimos 15 años gracias al mejoramiento de las tecnologías de expresión y a la optimización de los procesos (Birch and Racher, 2006). Las estrategias utilizadas apuntan al mejoramiento de los medios y/o métodos de cultivo, vectores de expresión y metabolismo celular.

Dentro de los métodos de cultivo más utilizados en la producción a gran escala, se encuentran los procesos batch, fed-batch y perfusión. El proceso batch tiene la ventaja de que es relativamente fácil de implementar, reproducible y fácil de validar. Por otro lado, el proceso fed-batch permite controlar la concentración de nutrientes, mantener una tasa de crecimiento deseable así como una fase larga de producción. Sin embargo, tanto el fed-batch como el batch presentan la desventaja de la acumulación de residuos durante el cultivo, que puede ser tóxico

para las células. El proceso de perfusión, además de permitir controlar la alimentación y la tasa de crecimiento, puede remover continuamente los residuos durante el cultivo. No obstante, este método requiere de reactores especiales capaces de retener las células, mientras se retira el medio de cultivo agotado (Wang et al., 2006).

Otro método utilizado para mejorar la productividad de los cultivos, es el desarrollo de nuevos medios de cultivo. El suero fetal bovino (SFB) se ha utilizado como suplemento por muchas décadas. Este es una buena fuente de hormonas, factores de crecimiento y elementos traza, que promueven el crecimiento rápido de las células. Además, su alto contenido en albúmina protege a las células de potenciales condiciones adversas, como por ejemplo la fluctuación del pH o esfuerzos de corte. Si bien el SFB presenta numerosos beneficios, su composición es variable e indefinida, lo que conduce a que el crecimiento y la productividad sean variables. Los primeros intentos por desarrollar medios libres de suero han incorporado elementos como insulina, transferrina, albúmina y colesterol (Butler, 2005). Por otro lado, también se han realizado estudios donde se reemplazan las fuentes principales de carbono y nitrógeno por glucosa y glutamina, respectivamente, con el fin de lograr un uso más eficiente de los compuestos además de evitar la acumulación de lactato y amonio en el medio (Altamirano et al., 2000).

El mejoramiento del metabolismo celular es de gran relevancia, ya que si bien las células animales son confiables y seguras para la producción de proteínas, presentan un metabolismo deficiente debido a que son incapaces de oxidar la glucosa completamente a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. La mayoría de la glucosa, entre un 95 a 99,8%, es oxidada a piruvato y finalmente a lactato. En consecuencia, solo 2 moles de ATP son generados por molécula de glucosa en comparación a los 36 moles que producen otros tipos de células. Para cubrir los requerimientos energéticos, las células animales deben consumir grandes cantidades de glutamina, la cual es oxidada vía glutaminólisis, que a su vez produce amonio (Irani et al., 1999). Tanto el lactato como el amonio, presentan efectos adversos para las células por su efecto inhibitorio en el crecimiento celular y en la producción de proteína. Altas concentraciones de amonio han demostrado disminuir la tasa de crecimiento celular dramáticamente y limitan la densidad celular. Por otro lado la acumulación de lactato destruye la capacidad de amortiguación del medio, cambiando el pH del cultivo a uno más bajo (Chen et al., 2001).

Los avances más importantes alcanzados mediante la ingeniería celular, han tenido por objetivo las enzimas que participan en la vía de la glicólisis, de tal manera de reducir la producción de lactato y sus efectos inhibitorios sobre el crecimiento celular y la productividad (Nolan and Lee, 2012). La selección de clones, su adaptación a métodos de cultivos deseados y el mejoramiento de su productividad, han sido la clave para desarrollar nuevos procesos (Korke et al., 2002). Dentro de los trabajos realizados se encuentra la sobreexpresión de la enzima malato deshidrogenasa (MDH) en células CHO mAb (Chong et al., 2010), la reducción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y piruvato deshidrogenasa (PDH) en células CHO (Zhou et al., 2011), la expresión de la enzima piruvato carboxilasa (PYC) en células BHK-21 (Irani et al., 1999), la sobreexpresión del transportador de fructosa (GLUT5) en CHO (Wlaschin and Hu, 2007) y en células de mieloma humano (SC-01MFP) (Inoue et al., 2010).

Dentro de las líneas celulares animales, las células CHO se han convertido en las células huésped estándar utilizadas en la producción de proteínas recombinantes. Se han logrado avances significativos tanto en el desarrollo de los procesos de cultivo como en ingeniería celular, llegando a obtener densidades celulares cercanas a  $2 \times 10^7$  células/mL y concentraciones de proteína en el rango de 10 - 15 g/L (Huang et al., 2010).

Mediante el siguiente trabajo se desea caracterizar clones de células CHO productoras del anticuerpo IgG, las cuales presentan cambios en la expresión de genes, con el objetivo de mejorar su metabolismo y la producción de proteína recombinante. Para esto se han realizado previamente modificaciones genéticas que buscan modificar las vías metabólicas con el objetivo de disminuir la producción de metabolitos inhibitorios del crecimiento. Se realizará un análisis metabólico, donde se medirá la producción de metabolitos extracelulares, el consumo de sustrato y la producción de proteína recombinante. Luego se realizará un análisis de expresión transcripcional para estudiar el comportamiento de los genes sobreexpresados.

## **1.2. Antecedentes Bibliográficos**

La producción de lactato depende de diversos factores, dentro de los cuales se encuentra la concentración intracelular de piruvato. El piruvato sirve de sustrato para las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y piruvato deshidrogenasa (PDH), y es un punto de ramificación clave que determina si la fuente de carbono es secretada como lactato, luego de su oxidación por glicólisis o metabolizada mediante el ciclo del TCA (Zhou et al., 2011).

A continuación se explican las vías metabólicas que participan en el metabolismo del carbono central, con el fin de comprender cómo y en qué lugares actuarían las enzimas expresadas en los clones de células CHO que se buscan caracterizar en este trabajo.

### **1.2.1. Metabolismo central del carbono**

El metabolismo central del carbono está compuesto por tres de las vías metabólicas más importantes de la célula, la glicólisis, la vía de las pentosas fosfatos (PPP) y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). En la Figura 1 se observa como estas vías interactúan entre sí, lo que permite metabolizar la mayor parte del carbono, obteniendo precursores para biomasa y moléculas como NADH, NADPH y FADH<sub>2</sub>, que generan un flujo de electrones hacia la cadena respiratoria donde finalmente participan en la formación de ATP.

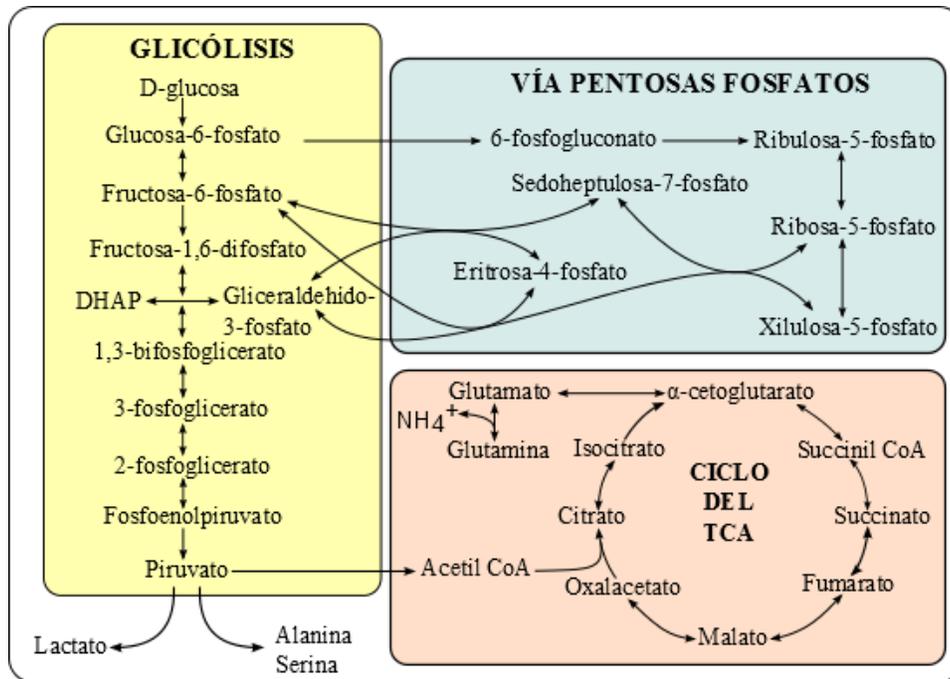


Figura 1. Metabolismo central del carbono en células animales.

### 1.2.1.1. Glicólisis

La glicólisis es la vía principal por la que se degrada la glucosa mediante una serie de reacciones catalizadas por la acción consecutiva de un grupo de 11 enzimas en el citosol. Se pueden distinguir principalmente dos etapas. En la primera, la glucosa u otra hexosa, es fosforilada a gliceraldehído-3-fosfato, consumiéndose dos moléculas de ATP que fosforilan las posiciones 1 y 6 de la hexosa. La segunda etapa es común para todos los azúcares y en ella ocurren las etapas de óxido-reducción donde el ADP es fosforilado a ATP, formándose cuatro moléculas de ATP. Además se forman dos moléculas de piruvato el cual puede ser transformado en lactato mediante la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) o en acetil CoA mediante el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDH), el que luego ingresa al ciclo del TCA. De ambas etapas, se obtiene un total de dos moléculas de ATP y dos moléculas de lactato por una molécula de glucosa.

### 1.2.1.2. Vía pentosas fosfatos (PPP)

La vía de las pentosas fosfato es una ruta multifuncional, que puede realizar distintas actividades que tienen por objetivo generar potencial reductor a través del NADPH, generar ribosa-5-fosfato para la síntesis de nucleótidos y degradar las pentosas para su conversión en hexosas, las que pueden ingresar a la glicólisis.

### 1.2.1.3. *Ciclo del TCA*

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) es la vía metabólica más importante para la producción de energía. Esta consiste en una serie de óxido-reducciones desde piruvato a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Del ciclo se obtienen 2 GTP (equivalente a ATP; fosforilación a nivel de sustrato), 6 NADH y 2  $\text{FADH}_2$ . Además se producen sustratos para otras vías metabólicas.

La primera reacción es la oxidación del piruvato en acetyl CoA mediante el complejo enzimático PDH. Esta reacción es irreversible y si bien no es parte del ciclo, es necesaria para la incorporación de todos los glúcidos al ciclo del TCA. La regulación del complejo PDH depende de la cantidad de ATP/ADP y piruvato presentes. Cuando hay niveles elevados de ATP, el complejo PDH se fosforila por una quinasa, haciendo más lenta la formación de acetyl CoA. Por el contrario, cuando hay niveles elevados de ADP y existe abundancia de piruvato, el complejo vuelve a activarse al desfosforilarse el complejo.

El ciclo tiene lugar en la mitocondria y se inicia cuando la enzima citrato sintetasa cataliza la condensación del acetyl CoA con el oxalacetato para formar citrato. Luego la enzima aconitasa cataliza la reacción reversible del citrato en isocitrato, que posteriormente es oxidado por la isocitrato deshidrogenasa a  $\alpha$ -cetoglutarato y  $\text{CO}_2$ . Mediante una reacción reversible, la enzima  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa oxida el  $\alpha$ -cetoglutarato a succinil CoA, el que luego reacciona con GDP para formar succinato. Este último es oxidado a fumarato donde FAD actúa como aceptor de hidrógeno. El fumarato sufre una hidratación reversible catalizada por la fumarasa para formar malato. Por último el malato es oxidado a oxalacetato por la enzima malato deshidrogenasa.

El ciclo del TCA también participa en la generación de precursores para rutas anabólicas. Algunos de los metabolitos intermediarios del ciclo sirven como precursores de distintos aminoácidos, en la síntesis de esteroides y ácidos grasos. Por otro lado, los intermediarios también pueden reponerse mediante reacciones anapleróticas. Una de las más importantes es la carboxilación enzimática del piruvato para formar oxalacetato, la cual puede ocurrir cuando existe un déficit de los intermediarios del ciclo. Esta reacción es catalizada por la enzima piruvato carboxilasa que a su vez es estimulada por la acumulación de acetyl CoA.

### 1.2.2. *Eficiencia metabólica*

Como se mencionó anteriormente, el lactato y amonio presentan un efecto inhibitorio en el crecimiento celular y en la producción de proteína. Se han realizado numerosos estudios para inhibir la producción de estos metabolitos, utilizando métodos de adición controlada de glucosa y glutamina, además de cultivos fed-batch de glucosa y libres de glutamina, entre otros (Glacken et al., 1986; Kurano et al., 1990).

En el caso del lactato, este se forma a partir del piruvato que no ingresa a la mitocondria, mediante la enzima LDH oxidando NADH a  $\text{NAD}^+$ . Por cada molécula de glucosa se pueden obtener dos moléculas de piruvato, por lo tanto el máximo teórico de producción de lactato son dos moléculas por una molécula de glucosa consumida. Este valor máximo no es alcanzado en general, ya que de lo contrario la glucosa consumida no aportaría los carbonos para la síntesis de biomasa ni para la mantención del metabolismo energético

mediante el ciclo del TCA. Para estudiar el estado metabólico de un cultivo y la eficiencia del uso de la glucosa se define la razón  $\Delta L/\Delta G$ , la cual indica la cantidad de lactato producido por glucosa consumida. Estudios muestran que mediante la alimentación controlada de glucosa y glutamina, se ha podido alcanzar distintos estados metabólicos, los cuales han sido caracterizados mediante la razón  $\Delta L/\Delta G$  (Gambhir et al., 2003). Se demostró que los cultivos caracterizados con valores bajos de  $\Delta L/\Delta G$ , presentaban menores concentraciones de lactato y amonio, y mayores densidades celulares y producción de proteína (Europa et al., 2000). También se pudo comprobar que existen diferencias en los niveles de expresión de las enzimas claves del metabolismo central del carbono, entre los distintos estados metabólicos. Para valores bajos de  $\Delta L/\Delta G$ , se obtuvieron menores flujos a través de la glicólisis y el ciclo del TCA, los que a su vez se correlacionan con la disminución en la expresión de las enzimas involucradas en estas reacciones (Korke et al., 2004).

### 1.2.3. Ingeniería celular

La ingeniería celular es ampliamente utilizada en aplicaciones industriales y médicas para crear células con propiedades mejoradas. Utilizando herramientas genéticas, se busca obtener cultivos con altas densidades, alta viabilidad y aumentar la productividad de un determinado producto. Mediante las técnicas de recombinación de DNA, se pueden manipular las vías metabólicas a nivel genético. Las herramientas utilizadas buscan modificar las vías existentes eliminando, subexpresando o sobreexpresando genes endógenos, introduciendo genes heterólogos o agregando nuevas vías metabólicas, que en definitiva permitan controlar la expresión de genes y modular las redes existentes en las células (Stephanopoulos and Stafford, 2002; Yadav et al., 2012).

Los avances más importantes alcanzados mediante la ingeniería celular, han tenido por objetivo las enzimas que participan en la vía de la glicólisis, de tal manera de reducir la producción de lactato y sus efectos inhibitorios sobre el crecimiento celular y la productividad. Por ejemplo, el *knockdown* de los genes GLUT1 o LDH-A, las transfecciones de la enzima piruvato carboxilasa o del transportador de fructosa GLUT5, han demostrado un aumento en la densidad celular, viabilidad y productividad (Nolan and Lee, 2012). La selección de clones, su adaptación a métodos de cultivos deseados y el mejoramiento de su productividad, han sido la clave para desarrollar nuevos procesos (Korke et al., 2002).

A continuación se presentan los estudios donde se han sobreexpresado las enzimas de interés para este trabajo, MDH y PYC, con el fin de mejorar el metabolismo de las células animales.

#### 1.2.3.1. Malato deshidrogenasa

En la mayoría de las células eucariontes existen dos formas de la enzima malato deshidrogenasa (MDH): una es la citosólica (cMDH) y otra la mitocondrial (mMDH). Como se observa en la Figura 2, el citrato puede apartarse del ciclo del TCA para formar acetil CoA y oxalacetato. Luego la enzima cMDH actúa en el citosol reduciendo el oxalacetato en malato

el que posteriormente ingresa a la mitocondria donde se convierte nuevamente en oxalacetato por la enzima mMDH (Zheng et al., 2005).

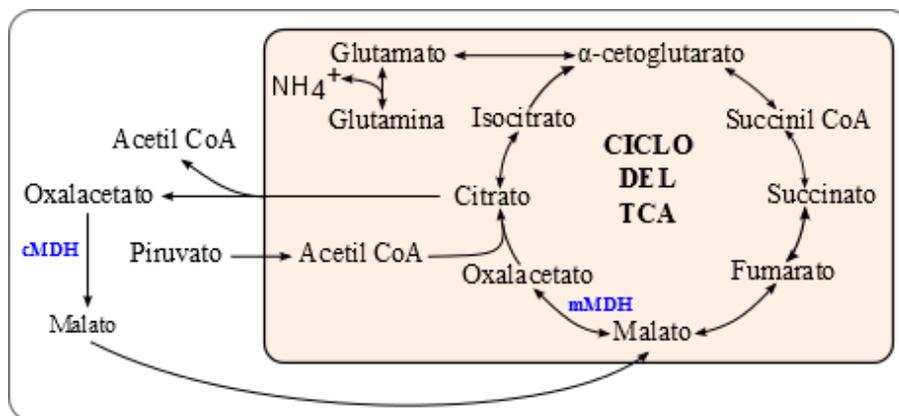


Figura 2. Interacción de las enzimas cMDH y mMDH.

En el trabajo de Chong y colaboradores (Chong et al., 2009), se identificaron a través de HPLC los metabolitos extracelulares presentes en el medio de un cultivo de células CHO productoras de IgG. Los resultados mostraron una acumulación significativa de malato. Esto llevó a formular la hipótesis de que el flujo de malato se debía a la acumulación intracelular de éste y que además podía estar asociado a un cuello de botella de la enzima MDH. En un segundo trabajo, sobreexpresaron la enzima MDHII en células CHO (Chong et al., 2010). Los resultados obtenidos se detallan a continuación:

- **Acumulación de malato.** Una posible fuente de exceso de malato podía derivar del aspartato presente en el medio por el ciclo de la urea (Figura 3). Para investigar la relación entre aspartato y malato, se inoculó las células con diferentes concentraciones de aspartato. Los resultados mostraron una correlación lineal entre ambos. Luego se midió la transferencia de  $C^{13}$  desde el aspartato hacia los metabolitos intracelulares del ciclo. Se vio que la tasa de transferencia del  $C^{13}$  desde el aspartato a malato fue mucho más rápida que de malato a oxalacetato, confirmando así la existencia del cuello de botella en MDHII.

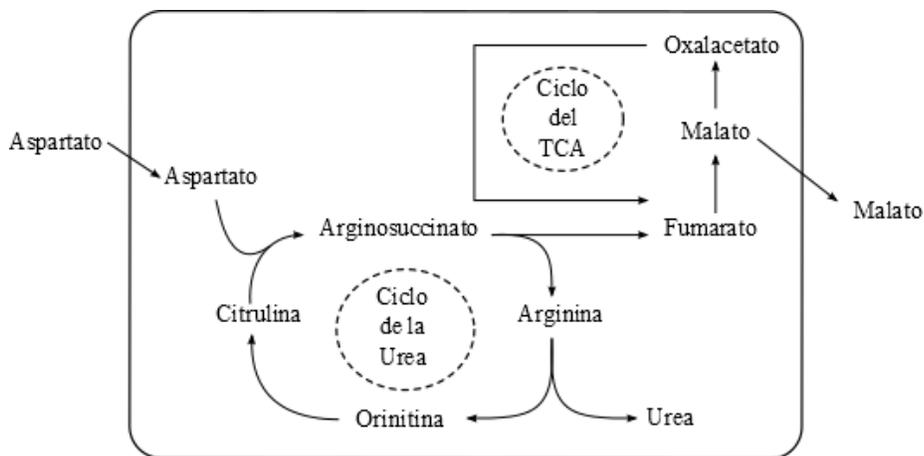


Figura 3. Relación entre el aspartato y malato en células CHO mAb. Adaptado de (Chong et al., 2010).

- **Sobreexpresión de MDHIII.** Se observó que en un cultivo fed-batch el crecimiento celular del clon CHO MDHIII fue 1,9 veces superior que el alcanzado por las células *wild-type*. Por otro lado, la tasa de secreción de malato y lactato fue un 40% menor que el control, demostrando una mayor actividad en la glicólisis, ya que menos lactato se produjo por célula. Otro resultado importante obtenido fue que la concentración de ATP y NADH en el clon fue entre 3,3 y 3,5 veces mayor que el control, lo que sugiere que el mejoramiento de la glicólisis en las células CHO, produjo un mayor estado de energía el cual posteriormente contribuyó al mejoramiento en el crecimiento.

#### 1.2.3.2. Piruvato Carboxilasa

La glucosa es degradada principalmente vía glicólisis debido a que no existe una buena conexión enzimática entre la glicólisis y el ciclo del TCA, lo que trae como consecuencia una alta producción de lactato. La enzima principal encargada de esta conexión es el complejo PDH el cual convierte el piruvato en acetil CoA. Existen estudios que confirman la baja o nula actividad del complejo PDH, además de otras enzimas que conectan las vías de la glicólisis con el ciclo del TCA, como la piruvato carboxilasa (PYC), que cataliza la reacción de piruvato en oxalacetato en el citoplasma, y la enzima fosfoenolpiruvato carboquinasa que convierte el fosfoenolpiruvato en piruvato (Figura 4). Además estos estudios confirman que la glucosa es principalmente metabolizada vía glicólisis, siendo muy baja la metabolización a través de las vías PPP y ciclo del TCA (Fitzpatrick et al., 1993; Neermann and Wagner, 1996). Con estos antecedentes, Irani y colaboradores propusieron insertar una copia del gen piruvato carboxilasa citosólica proveniente de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* PYC2 en la línea celular BHK-21 lo que permitiría transformar el piruvato proveniente de la glicólisis en malato, para luego ingresar al ciclo del TCA (Irani et al., 1999).

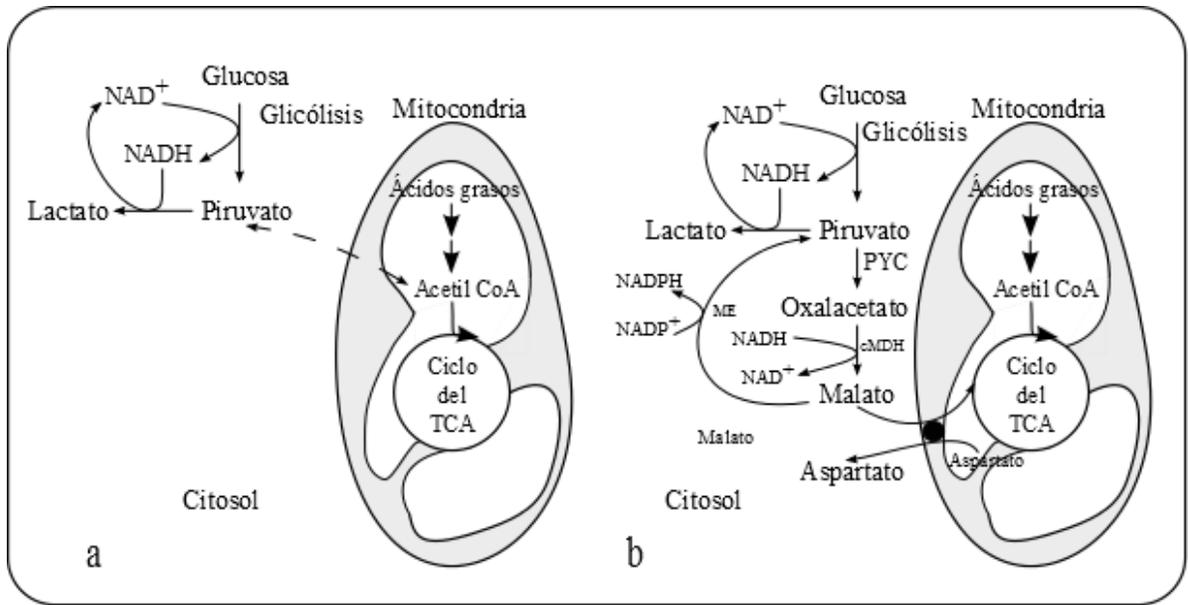


Figura 4. Esquema general del metabolismo de glucosa y ciclo del TCA en células animales. (a) Células sin PYC2. En la mitocondria el piruvato es convertido a acetil CoA por el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) y entra al ciclo del TCA. (b) Células expresando PYC2. El piruvato es convertido a oxalacetato e ingresa a la mitocondria como malato a través de la vía malato-aspartato. PYC2 compete con la LDH por el piruvato citoplasmático, dejando menos sustrato para la producción de lactato. Adaptado de (Irani et al., 1999).

Los resultados muestran que al final del período de un cultivo batch, las células que expresaban PYC2 presentan mayor viabilidad celular y un menor consumo de glucosa mientras que en las células control la glucosa es consumida por completo. La producción de lactato se ve reducida 2.5 veces sobre el control y la utilización de glutamina se vio reducida en 1.8 veces sobre el control. Luego se realizó otro cultivo en un reactor CSTR bajo condiciones controladas, de un clon seleccionado y el control. Si bien la densidad celular fue muy similar, se observó un mejoramiento en la utilización de glucosa y glutamina de hasta 1.8 y 1.4 veces respectivamente y la producción de lactato disminuyó en 2.3 veces. La extracción celular de nucleótidos demostró un leve aumento en la concentración de ATP intracelular del clon PYC2. El flujo de glucosa dentro del ciclo del TCA fue medido utilizando  $C^{14}$ . El clon mostro oxidar 1.4 veces más glucosa a  $CO_2$  que el control, demostrando que el mejoramiento en las tasas de consumo se debe a un mayor flujo de glucosa dentro del ciclo del TCA.

#### 1.2.4. Análisis expresión transcripcional

Muchas de las actividades celulares como la sobrevivencia, crecimiento y diferenciación, se ven reflejadas en patrones alterados en la expresión de los genes. La capacidad para cuantificar los niveles de expresión de los genes se ha vuelto cada vez más importante para el estudio de la función génica (Bustin, 2000). Dentro de los métodos utilizados para cuantificar la expresión de genes, se encuentra el PCR en tiempo real (qPCR). Este se ha convertido en uno de los métodos más utilizados debido a que presenta una alta sensibilidad y no necesita de un procesamiento posterior a la amplificación (Wong and Medrano, 2005).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que sirve para amplificar un fragmento de DNA. El método se basa en la capacidad de la enzima DNA polimerasa para sintetizar una nueva hebra de DNA complementaria al templado. Como la enzima solo puede añadir nucleótidos sobre un grupo 3'-OH preexistente, se necesita un partidor al que se pueda añadir el primer nucleótido. El PCR consiste en tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas, las que se repiten cíclicamente entre 20-40 veces. La primera reacción es la denaturación del templado de DNA a 94-96°C, en la segunda los partidores se alinean con el templado respectivo y en la tercera se realiza la extensión de la nueva hebra de DNA a cargo de la enzima DNA polimerasa. La amplificación del DNA es exponencial, luego la cantidad de copias será  $2^{n+1}$  donde n corresponde al número de ciclos (NCBI).

En el qPCR, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea. La detección se hace mediante fluorescencia, la cual es proporcional a la cantidad de DNA formado. El PCR puede ser dividido en cuatro etapas principales (Figura 5). La primera corresponde a la línea base (10-15 ciclos) y es donde la fluorescencia no es significativa, ya que no ha superado el umbral. La fluorescencia base se calcula en este período. El umbral es un nivel arbitrario de fluorescencia elegido sobre la variabilidad de la línea base. Una señal que es detectada por encima del umbral se considera una señal real que se puede utilizar para definir el ciclo umbral ( $C_t$ , *threshold cycle*) o punto de corte ( $C_p$ , *crossing point*). En la fase exponencial temprana, la cantidad de fluorescencia alcanza un umbral que es significativamente mayor (por lo general 10 veces la desviación estándar de la línea de base) que la línea base. El ciclo en que ocurre esto se denomina  $C_p$  y es inversamente proporcional a la concentración inicial de DNA presente en cada muestra, es decir, a mayor cantidad de DNA inicial en la muestra, más rápido aparece la señal fluorescente produciendo un menor  $C_p$ . Durante la etapa exponencial, el PCR alcanza su período de amplificación óptimo con la duplicación del producto de PCR después de cada ciclo en condiciones ideales de reacción. Por último, la reacción llega a un estado estacionario cuando los componentes de reacción se vuelven limitados y la intensidad de fluorescencia ya no es útil para el cálculo de los datos (Wong and Medrano, 2005).

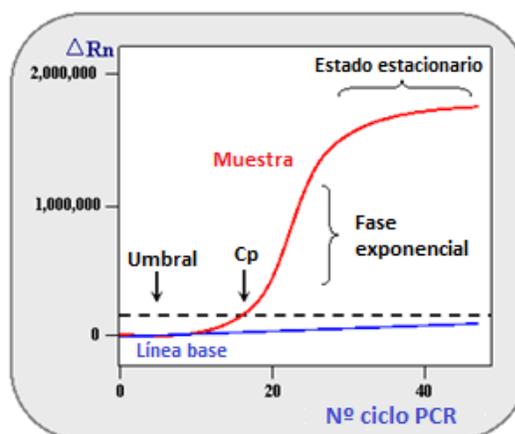


Figura 5. Gráfico del modelo de PCR en tiempo real. En el gráfico se muestra el valor de  $\Delta Rn$  versus el número de ciclos. La línea base corresponde a los ciclos de PCR en donde se acumula una señal de fluorescencia por debajo de los límites de detección del instrumento.  $\Delta Rn$  es el incremento de fluorescencia en cada punto. El umbral es un nivel arbitrario de fluorescencia elegido sobre la variabilidad de la línea base. El  $C_p$  corresponde al número de ciclo del PCR en que la fluorescencia es mayor que el umbral (NCBI).

Existen distintos métodos de detección en el qPCR. Sus diferencias radican básicamente en la especificidad y el costo. El más simple y económico son los marcadores fluorescentes (SYBR Green) que se unen específicamente al DNA de doble hebra (Figura 6). Cuando el marcador no está unido exhibe una leve fluorescencia en solución, pero durante la amplificación cantidades crecientes de marcador se unen al DNA de doble hebra que se va formando. Esto resulta en un incremento en la señal de fluorescencia y puede ser medida durante la etapa de elongación donde actúa la polimerasa. La señal decae cuando el DNA es denaturado.

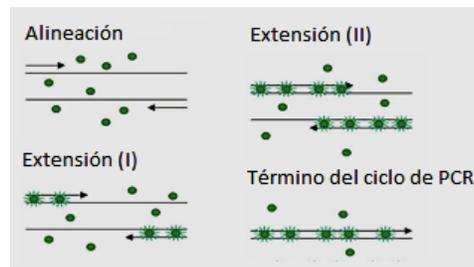


Figura 6. Esquema del funcionamiento de los marcadores fluorescentes (van der Velden et al., 2003).

Debido a que la presencia de cualquier DNA de doble hebra genera fluorescencia, la especificidad de este método está determinada por el diseño de los partidores. Para evaluar si los productos de PCR son específicos, se puede realizar un análisis de la curva de *melting*. Este consiste en aumentar la temperatura lentamente desde 40 a 95°C monitoreando la fluorescencia. La fluorescencia será alta a bajas temperaturas cuando todo el DNA sea de doble hebra, pero disminuirá rápidamente en torno a la temperatura de *melting* ( $T_m$ ) del producto de amplificación. Los productos de PCR de distinto largo o secuencia, se disocian a distintas temperaturas y presentan *peaks* característicos cuando se grafica la primera derivada negativa de la fluorescencia versus la temperatura (Figura 7). Si se ha formado un solo producto de PCR, se observará un *peak* en la curva de *melting* (van der Velden et al., 2003).

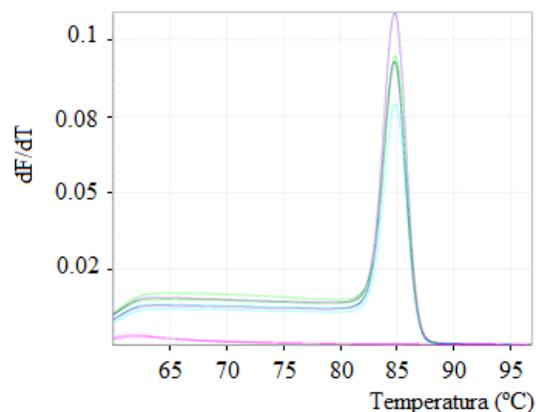


Figura 7. Curva de *melting* para la medición de un gen en distintas muestras. Se observa un único *peak* para todas las muestras ( $T_m$  aprox. 85°C), lo cual indica la presencia de un producto específico de PCR. La línea rosada corresponde a la muestra control en donde se reemplazó el DNA por agua. En ella no se observa un *peak*, lo cual indica que no hubo amplificación.

Como se mencionó anteriormente, el diseño de los partidores es muy importante para obtener resultados confiables. Algunos de los parámetros más importantes que se deben tener en cuenta para el diseño son: el largo óptimo de los partidores debe ser entre 15 y 20 b, el contenido de G/C debe ser entre 20 y 70%, la Tm no debe diferir en más de 2°C y el producto de PCR no debe ser superior a 200 bp (Bustin, 2000).

También es muy importante definir qué tipo de cuantificación se va a utilizar. En la cuantificación absoluta es necesario crear una curva estándar o de calibración. Esta se genera a partir de diluciones en series de una muestra conocida. La curva presenta una relación lineal entre el Cp y la cantidad inicial de cDNA, que permite obtener la concentración de una muestra desconocida en base a su Cp. Es importante que la concentración de las diluciones abarque los niveles en las muestras experimentales y permanezca dentro del rango de los niveles de cuantificación y detección del equipo de PCR utilizado. En la cuantificación relativa, los cambios de expresión de los genes en una muestra son medidos por medio de una muestra de referencia, también conocido como calibrador. Para este caso los resultados son expresados como la razón muestra/calibrador. Existen varios modelos matemáticos para calcular la expresión normalizada del gen en ensayos de cuantificación relativa. Uno es el método comparativo de Cp ( $2^{-\Delta\Delta C_p}$ ), que calcula las veces de cambio en la expresión génica como una diferencia relativa entre una muestra experimental y el calibrador. Si bien este método incluye una corrección para la eficiencia de amplificación, la cinética de amplificación del gen a medir y el gen de referencia debe ser aproximadamente igual, ya que de manera contraria se generará errores cuando se utiliza este método (Bustin, 2000).

## 1.3. Objetivos

### 1.3.1. Objetivo general

Caracterizar los clones PYC y MDHII de células CHO productoras de IgG mediante análisis metabólico y expresión transcripcional.

### 1.3.2. Objetivos específicos

- Comparar la densidad celular entre clones.
- Determinar que clones presentan mayor eficiencia metabólica ( $\Delta L/\Delta G$ ).
- Comparar la productividad específica de IgG entre clones.
- Comparar el nivel de expresión de los genes clonados.

## 1.4. Alcances

Actualmente en la industria farmacéutica los sistemas de expresión más utilizados son las células animales. Debido a la gran demanda, se busca optimizar los cultivos celulares para obtener mayores tasas de producción de proteína recombinante. Numerosos estudios indican que mediante la ingeniería celular se puede modificar el metabolismo de las células para disminuir la producción de metabolitos que inhiben el crecimiento celular y la producción de proteína. Dentro de estos estudios se encuentran los clones MDHII y PYC, donde se ha visto que estos genes podrían generar una mejora en el metabolismo del carbono, produciendo menos lactato y mejorando las actividades de la glicólisis y ciclo del TCA. Se desea estudiar el comportamiento de estos clones y compararlos entre sí para determinar cuál presenta mayor producción de anticuerpo, menor producción de lactato y mayor densidad celular. Además se desea comparar el nivel de transcripción de los genes sobreexpresados. En particular se seleccionó las células CHO debido a que están bien caracterizadas, presentan altas tasa de producción de proteína y son fácilmente adaptables a crecimiento en escalas industriales.

# CAPÍTULO II. Materiales y Metodología

## 2.1. Materiales

### 2.1.1. Reactivos

En la Tabla 1 se muestran los principales reactivos utilizados en los procedimientos.

Tabla 1. Reactivos principales utilizados en el trabajo. Se detalla el proveedor y el procedimiento donde se utilizó.

Reactivo	Proveedor	Procedimiento
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose	Gibco	Cultivo de células
F-12 Nutrient Mixture	Gibco	Cultivo de células
Antibiótico y antimicótico	Gibco	Cultivo de células
Higromicina B	Invitrogen	Cultivo de células
SFB Hyclone SH30910.03	Thermo Scientific	Cultivo de células
Kit RANDOX GLUC-PAP	Randox	Medición de Glucosa
Kit RANDOX LAC-PAP	Randox	Medición de Lactato
ImmunoPure Human Gamma Globulin	Pierce	Medición de Anticuerpo
Anti-Human IgG (Fc specific)	Sigma-Aldrich	Medición de Anticuerpo
Monoclonal Anti-Human IgG-Alkaline Phosphatase	Sigma-Aldrich	Medición de Anticuerpo
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Quiagen	Extracción RNA
DNA-free <sup>™</sup> Kit	Ambion	Purificación RNA
Kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis	Roche	Síntesis de cDNA
Partidores	Integrated DNA Technologies	qPCR
FastStart Essential DNA Green Master	Roche	qPCR

### 2.1.2. Equipos

En la Tabla 2 se muestran los principales equipos empleados en el trabajo.

Tabla 2. Equipos principales utilizados en los procedimientos. Se detalla el fabricante y modelo.

Equipo	Fabricante/Modelo
Cámara de Flujo Laminar Horizontal	NUAIRE/NV-201-330E
Incubadora	Shel Lab/ TC2323
Centrífuga Falcon	BOECO/C-28
Centrífuga Eppendorf	BOECO/M-24 A

Centrífuga Deep Well	IEC/Centra MP4R
Microscopio	Olympus/CK2
Espectrofotómetro	Pharmacia Biotech/Ultrospec 3000
Espectrofotómetro de placa de 96 pocillos	Biochrom Asys/UVM340
Termociclador	JKI <sup>®</sup> /JK-JY-96G PCR Genemate
LightCycler <sup>®</sup> Nano Instrument	Roche
Bomba de vacío	Rocker/600

### 2.1.3. Material de Laboratorio

En la Tabla 3 se muestran algunos de los materiales de laboratorio más utilizados en los procedimientos.

Tabla 3. Materiales más utilizados en los procedimientos.

Material	Especificación
Placas de cultivo petri	60, 100 mm
Placas de cultivo T-Flask	25, 75 [cm <sup>2</sup> ]
Tubos Eppendorf	0,2, 0,6, 1,5, 2,0 [mL]
Tubos Falcon	15 y 50[ mL]
Pipetas	1, 5, 10, 25 [mL]
Micropipeta	2, 20, 200, 1000, 5000 [µL]
Micropipeta Multicanal	20, 200 [ µL]
Crioviales	2 [mL]
Propipeta	
Placas de 96 Pocillos	
Cámara de Naubauer	
Contador de células	

### 2.1.4. Herramientas Computacionales

En la Tabla 4 se muestran las herramientas computacionales utilizadas en el desarrollo del trabajo.

Tabla 4. Herramientas computacionales.

Herramienta	Fuente
Secuencias genes	NCBI, CHO genome
Blast, Primer-Blast	NCBI
Diseño partidores	Primer3Plus
LightCycler <sup>®</sup> Nano Software V1.0	Roche
MATLAB <sup>®</sup>	Versión 7.8.0.247 (R2009), 32 bits

## 2.2. Metodología

El trabajo se desarrolló en los laboratorios del Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología (CIBYB). Se utilizó la línea celular CHO DP-12 (ATCC # CRL-12444) productora de IgG1 humano.

La metodología y el plan de trabajo aplicados en este trabajo se puede resumir mediante el esquema mostrado en la Figura 8. El trabajo se inició con la selección de los clones CHO MDHII y CHO PYC dentro de un pool de clones para cada uno. El criterio de selección aplicado fue mayor productividad específica de IgG y menor  $\Delta L/\Delta G$ . Luego se prosiguió con la caracterización metabólica de los clones seleccionados y el control CHO *wild-type*. Para esto se realizaron las curvas de crecimiento, tomando muestras del sobrenadante en cada punto, de los cuales posteriormente se midió concentración de lactato, glucosa, amonio y anticuerpo IgG. Con estos datos se obtuvo la eficiencia metabólica de las muestras ( $\Delta L/\Delta G$ ) y la productividad de IgG. Por último se realizó el análisis transcripcional para lo cual se extrajo el RNA de las muestras y se sintetizó el cDNA. Este último se utilizó de templado para el qPCR.

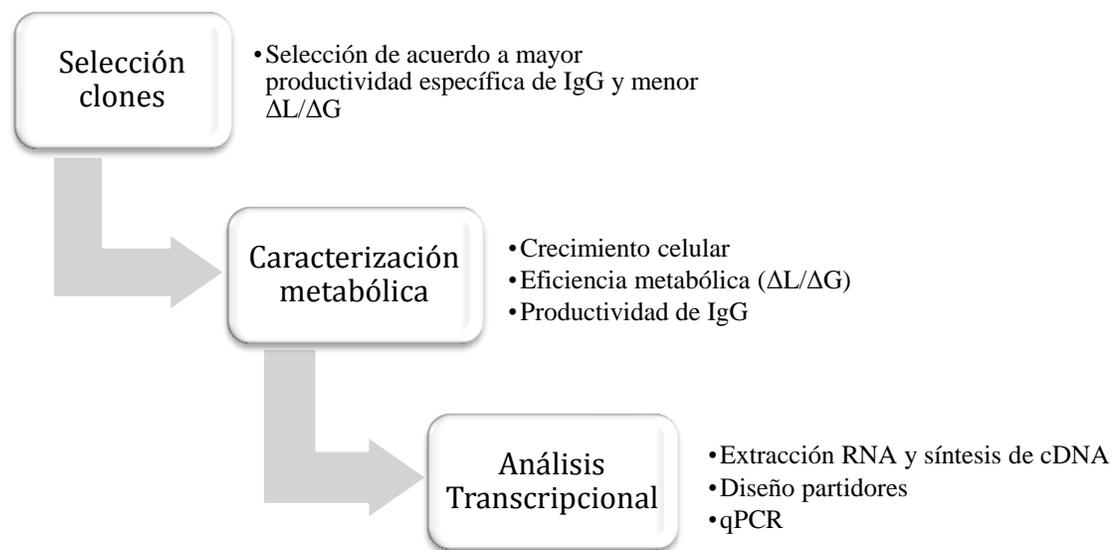


Figura 8. Diagrama de bloques de la metodología aplicada en el trabajo.

A continuación se describe en detalle los procedimientos aplicados en el trabajo.

### 2.2.1. Medio de cultivo

Las células se crecieron en una mezcla de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose y F-12 Nutrient Mixture (1:1 (v:v)). El medio fue suplementado con

2,4 g/L de bicarbonato de sodio, 0,1 mL/L de etanolamina, 0,01 g/L de ácido ascórbico, 1 µL/L de Sodium Selenite, 1,65 µL/L de β-mercaptoetanol, 0,001 g/L de putrecina, 0,2 g/L de plurónic F-68, 1% de antibiótico y antimicótico y 5% de suero fetal bovino. La concentración de glucosa y glutamina en el medio fue 17,5 mM y 2,5 mM, respectivamente. En el Anexo A.1 se encuentra la composición completa del medio de cultivo. Para el crecimiento de los clones CHO PYC y MDHII, las células se mantuvieron bajo presión de selección con 0,5% de higromicina. El medio fue preparado bajo condiciones de esterilidad, en cámara de flujo laminar horizontal (NUAIRE, NU-201-330E) y fue esterilizado con una unidad de filtrado con filtro de membrana de celulosa de 0,2 µm y una bomba de vacío (Rocker, 600).

### **2.2.2. Curvas de crecimiento**

Antes de realizar las curvas de crecimiento, se descongelaron las células desde un banco de trabajo conservado a -80°C (protocolo en el Anexo A.2). La cantidad de células necesarias para iniciar las curvas se obtuvo realizando pasajes 2 a 3 veces por semana (protocolo en el Anexo A.3). La manipulación de las células se realizó bajo condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar horizontal (NUAIRE, NU-201-330E).

Cada curva se hizo en duplicado por un período de 7-8 días, hasta que la viabilidad descendiera a un 80%, y tomando muestras cada 12 horas para análisis. Se utilizaron placas petri de 60 mm inoculadas a una concentración de  $2,5 \times 10^5$  células/mL con 5 mL de medio de cultivo. Se crecieron dentro de una incubadora (Shel Lab, TC2323) con atmósfera controlada a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. En cada punto se obtuvo una muestra del medio de cultivo para medir metabolitos extracelulares; glucosa, lactato, amonio y anticuerpo IgG. Las muestras se conservaron a -20°C. El procedimiento se encuentra en Anexo A.4.

Las curvas de crecimiento se construyeron con el promedio de la concentración de células viables y aplicando una regresión polinomial de grado 3.

### **2.2.3. Densidad y viabilidad celular**

La concentración y viabilidad celular se determinaron mediante conteo microscópico empleando un hemocitómetro, un contador y colorante azul tripán (protocolo en el Anexo A.5).

### **2.2.4. Medición de Metabolitos extracelulares**

#### *2.2.4.1. Medición de Glucosa y Lactato*

La concentración de glucosa y lactato se determinó mediante análisis enzimático utilizando el Kit RANDOX GLUC-PAP para glucosa y el Kit RANDOX LAC-PAP para lactato. Se siguió el protocolo del fabricante adaptado a placa de 96 pocillos (Anexo A.6).

#### 2.2.4.2. *Medición de Amonio*

La concentración de amonio se obtuvo mediante el método del fenol. Se construyó una curva de calibración en duplicado, empleando como estándar diluciones de una solución de 10 mM de  $\text{NH}_4^+$ , la que se preparó con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y medio de cultivo. El protocolo fue adaptado para trabajar en placas de 96 pocillos y cuantificar entre 0 y 6 mM de amonio, para lo cual se hicieron diluciones en las siguientes concentraciones: 6,0, 4,0, 3,0, 2,0, 1,5, 1,0, 0,5, 0 mM. En cada pocillo se agregó 6  $\mu\text{L}$  de muestra, 120  $\mu\text{L}$  de una solución de hipoclorito de sodio 33,3 mM y NaOH 562,5 mM, y 120  $\mu\text{L}$  de una solución de fenol 487,6 mM y nitroprusiato de sodio 1 mM. Se colocó la placa en incubadora (Shel Lab, TC2323) por 10 minutos a 37°C y luego se midió la absorbancia a 630 nm en espectrofotómetro de placa de 96 pocillos (Biochrom Asys/UVM340). El detalle del protocolo se encuentra en el Anexo A.7.

#### 2.2.4.3. *Medición de Anticuerpo IgG*

La concentración de anticuerpo IgG se determinó mediante un ensayo ELISA. Se construyó una curva de calibración en triplicado, empleando la muestra estándar ImmunoPure Human Gamma Globulin (Pierce) con una concentración inicial de 11,3 mg/mL. La muestra estándar se diluyó 3 veces hasta llegar a una concentración de 400 ng/mL. Luego se construyó la curva con las siguientes concentraciones: 200, 100, 50, 25 y 12,5 ng/mL. Primero se incubaron dos placas de 96 pocillos con el anticuerpo primario Anti-Human IgG (Fc specific) (Sigma-Aldrich, dilución 1:1000). En cada placa se preparó la curva de calibración en triplicado. Para las muestras a medir, se hizo una primera dilución de 1:64, la cual se preparó en tubos Eppendorf de 1,5 mL agregando 10  $\mu\text{L}$  de muestra y 630  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ. La primera placa se preparó con una dilución 1:128, transfiriendo 50  $\mu\text{L}$  de la dilución 1:64 más 50  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ. La segunda placa se preparó con una dilución 1:256, transfiriendo 50  $\mu\text{L}$  de la dilución 1:128 más 50  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ. Debido a que el protocolo requiere un volumen de muestra de 50  $\mu\text{L}$ , fue necesario sacar (de la placa diluida 256 veces) 50  $\mu\text{L}$  de cada pocillo. Ambas placas fueron incubadas a 37°C durante 1 hora. Luego se agregó el anticuerpo secundario Monoclonal Anti-Human IgG-Alkaline Phosphatase (Sigma-Aldrich, dilución 1:1000) y se incubaron nuevamente a 37°C durante 1 hora. Por último se utilizó SIGMAFAST™ p-Nitrophenyl Phosphate Tablets (Sigma-Aldrich) para la detección de la reacción y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro de placa de 96 pocillos (Biochrom Asys/UVM340) a 405 nm durante 15 minutos. El detalle del protocolo encuentra en el Anexo A.8.

#### 2.2.4.4. *Determinación de tasas específicas*

Para determinar la tasa específica de producción o consumo de metabolitos, se construyeron las curvas de acumulación sumando la diferencia en la cantidad de metabolito presente en el cultivo entre dos tiempos consecutivos. Luego se aplicó la regresión polinomial que más se ajustaba a la curva. La tasa específica se calculó como se muestra en la siguiente ecuación:

$$q_x = \frac{1}{X_v * V} * \frac{d[x]}{dt}$$

donde  $d[x]/dt$  es la derivada de la curva de acumulación del metabolito,  $X_v$  es la densidad celular evaluada en cada punto y  $V$  es el volumen en cada punto. El valor de  $\Delta L/\Delta G$  se calculó como la pendiente de la curva de acumulación de lactato versus acumulación de glucosa en la fase exponencial de crecimiento. La tasa máxima de crecimiento celular ( $\mu_{max}$ ) se calculó como la pendiente de la curva  $\ln(X_v)$  versus tiempo, en la fase exponencial.

## 2.2.5. Análisis Transcripcional

### 2.2.5.1. Extracción de RNA

Primero se hizo un cultivo de las células CHO *wild-type*, los clones PYC y MDHII en placas petri de 100 mm y T-Flask de 75 cm<sup>2</sup>, inoculadas a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/mL con 15 mL de medio de cultivo. Se crecieron dentro de una incubadora (Shel Lab, TC2323) con atmósfera controlada a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Las células fueron recolectadas a las 48 horas, en la mitad de la fase exponencial, obteniendo alrededor de 10-15 millones de células por cada muestra en duplicado.

El RNA total fue extraído de las muestras utilizando el RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Quiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante (Anexo A.9). El RNA fue resuspendido en 50  $\mu$ L de agua libre de RNasa y almacenado a -80°C hasta su posterior procesamiento. La integridad del RNA fue verificada corriendo un gel al 1% de agarosa a 40 V por 30 minutos (protocolo en Anexo A.10). Para obtener la cantidad y pureza del RNA se midió la absorbancia a 260 y 280 nm en espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000).

Para eliminar el DNA residual que pudiera estar presente en las muestras, se hizo una digestión del RNA mediante el DNA-free<sup>™</sup> Kit (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante (Anexo A.11). Se corrió un segundo gel de agarosa para comprobar la integridad del RNA y se midió nuevamente cantidad y pureza del RNA digerido.

### 2.2.5.2. Medición de la concentración y pureza del RNA

La concentración de RNA se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000) y aplicando la siguiente fórmula:

$$[RNA] = ABS_{260} * FD * 40 \left( \frac{\mu g}{mL} \right)$$

donde FD corresponde al factor de dilución. La pureza se calculó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000) y aplicando la siguiente fórmula:

$$Pureza = \frac{ABS_{260}}{ABS_{280}} \geq 1,8$$

#### 2.2.5.3. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se hizo a partir de 1 µg de RNA utilizando el Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). El kit cuenta con dos tipos de partidores; oligonucleótidos poly(dT)<sub>18</sub> y hexámeros *random*. En este caso se utilizaron los partidores poly(dT)<sub>18</sub>, para generar cDNA de largo completo, obteniendo así la totalidad de la población de RNA presente al inicio de la síntesis. En tubos Eppendorf estériles de 0,2 mL se preparó un mix con el RNA y agua PCR *grade* para cada muestra. En el Anexo A.12, se muestra la cantidad de RNA de cada muestra y la cantidad en µL necesaria para un volumen total de 13 µL. Los tubos fueron sometidos a una incubación de 10 min a 65°C en el termociclador (JKI<sup>®</sup>, JK-JY-96G PCR Genemate), con el fin de denaturar las estructuras secundarias del RNA. Luego se agregó a cada muestra el buffer, protector inhibidor RNasa, mix dNTPs y la enzima transcriptasa reversa (RT). Las muestras fueron llevadas al termociclador (JKI<sup>®</sup>, JK-JY-96G PCR Genemate) donde se corrió el siguiente programa: reacción de la RT a 50°C por 60 minutos e inhibición de la RT a 85°C por 5 minutos. La reacción se detuvo enfriando las muestras a 4°C. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior procesamiento.

#### 2.2.5.4. Diseño de partidores

La secuencia de los genes PYC de *Saccharomyces cerevisiae*, PYC de CHO y Cdc42 de CHO se obtuvieron de la base de datos de NCBI. La secuencia del gen MDHII de CHO se obtuvo de la base de datos de CHO genome. En el Anexo A.13 se encuentran las secuencias de cada gen. Mediante la herramienta Primer3Plus se diseñaron los partidores para cada gen los que fueron sintetizados por IDT<sup>®</sup>. Los parámetros más importantes para el diseño fueron:

- Tamaño del partidor entre 18 y 27 b, siendo el óptimo 20 b.
- T<sub>m</sub> del partidor entre 57 y 63°C, siendo el óptimo 60°C.
- Tamaño del producto amplificado entre 100 y 200 pb, siendo el óptimo 150 pb.

#### 2.2.5.5. PCR en tiempo real

Para la detección de los productos del PCR se utilizó el kit FastStart Essential DNA Green Master (Roche) que emplea el marcador fluorescente SYBR Green. La reacción se llevó a cabo en el equipo LightCycler<sup>®</sup> Nano Instrument (Roche), utilizando los tubos para PCR LightCycler<sup>®</sup> 8-Tube Strips (Roche). El equipo tiene la capacidad de correr 32 muestras simultáneas. Los datos son grabados y analizados mediante el LightCycler<sup>®</sup> Nano Software V1.0 (Roche). El análisis de datos se realizó mediante una cuantificación relativa donde fue necesario definir los siguientes elementos:

- *Target*: el o los genes que se quieren cuantificar. En este caso se definieron tres target:
  - o *Target 1*: gen PYC nativo de CHO.
  - o *Target 2*: gen PYC proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*.
  - o *Target 3*: gen MDHII nativo de CHO.
- *Reference*: gen de referencia que sirve para normalizar los datos. Este gen debe presentar niveles de transcripción constantes frente a diversos cambios realizados en la célula. En este caso se utilizó el gen Cdc42 de CHO ya que se ha visto que su

transcrito se expresa a niveles altos y permanece constante en ensayos de microarreglos para células CHO (Yee et al., 2009).

- *Calibrator*: es la muestra (línea celular) que se utiliza para normalizar los datos. En este caso el calibrador fue la línea celular CHO *wild-type* que también se utilizó como control para los demás experimentos.

Se realizaron dos PCR, uno para cada muestra del duplicado biológico, donde a su vez cada una de ellas se corrió en duplicado experimental. Además se corrieron 4 controles negativos (uno para cada gen) donde se reemplazó el cDNA por agua y 3 controles negativos de la reacción-RT, los cuales fueron preparados en la síntesis de cDNA y donde se reemplazó la enzima RT por agua.

Se prepararon 4 mix de PCR, en tubos Eppendorf de 1,5 mL autoclavados y esterilizados bajo luz UV, como se muestra a continuación:

- 11 reacciones de 15  $\mu$ L para el *reference*.
- 7 reacciones de 15  $\mu$ L para cada *target 1*, *target 2* y *target 3*.

Cada mix de PCR para el target específico se preparó con 10  $\mu$ L de Master Mix, 3  $\mu$ L de agua PCR *grade*, 1  $\mu$ L de partidor sentido (5  $\mu$ M) y 1  $\mu$ L de partidor anti-sentido (5  $\mu$ M). Se agregó 15  $\mu$ L del mix de PCR a cada tubo según el esquema mostrado en la Tabla 5.

Tabla 5. Distribución de los target a medir en cada PCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Strip A</b>	<i>Target 1</i>	<i>Reference</i>						
<b>Strip B</b>	<i>Target 2</i>	<i>Reference</i>						
<b>Strip C</b>	<i>Target 3</i>	<i>Reference</i>						
<b>Strip D</b>	<i>Reference</i>	-						

Luego se preparó una dilución 1:15 de cada muestra de cDNA con agua MilliQ estéril. Se agregaron 5  $\mu$ L de las muestras de cDNA diluidas a los tubos con el mix, según el esquema mostrado en la Tabla 6. Las filas 7 y 8 corresponden a los controles negativos anteriormente mencionados.

Tabla 6. Distribución de la muestras en cada PCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Strip A</b>	Control	Control	PYC	PYC	MDHII	MDHII	H2O	RNA Control
<b>Strip B</b>	Control	Control	PYC	PYC	MDHII	MDHII	H2O	RNA PYC
<b>Strip C</b>	Control	Control	PYC	PYC	MDHII	MDHII	H2O	RNA MDHII
<b>Strip D</b>	Control	Control	PYC	PYC	MDHII	MDHII	H2O	-

Para la manipulación de los reactivos del kit y las muestras de cDNA, se utilizaron puntas autoclavadas con filtro y libres de RNasa. Además se utilizaron distintas micropipetas para preparar el mix y agregar el cDNA, de tal manera de evitar la contaminación de los reactivos del kit con DNA.

Una vez preparada las muestras, se colocaron los tubos en placas *Deep well* y en centrífuga (IEC, Centra MP4R) a 1.500 x g por 1 minuto para que todo el mix se depositara en el fondo. El programa utilizado en la reacción de PCR se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Programa de qPCR.

Programa		Temperatura (°C)	Ramp (°C/s)	Tiempo (s)
Hold		95	4	600
3-Step Amplification	45 ciclos	95	5	15
		50*	4	20
		72	4	20
Hold		95	5	10
Melting	Etapa inicial	60	4	60
	Etapa final	97	0,1	1

\*Depende de la Tm del partidor. Se calculó como el promedio de las temperaturas de todos los partidores sentido y antisentido menos 5°C. En la Tabla 18 (sección 3.2.1) se encuentran las temperaturas para cada partidor.

La cuantificación de la expresión de los genes se hizo mediante el método de comparación de Cp en el que se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Veces de cambio} = 2^{-\Delta\Delta C_p}$$

Donde  $\Delta\Delta C_p$  se calcula para cada gen como:

$$\Delta\Delta C_p = \Delta C_p^{\text{Target}} - \Delta C_p^{\text{Calibrator}}$$

Y  $\Delta C_p$  se calcula como:

$$\Delta C_p = C_p^{\text{Target}_{\text{muestra}}} - C_p^{\text{Reference}_{\text{muestra}}}$$

# CAPÍTULO III. Resultados y Discusiones

## 3.2 Selección de Clones

En un trabajo previo, realizado por Camila Wilkens Ph.D(c), se generaron los clones CHO PYC y CHO MDHII mediante la transfección de células CHO con los vectores PCMVSHÉ-PYC2 (fuente: Dr. Roland Wagner) y pcDNA3.1 Hygro-MDHII (fuente: Dr. Miranda Yap). La selección de clones se inició con una dilución al límite seguida de tres selecciones donde se determinó densidad celular, el valor de  $\Delta L/\Delta G$  y tiempo de duplicación. Finalmente se escogieron 4 clones para cada gen. Los clones CHO MDHII seleccionados fueron 1, 3, 6 y 8 y los clones CHO PYC seleccionados fueron 7, 12, 14 y 17.

Se realizó un primer estudio para observar las mejoras que presentaban los clones seleccionados. Para ellos se juntaron muestras de los 4 clones seleccionados descritos anteriormente en una sola población obteniendo 2 *pools*; uno de células CHO PYC y otro de CHO MDHII. Los *pools* alcanzaron mayores densidades celulares, menores  $\Delta L/\Delta G$  y mayor producción de anticuerpo IgG. En la tabla Tabla 8 se muestran los parámetros obtenidos.

Tabla 8. Parámetros de los cultivos CHO *wild-type*, CHO MDHII y CHO PYC (WILKENS Díaz-Muñoz, 2011).

Experimento	$X_{V_{max}}$ ( $10^6$ células/mL)	$\mu_{max}$ ( $10^{-2}$ hrs $^{-1}$ )	$\Delta L/\Delta G$	$q_{IgG}$ (%)
CHO <i>wild-type</i>	0,8	1,81	1,5	100
CHO MDHII	1,2	2,02	1,17	194
CHO PYC	1,4	2,45	1,09	200

Una vez comprobado que los clones presentaban mejoras sobre el control, se continuó con la última etapa de selección que consistió en realizar curvas de crecimiento, determinar consumo de glucosa, producción de lactato y anticuerpo IgG, para cada clon. El trabajo realizado en esta memoria se inició con el análisis de estos datos, con el fin de seleccionar el mejor clon CHO MDHII y clon CHO PYC, para su caracterización posterior. A continuación se muestran los resultados obtenidos de esta última etapa de selección y el análisis que permitió seleccionar a los mejores clones.

En el Gráfico 1 se muestran las curvas de crecimiento para los cuatro clones CHO MDHII seleccionados. Los clones 1, 3 y 8 mostraron densidades celulares mayores al control, superando a este último entre un 50% y 100%. En particular, el clon 1 presentó la mayor densidad celular con un valor de  $1,6 \times 10^6$  células/mL. En contraste, el clon 6 alcanzó la menor densidad celular con un máximo de  $0,8 \times 10^6$  células/mL siendo además igual al control. En el Gráfico 2 se muestran las curvas de crecimiento para los cuatro clones CHO PYC seleccionados. En este caso, los clones 12, 14 y 17 obtuvieron densidades mayores al control, aumentando la producción de biomasa entre un 25% y 113%. La mayor densidad celular la

obtuvo el clon 14 con un valor de  $1,7 \times 10^6$  células/mL y el clon 7 presentó la menor producción de biomasa, alcanzando un máximo de  $0,6 \times 10^6$  células/mL siendo incluso menor que el control.

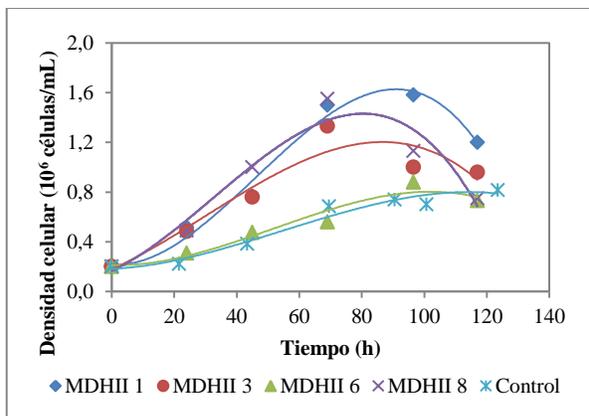


Gráfico 1. Curvas de crecimiento de los clones CHO MDHII. La línea azul corresponde al clon 1, la línea roja al clon 3, la línea verde al clon 6, la línea morada al clon 8 y la línea calipso a CHO *wild-type*.

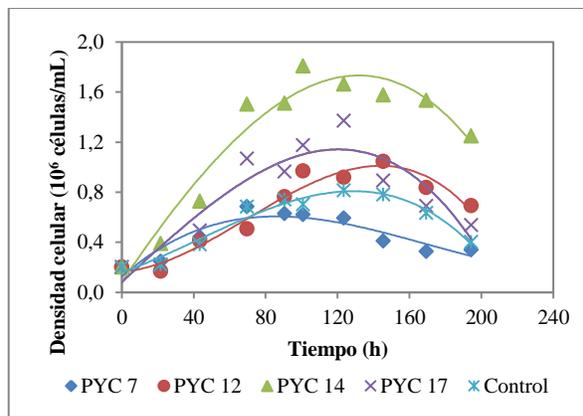


Gráfico 2. Curvas de crecimiento de los clones CHO PYC. La línea azul corresponde al clon 7, la línea roja al clon 12, la línea verde al clon 14, la línea morada al clon 17 y la línea calipso a CHO *wild-type*.

Al comparar las curvas de crecimiento del Gráfico 1 y Gráfico 2, se observa que los clones CHO MDHII mostraron una mayor producción de biomasa que los clones CHO PYC, ya que en el caso de los clones MDHII tres de ellos presentaron densidades celulares mayores a  $1 \times 10^6$  células/mL, a diferencia de los clones PYC donde solo un clon supera este valor.

Se midió la concentración de glucosa y lactato en el tiempo (gráficos en Anexo B.1.) lo que permitió calcular el  $\Delta L/\Delta G$  para cada clon. En la Tabla 9 se muestran los valores obtenidos para los clones MDHII, donde se aprecian valores de  $\Delta L/\Delta G$  menores que el control a excepción del clon MDHII 6 donde no hubo mejora. El clon MDHII 1 es que el presentó una mejor eficiencia metabólica, ya que alcanzó un  $\Delta L/\Delta G$  menor en un 51% que el control. En la Tabla 10 se muestran los valores obtenidos para los clones PYC donde también se observaron valores de  $\Delta L/\Delta G$  más bajos que el control. Dentro de estos clones, el PYC 17 presentó el menor valor, siendo un 47% menor que el control.

Tabla 9. Valores de  $\Delta L/\Delta G$  para los clones CHO MDHII.

Clon	$\Delta L/\Delta G$
MDHII 1	0,73
MDHII 3	0,93
MDHII 6	1,5
MDHII 8	0,88

Tabla 10. Valores de  $\Delta L/\Delta G$  para los clones CHO PYC.

Clon	$\Delta L/\Delta G$
PYC 7	1,26
PYC 12	1,14
PYC 14	1,21
PYC 17	0,79

En el caso de las células CHO MDHII y CHO PYC, se observó que los clones con valores de  $\Delta L/\Delta G$  más altos además presentaron menor densidad celular, lo cual es concordante ya que al haber una menor eficiencia metabólica, habría menor producción de biomasa (Chong et al., 2010). Por otro lado, los clones CHO MDHII presentaron mayor eficiencia metabólica que los clones PYC. Debido a que no existen estudios de la sobreexpresión de estos genes en una misma línea celular, no se ha comparado el efecto que pueden tener en el metabolismo de las células. En la caracterización metabólica de los clones seleccionados (sección 3.3.2) se expone una posible razón de por qué los clones CHO MDHII presentaría una mayor eficiencia metabólica que los clones CHO PYC.

Por último se midió la concentración total de anticuerpo IgG (gráficos en Anexo B.1) de todos los clones. En el Gráfico 3 y Gráfico 4, se muestra la productividad específica de IgG para los clones CHO MDHII y CHO PYC, respectivamente. Los clones CHO MDHII presentaron productividades notablemente mayores que los clones CHO PYC, ya que la productividad más baja de los clones MDHII, que resultó ser aproximadamente 3 ng/10<sup>6</sup> células/h, fue mayor a todas las productividades de los clones CHO PYC, siendo la mayor 2,5 ng/10<sup>6</sup> células/h para el clon CHO PYC 7. Además todos los clones CHO MDHII presentaron mayor productividad que el control. En los clones PYC solo el clon 14 mostró menor productividad que el control.

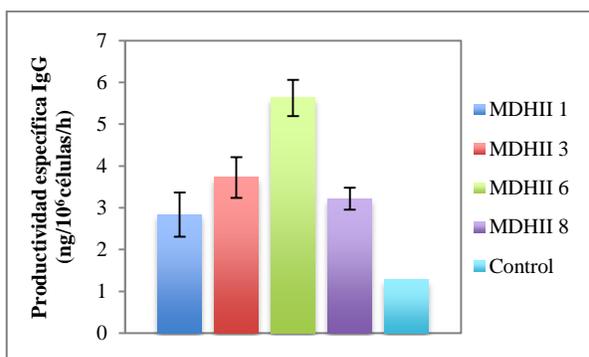


Gráfico 3. Productividad específica de anticuerpo IgG de los clones CHO MDHII. La barra azul corresponde al clon 1, la barra roja al clon 3, la barra verde al clon 6, la barra morada al clon 8 y la barra calipso al control CHO *wild-type*.

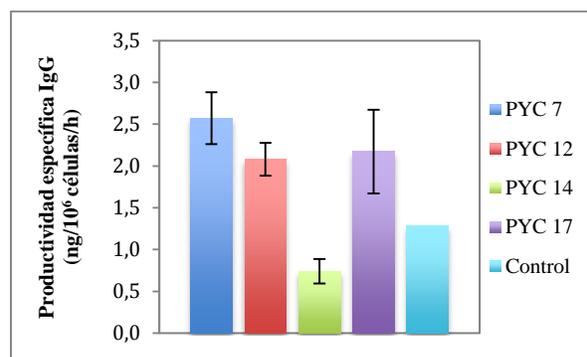


Gráfico 4. Productividad específica de anticuerpo IgG de los clones CHO PYC. La barra azul corresponde al clon 7, la barra roja al clon 12, la barra verde al clon 14, la barra morada al clon 17 y la barra calipso al control CHO *wild-type*.

La selección de los clones se hizo en base a dos criterios; mayor productividad de IgG y mayor eficiencia metabólica, es decir, menor valor de  $\Delta L/\Delta G$ . Para el caso de los clones CHO MDHII, se observó una mayor productividad específica de IgG en el clon 6 (5,6 ng/10<sup>6</sup> células/h), sin embargo éste presentó un valor de  $\Delta L/\Delta G$  alto, similar al control, por lo tanto no presentaría ninguna mejora en este parámetro. Como solo mostró una mayor productividad de IgG y no mayor eficiencia energética fue descartado. El siguiente clon CHO MDHII con mayor productividad fue el clon 3 (3,7 ng/10<sup>6</sup> células/h). Además presentó un valor de  $\Delta L/\Delta G$  bajo igual a 0,93. Ya que este clon exhibió mejoras en ambos parámetros fue el elegido para su posterior caracterización. Para el caso de los clones CHO PYC, se observó una mayor

productividad en el clon 7 (2,5 ng/10<sup>6</sup> células/h), sin embargo presentó el valor de  $\Delta L/\Delta G$  más alto entre los clones. Si bien este fue menor al control, se buscaba el clon que presentara los mejores parámetros en conjunto, y a pesar de que la densidad celular no fue un criterio de selección, este clon obtuvo una muy baja productividad de biomasa en comparación a los otros clones, los que alcanzaron densidades celulares entre un 67% y 183% mayores. Por otro lado, los demás clones presentaron productividades de IgG muy similares (a excepción del clon 14). El siguiente clon CHO PYC con mayor productividad fue el clon 17, el cual presentó un productividad de 2,2 ng/10<sup>6</sup> células/h y un valor de  $\Delta L/\Delta G$  igual a 0,79. Por desgracia, este clon no se pudo recuperar del almacenamiento en nitrógeno líquido. Por lo tanto, se seleccionó el siguiente mejor clon que fue el clon CHO PYC 12, el cual presentó un productividad de 2,1 ng/10<sup>6</sup> células/h y un valor de  $\Delta L/\Delta G$  igual a 1,14.

### 3.3 Caracterización metabólica de los clones seleccionados

El trabajo realizado en esta memoria consistió en caracterizar la metabólica y la expresión transcripcional de los clones previamente seleccionados. A continuación se muestran los resultados obtenidos de los clones CHO MDHII 3 y CHO PYC 12. Ya que estos fueron los clones seleccionados para caracterizar la sobreexpresión de los genes MDHII y PYC2 en células CHO productoras de IgG, se les denotará de aquí en adelante como clones CHO MDHII y CHO PYC.

#### 3.3.1 Densidad celular

En la primera etapa del trabajo se realizaron las curvas de crecimiento para los clones y la muestra control (CHO *wild-type*). En el Gráfico 5 se muestran las curvas de crecimiento y viabilidad para cada muestra. Se observa que ambos clones presentaron menor producción de biomasa que las células CHO *wild-type*. La densidad celular del clon CHO MDHII fue un 7% menor que el control y en el caso del clon CHO PYC un 36%. Por otro lado, la viabilidad entre el clon CHO MDHII y el control es muy similar, alcanzando un 77% a las 156 horas. En cambio, el clon CHO PYC presentó una viabilidad prolongada a partir de las 132 horas, alcanzando un valor final de 94%. Esto se debió a que las células CHO PYC al iniciar la fase de muerte, se despegaron de la placa de cultivo, por ende al contabilizar las células muertas se obtuvo un valor menor al real ya que solo se contaron las células que quedaron adheridas a la placa.

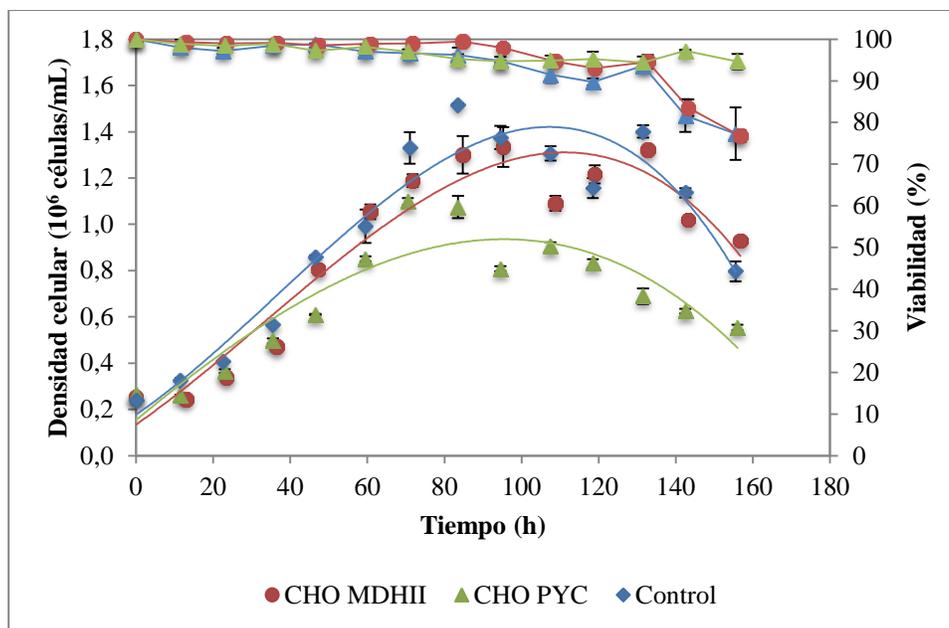


Gráfico 5. Comparación del crecimiento y viabilidad celular. La línea roja corresponde al clon CHO MDHII, la línea verde al clon CHO PYC y la línea azul al control CHO *wild-type*.

En la Tabla 11 se muestra la tasa máxima de crecimiento y la duración de la fase exponencial para cada muestra. Si bien las células CHO *wild-type* alcanzaron la densidad celular máxima ( $1,4 \times 10^6$  células /mL), el clon CHO MDHII presentó una tasa de crecimiento levemente mayor (14%). El clon CHO PYC mostró la menor tasa de crecimiento además de un período más corto de su fase exponencial.

Tabla 11. Tasa máxima de crecimiento y duración de la fase exponencial.

Experimento	$\mu_{\max}$ ( $10^{-2} \text{h}^{-1}$ )	Duración fase Exponencial (h)
CHO <i>wild-type</i>	2,42	48,5
CHO MDHII	2,75	48,3
CHO PYC	2,28	35,6

Al comparar ambos clones, se observó que el clon CHO MDHII presentó una mayor producción de biomasa, superando en un 44% la densidad máxima alcanzada por el clon CHO PYC, acompañado de un valor  $\mu_{\max}$  21% mayor y una fase exponencial más prolongada.

Los resultados indican que los clones presentaron menores densidades celulares que el control. Si bien, en la selección de clones, se observó que estos presentaban mayor producción de biomasa, en este experimento no se pudo comprobar. Esto se debe a que la densidad celular de CHO *wild-type* aumentó en un 75%. Las células CHO se caracterizan por tener un genoma variable, por lo que existe la posibilidad de que se haya producido una mejora en la línea

celular. Esto se debe verificar en el tiempo, para ver si efectivamente es así o solo corresponde a una subpoblación de células con mayor producción de biomasa.

### 3.3.2 Estados metabólicos

En el Gráfico 6 se muestra el consumo de glucosa y en el Gráfico 7 la producción de lactato, medido en cada punto de la curva de crecimiento para cada muestra. El clon CHO PYC mostró un menor consumo de glucosa, alcanzando una concentración cercana a 5 mM hacia el final del cultivo. El clon CHO MDHII y el control presentaron consumos de glucosa muy similares, alcanzando concentraciones finales cercanas a 2 y 1,5 mM, respectivamente. Para el caso del lactato, el clon CHO MDHII presentó la menor producción con un valor máximo cercano a 18 mM. El clon CHO PYC mostró una menor producción de lactato que el control en casi todo el cultivo, sin embargo llegó a un valor máximo de producción similar al control cercano a 23 mM.

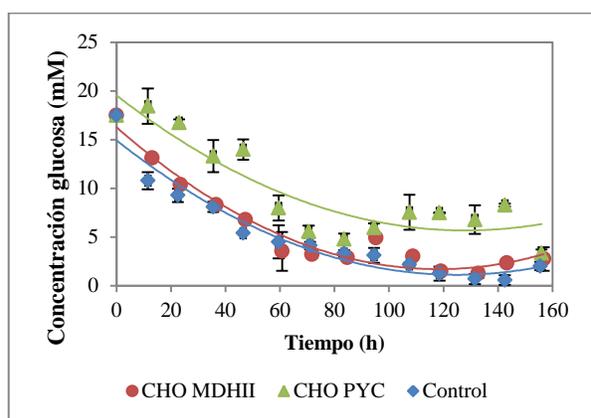


Gráfico 6. Comparación del consumo de glucosa. La línea roja corresponde al clon CHO MDHII, la línea verde al clon CHO PYC y la línea azul al control CHO *wild-type*.

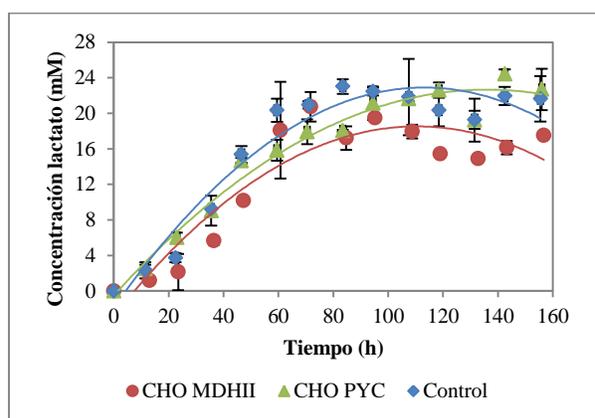


Gráfico 7. Comparación de la producción de lactato. La línea roja corresponde al clon CHO MDHII, la línea verde al clon CHO PYC y la línea azul al control CHO *wild-type*.

De las concentraciones de glucosa y lactato, se obtuvieron las curvas de acumulación de ambos y se procedió a calcular el valor  $\Delta L/\Delta G$  para caracterizar el estado metabólico de los clones. En la Tabla 12 se muestran los valores obtenidos. El clon CHO MDHII exhibió una mayor eficiencia energética con un valor de  $\Delta L/\Delta G$  18% menor que el control y el clon CHO PYC mostró una leve mejora en el metabolismo en comparación al control, con un valor de  $\Delta L/\Delta G$  5% menor.

Tabla 12. Eficiencia metabólica caracterizada por el valor  $\Delta L/\Delta G$ .

Experimento	$\Delta L/\Delta G$
CHO <i>wild-type</i>	1,65
CHO MDHII	1,35
CHO PYC	1,57

Con todos los datos anteriormente presentados, se puede hacer un análisis del estado metabólico de las células. Mediante la sobreexpresión de la enzima MDHII, se busca aumentar el flujo de malato a oxalacetato, ya que mediante un estudio realizado por Chong y colaboradores, se estableció que existe un cuello de botella en esta etapa (Chong et al., 2010). El clon CHO MDHII presentó un menor valor de  $\Delta L/\Delta G$  que el control. Si bien ambos mostraron consumos de glucosa similares, el clon CHO MDHII exhibió una menor producción de lactato. Esto indicaría que hubo un mayor flujo de carbonos desde piruvato a acetil CoA, por lo tanto la producción de lactato fue menor debido a la menor cantidad de piruvato disponible. Esto sería una consecuencia de la sobreexpresión de la enzima MDHII, ya que el efecto directo se produciría en el ciclo del TCA. La velocidad global del ciclo está controlada por la reacción de la enzima citrato sintetasa (Nelson and Cox, 2008). Esta reacción presenta una energía de Gibbs negativa ( $\Delta G^\circ = -7,7$  kcal/mol), por lo que tiende a ocurrir hacia la formación de productos. Esto quiere decir que la velocidad va a depender de la disponibilidad de acetil CoA y oxalacetato. Al sobreexpresar la enzima MDHII, mayor cantidad de malato puede ser oxidado a oxalacetato. El aumento de oxalacetato es favorable para la enzima citrato sintetasa, pero esta no puede actuar si no hay disponibilidad del otro sustrato, acetil CoA. Al haber un mayor requerimiento de acetil CoA es necesario que haya piruvato disponible para su oxidación. Esta reacción es catalizada por el complejo PDH que también se ve favorecida a la formación de producto ( $\Delta G^\circ = -8,0$  kcal/mol) (Nelson and Cox, 2008), por lo tanto si hay un mayor flujo de acetil CoA, el complejo PDH tiene mayor demanda de piruvato, por lo que finalmente la glicólisis debe producir menos lactato para que haya mayor cantidad de piruvato disponible de tal manera de satisfacer la mayor demanda de cada metabolito.

En dos estudios realizados en las líneas celulares hibridoma y BHK, se observó que la mayor parte de la glucosa es metabolizada vía glicólisis (96%) y en muy baja cantidad por la vía PPP (3,3%) y el ciclo del TCA (0,21%) (Fitzpatrick et al., 1993). En el caso de que las células CHO siguieran este mismo patrón de metabolismo de glucosa, se podría deducir que la sobreexpresión de la enzima MDHII, si bien produce cambios directamente en el ciclo del TCA, el mayor cambio se produciría en la glicólisis. Para verificar esto se deberían medir los flujos de metabolitos en la glicólisis y en el ciclo del TCA, por ejemplo mediante una cromatografía de alta resolución (HPLC) y medir el  $C^{14}$  de la glucosa, para determinar su distribución en las vías.

El clon CHO PYC presentó una leve mejora en el valor de  $\Delta L/\Delta G$ , siendo un 5% menor que el control. A pesar de esto, mostró un consumo total de glucosa notablemente menor que el control. Esto es una característica de las células que sobreexpresan el gen PCY2. Se ha visto que en células BHK que sobreexpresan este gen, el consumo de glucosa puede disminuir en hasta un 30% (Irani et al., 1999). Con la sobreexpresión del gen PYC2 se busca convertir el piruvato generado en la glicólisis en oxalacetato. Luego el oxalacetato sería reducido a malato por la enzima cMDH, que por último ingresaría a la mitocondria a través de la vía malato-aspartato, para su incorporación al ciclo del TCA. De los resultados obtenidos se ve que la producción de lactato no disminuyó como se esperaba. En otras líneas celulares animales, la producción de lactato disminuyó hasta en un 58% (Irani et al., 1999). Esto podría deberse a que la sobreexpresión de PYC2 tiene como resultado final la producción de malato, pero esto produciría una mayor acumulación de malato en la mitocondria, el cual no podría ser convertido a oxalacetato en el ciclo del TCA, ya que se ha visto que la enzima mMDH produce un cuello de botella en el ciclo (Chong et al., 2010). Además la reacción catalizada

por esta enzima presenta una energía de Gibbs positiva ( $\Delta G^\circ = 7,1 \text{ kcal/mol}$ ) por lo que se ve favorecida la producción de malato (Nelson and Cox, 2008). Luego habría una mayor acumulación de malato lo cual no favorecería a que la reacción generará oxalacetato. Como la velocidad del ciclo del TCA depende de la disponibilidad de oxalacetato, la actividad en el ciclo se vería reducida. Esto además se puede corroborar con la menor densidad celular que presentó este clon. Al no existir una mayor actividad en el ciclo del TCA, se genera menos energía (ATP) y por ende menos producción de biomasa. Otra consecuencia de la disminución en la actividad del ciclo del TCA es un menor flujo de acetil CoA. El complejo PDH es inhibido por el acetil CoA (Nelson and Cox, 2008), por lo tanto al no haber una mayor demanda de piruvato, este puede ser reducido a lactato.

Para comprobar el comportamiento del clon CHO PYC antes descrito, se podría medir la concentración de ATP, acetil CoA y oxalacetato para determinar si hay una menor actividad en el ciclo del TCA mediante HPLC. También se debería medir la concentración de malato para ver si efectivamente hay acumulación.

Por último, al comparar ambos clones, se ve que el clon CHO MDHII presentó una mayor eficiencia energética, ya que probablemente se vio mejorada la actividad de la glicólisis y la del ciclo del TCA. El mayor nivel energético le permite a las células tener una mayor producción de biomasa (Chong et al., 2010). Esto se comprueba con las mayores densidades celulares obtenidas en el clon MDHII que las obtenidas en el clon CHO PYC. Este comportamiento se observó tanto en este experimento como en las curvas de crecimiento realizadas para la selección de clones. Por otro lado, el menor consumo de glucosa en el clon CHO PYC permitiría realizar cultivos con menores niveles de glucosa, lo que minimizaría la producción de lactato (Irani et al., 2002).

### 3.3.3 Producción de amonio

En el Gráfico 8 se muestra la concentración de amonio medida en todos los puntos de las curvas de crecimiento y para todas las muestras. Las células CHO *wild-type* presentaron mayor producción de amonio que los clones CHO MDHII y CHO PYC. La producción total alcanzada por el control fue de 4,3 mM en el octavo día y supera a la producción del clon CHO MDHII en un 34% y en un 72% al clon CHO PYC.

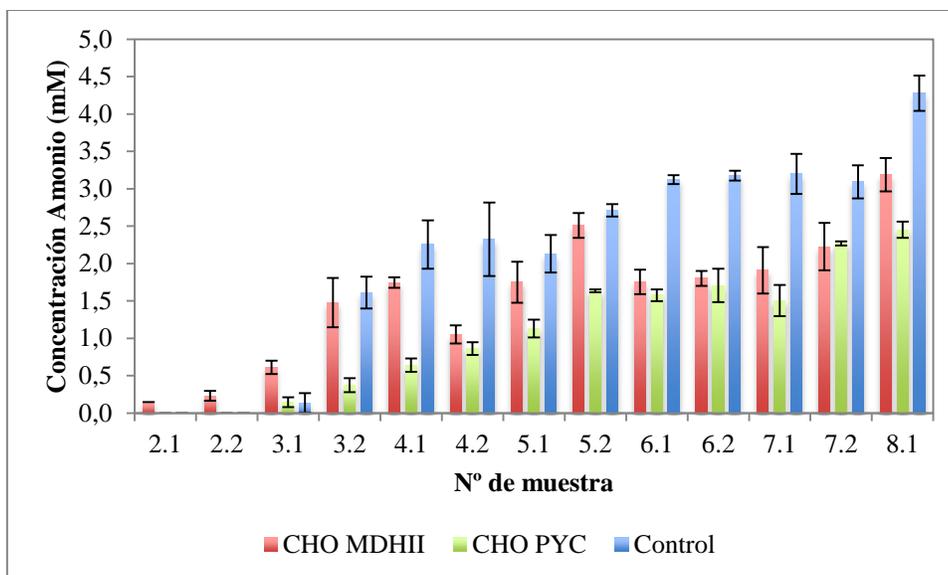


Gráfico 8. Comparación de la concentración de amonio. La barra roja corresponde al clon CHO MDHII, la barra verde al clon CHO PYC y la barra azul al control CHO *wild-type*.

En la Tabla 13 se muestran las productividades específicas para cada muestra calculadas en la fase exponencial de crecimiento. Se observa que el control presentó la mayor productividad, superando a CHO MDHII en un 50% y a CHO PYC en un 75%.

Tabla 13. Productividad específica de amonio en la fase exponencial de crecimiento.

Experimento	$q_{\text{Amonio}}$ (mmol/10 <sup>9</sup> células/h)
CHO <i>wild-type</i>	0,042
CHO MDHII	0,028
CHO PYC	0,024

El amonio se produce por el consumo de glutamina, por lo que a mayor consumo de glutamina aumenta la producción de amonio. Como la glutamina también es una fuente importante en la producción de biomasa al igual que la glucosa (Fitzpatrick et al., 1993), se esperaría que el consumo de glutamina fuera mayor en las células que presentan mayor densidad celular. Como todos los experimentos fueron alimentados con la misma concentración de glutamina, la menor producción de amonio se debió a la menor producción de biomasa y probablemente al menor consumo de glutamina. El clon CHO PYC presentó la menor producción total y específica de amonio debido a que alcanzó la menor densidad celular. Para verificar esto se debería medir la concentración de glutamina en el cultivo y calcular el consumo específico de glutamina y la producción de amonio por glutamina consumida.

### 3.3.4 Producción de anticuerpo IgG

De la curva de crecimiento se tomaron dos muestras de sobrenadante por día a las que se le midió la concentración de IgG. Para la medición se utilizaron dos diluciones, 1:128 y 1:256. La primera dilución fue descartada, ya que las curvas de absorbancia en el tiempo se saturaron. En el Gráfico 9 se muestran las concentraciones obtenidas utilizando la dilución 1:256. En el eje horizontal se indica el día y a que muestra corresponde. Las células CHO *wild-type* y el clon CHO PYC alcanzaron una concentración máxima en el sexto día (108 horas) donde el control se encontraba en la fase estacionaria, mientras que el clon comenzaba la fase de muerte. La producción total de IgG para el control fue de 17,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y para el clon CHO PYC fue de 3,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El clon CHO MDHII alcanzó una concentración máxima al quinto día (85 horas) donde las células comenzaban a entrar en la fase estacionaria. La producción total de IgG fue de 4,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Al comparar las producciones totales de IgG se observa que el control superó a los clones en un 73-78%. Por otro lado el clon CHO MDHII superó en un 27% a la producción del clon CHO PYC.

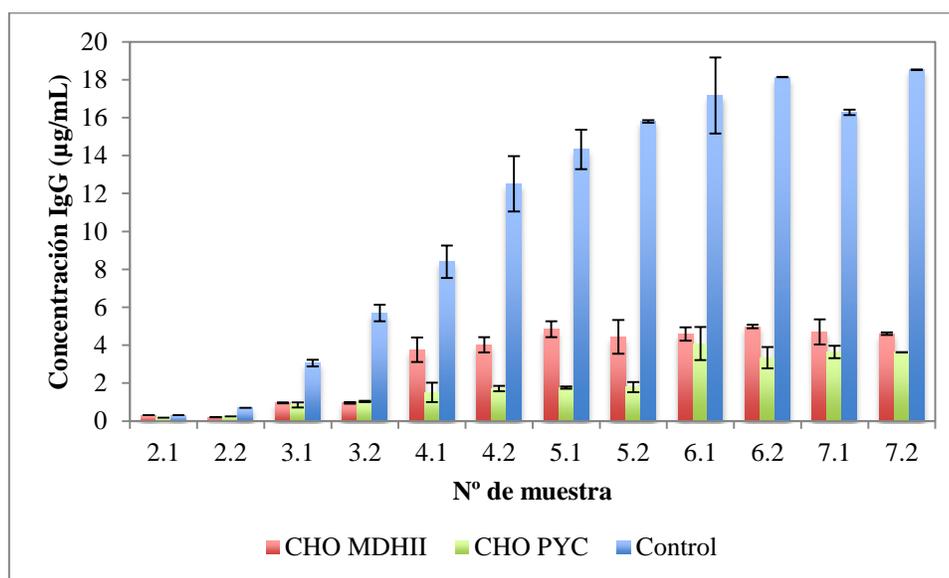


Gráfico 9. Comparación de la producción de anticuerpo IgG. La barra roja corresponde al clon CHO MDHII, la barra verde al clon CHO PYC y la barra azul al control CHO *wild-type*.

En la Tabla 14 se muestran las productividades específicas calculadas en la fase exponencial de crecimiento. Al igual que en la concentración total de IgG, la productividad específica fue mayor en las células CHO *wild-type* superando a los clones en un 209-474%. El clon CHO MDHII superó a CHO PYC en un 86%. La productividad máxima alcanzada por todas las células fue en la fase exponencial de crecimiento, indicando en este caso que la producción de proteína recombinante está asociada al crecimiento de las células.

Tabla 14. Productividad específica de IgG obtenida en la fase exponencial de crecimiento.

Experimento	$q_{IgG}$ ( $\mu\text{g}/10^6$ células/h)
CHO <i>wild-type</i>	0,247
CHO MDHII	0,080
CHO PYC	0,043

Los resultados obtenidos difieren en gran medida de lo que se esperaba, ya que en la selección de clones, las células CHO MDHII y CHO PYC mostraron productividades superiores en un 194 y 200% respectivamente, sobre las células CHO *wild-type*. Existen distintas razones que podrían explicar la disminución de la producción de IgG. La primera tendría que ver con el plegamiento y ensamblaje de la proteína. Estas se realizan en el retículo endoplasmático (RE) y son las etapas más lentas y por ende limitantes, en la producción de proteína. Existen dos proteínas que participan en las funciones antes mencionadas. Una es la proteína disulfuro isomerasa (PDI) que tiene como función formar los puentes disulfuro entre las cadenas liviana y pesada. Los anticuerpos presentan entre 16 y 28 puentes disulfuro, dependiendo del subtipo de inmunoglobulina. La segunda es la proteína de unión de la cadena pesada (BIP), encargada del plegamiento y ensamblaje de las proteínas nuevas. Esta se une preferentemente a sitios hidrofóbicos que solo son expuestos en las proteínas que han sido recientemente sintetizadas y que no han completado su proceso de plegamiento. Cualquier cadena pesada nueva es retenida en el RE por la proteína BIP hasta que es correctamente acoplada a otra cadena pesada y dos cadenas livianas. Las cadenas livianas se unen débilmente a BIP, por lo que pueden ser secretadas en su forma libre. Este proceso resulta bastante complejo y se ha demostrado que las células recombinantes, como las células CHO, no han evolucionado para superar esto y por ende pueden ser limitantes en su capacidad de producción (Borth et al., 2005). Por lo tanto una de las razones por las que podría haber una disminución en la producción de proteína, se debería a que las cadenas livianas y pesadas no fueron correctamente acopladas. En un estudio se midió la cantidad de PDI en células CHO y se observó que el contenido intracelular es significativamente menor comparado con células de hibridomas. Para superar este problema, las células CHO fueron transfectadas con PDI y BIP en conjunto y aisladas. Los resultados obtenidos mostraron que la sobreexpresión sola de BIP y en combinación con PDI, reduce la tasa específica de secreción de proteína, mientras que la sobreexpresión de PDI sola, aumenta la tasa de secreción (Borth et al., 2005). Teniendo en vista estos antecedentes, se podría medir la cantidad de cadena liviana, pesada, PDI y BIP, de tal manera de establecer si en este caso los clones presentan niveles altos de BIP y cadena pesada, lo que indicaría que no hay acoplamiento de las cadenas y por ende no habría una mayor producción de IgG. Debido a que esto solo ocurre en los clones y no en las células CHO *wild-type*, podría ocurrir que la sobreexpresión de los genes MDHII y PYC2 afecte de manera negativa el plegamiento y acoplamiento de la proteína recombinante. También existe la posibilidad de que las células CHO *wild-type*, al igual como mostraron tener una mayor densidad celular, hayan mejorado su productividad de IgG.

La segunda razón se relaciona con la metodología aplicada en el ensayo ELISA. Para medir la concentración de IgG las muestras deben ser incubadas con un anticuerpo primario que reconoce un lugar específico, constituido por los extremos de la cadena ligera y pesada.

Luego se hace una segunda incubación con un anticuerpo secundario que reconoce al primero y que cumple la función de amplificar la señal. Entre cada incubación se deben realizar lavados de la placa de tal forma de eliminar el exceso de reactantes. En el ensayo realizado en la selección de clones, los lavados se realizaron agregando el buffer de lavado con una micropipeta multicanal. El lavado consiste en resuspender reiteradas veces el buffer y luego descartarlo. Esta acción podría soltar el complejo formado, por lo que la señal se vería disminuida. De ser así, los resultados obtenidos en la selección estarían alterados lo que lleva a una selección errónea, ya que los clones que se descartaron por presentar bajas productividades, puede que realmente hayan producido mayores cantidades de IgG que los clones seleccionados.

Al comparar las productividades de IgG en ambos clones, se observa que el clon CHO MDHII presentó mayor productividad que el clon CHO PYC. Esto es concordante con los resultados previamente presentados y discutidos. El clon CHO MDHII presentó una mayor eficiencia energética, probablemente debida a una mayor actividad de la glicólisis y ciclo del TCA, lo cual favorece la producción de biomasa y proteína recombinante (Chong et al., 2010; Zhou et al., 2011).

### 3.3.5 Tasas específicas de consumo y producción

En la Tabla 15 se muestran las tasas específicas de consumo de glucosa, producción de lactato y el rendimiento de biomasa y anticuerpo IgG por glucosa consumida en la fase exponencial de crecimiento. Las células CHO *wild-type* presentaron un mayor rendimiento de biomasa e IgG que ambos clones, lo que se pudo comprobar con la mayor densidad celular (Gráfico 5) y productividad de IgG (Tabla 14). A su vez el clon CHO MDHII superó al clon CHO PYC en un 30% en la producción de biomasa y en un 106% en la producción de IgG. Por otro lado, el clon CHO PYC presentó el mayor consumo de glucosa por célula, superando al control en un 22% y al clon CHO MDHII en un 5%. El clon CHO MDHII mostró la menor producción de lactato por células siendo menor en un 5% que el control y en un 18% que el clon CHO PYC.

Tabla 15. Tasas específicas de consumo de glucosa, producción de lactato y rendimiento de biomasa e IgG por glucosa consumida en la fase exponencial de crecimiento.

Experimento	$q_{Glc}$ (mmol/10 <sup>9</sup> células/h)	$q_{Lac}$ (mmol/10 <sup>9</sup> células/h)	$Y_{Biomasa/Glc}$ (10 <sup>9</sup> células/mmol glc)	$Y_{IgG/Glc}$ (mg/mmol glc)
CHO <i>wild-type</i>	0,208	0,342	0,090	1,357
CHO MDHII	0,240	0,324	0,079	0,399
CHO PYC	0,253	0,394	0,061	0,194

A pesar de que el rendimiento de biomasa e IgG fue mayor en las células CHO *wild-type*, la eficiencia metabólica fue menor. Esto se debe a que la glucosa consumida que no se utilizó en la producción de biomasa e IgG, fue transformada en lactato. Para el caso del clon

CHO MDHII si bien consumió mayor cantidad de glucosa por célula e IgG que el control, obtuvo menor producción de lactato por células, lo que se verifica con el menor valor de  $\Delta L/\Delta G$  obtenido. Esto muestra que si bien este clon consumió más glucosa por célula que el control, esta no fue transformada en lactato ni tampoco en biomasa e IgG, por lo tanto la glucosa debió ser metabolizada para la formación de otros metabolitos, como por ejemplo alanina. Por otro lado, el clon CHO PYC fue el que más glucosa consumió y lactato produjo por célula y presentó los menores rendimientos de biomasa e IgG, sin embargo es el que menor glucosa consumió globalmente (Gráfico 6). Esto se explica por el hecho de que estas células presentaron un menor período de fase exponencial, por lo tanto llegaron antes a la fase estacionaria de crecimiento donde las células disminuyen considerablemente el consumo de glucosa. Por lo tanto el valor de  $\Delta L/\Delta G$  obtenido por CHO PYC fue menor al control debido a que el clon presentó una tasa de consumo de glucosa mayor que el control, luego la diferencia entre la producción de lactato y consumo de glucosa es menor en el clon, lo que permite obtener un valor de  $\Delta L/\Delta G$  más bajo (Wilkins et al., 2011).

### 3.4 Caracterización transcripcional de los clones seleccionados

#### 3.4.1 Integridad y cuantificación del RNA

El segundo objetivo de este trabajo, consiste en un análisis transcripcional de los genes sobreexpresados. Primero se hizo la extracción del RNA de las células CHO *wild-type*, CHO MDHII y CHO PYC, en duplicado. Para verificar la integridad se corrió un gel de agarosa al 1%. En la Figura 9 se muestra una imagen del gel. Para evaluar la integridad del RNA extraído se observaron las bandas correspondientes a los rRNA 28S y 18S.

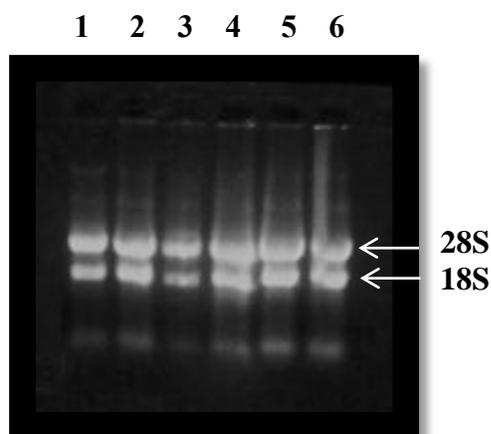


Figura 9. Gel de agarosa al 1% post-extracción de RNA. Carril 1: control 1, carril 2: control 2, carril 3: CHO PYC 1, carril 4: CHO PYC 2; carril 5: CHO MDHII 1, carril 6: CHO MDHII 2. Las bandas que se observan al final del gel, corresponden al *dye*.

En la Tabla 16 se muestra la concentración y pureza del RNA extraído de las muestras. La concentración y pureza se obtuvo como se indica en metodología sección 2.2.5.2. El RNA

total se obtuvo multiplicando la concentración por el volumen de las muestras que fue de 50  $\mu\text{L}$ .

Tabla 16. Concentración y pureza del RNA extraído de las muestras. La letra C corresponde al control CHO *wild-type*, la letra P al clon CHO PYC y la letra M al clon CHO MDHIL.

Muestra	Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Pureza*	RNA total ( $\mu\text{g}$ )
C1	0,512	1,730	25,6
C2	0,920	2,396	46,0
P1	0,704	1,725	35,2
P2	1,272	2,038	63,6
M1	1,256	2,039	62,8
M2	0,616	2,852	30,8
C3	0,928	1,758	46,4

\*Pureza: contaminación de la muestras con sustancias orgánicas e inorgánicas, como por ejemplo: fenol, cloroformo y proteínas. Se determina con la relación  $\text{ABS}_{260}/\text{ABS}_{280}$ .

Para evitar la amplificación de secuencias inespecíficas, las muestras de RNA se sometieron a una digestión con DNasa para eliminar el DNA co-extraído. Se corrió nuevamente un gel para verificar que durante el proceso el RNA no hubiera sido degradado. En la Figura 10 se muestra la imagen del gel de agarosa al 1%. Al igual que en el gel anterior, las muestras siguen el mismo orden. Se observa que el RNA sigue íntegro ya que aparecen las bandas 28S y 18S. La intensidad de todas las bandas es menor, lo que indica una menor concentración. Esto es correcto ya que la digestión de RNA se hizo a partir de una solución con una concentración de 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  a diferencia del primer gel donde las muestras presentaban concentraciones entre 1,3 y 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . La muestra CHO PYC 1 (carril 3) presentó bandas de menor intensidad lo que indica una menor concentración. Si bien se destacan poco en el gel, se puede apreciar la existencia de las bandas 28S y 18S, por lo que el RNA sigue íntegro. Esto se comprobó al medir la concentración de las muestra. En la Tabla 17 se aprecia que efectivamente la muestra CHO PYC es la que menor concentración presentó.

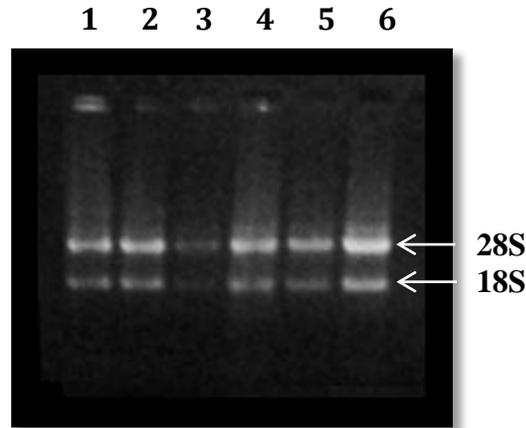


Figura 10. Gel de agarosa al 1% post-digestión de RNA con rDNase I. Carril 1: control 1, carril 2: control 2, carril 3: CHO PYC 1, carril 4: CHO PYC 2; carril 5: CHO MDHII 1, carril 6: CHO MDHII 2.

El RNA total de la post-digestión se obtuvo multiplicando la concentración por el volumen de las muestras que fue de 50  $\mu\text{L}$ . Al comparar la pureza del RNA antes y después de la digestión, se vio que esta disminuyó luego de la digestión.

Tabla 17. Concentración y pureza del RNA digerido. La letra C corresponde al control CHO *wild-type*, la letra P al clon CHO PYC y la letra M al clon CHO MDHII.

Muestra	Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Pureza	RNA total ( $\mu\text{g}$ )
C1	0,258	1,593	12,9
C2	0,222	1,762	11,1
P1	0,084	1,448	4,2
P2	0,204	1,889	10,2
M1	0,140	1,842	7,0
M2	0,272	2,194	13,6

### 3.2.1 Diseño de partidores

Luego se procedió a realizar la síntesis de cDNA como se indica en metodología sección 2.2.5.3. Por último se hizo el diseño de los partidores para cada gen que se deseaba medir. En la Tabla 18 se muestran las secuencias y parámetros de los partidores diseñados.

Tabla 18. Secuencias y parámetros de los partidores utilizados en el qPCR.

Gen	Especie	Secuencia	Largo (b)	Tm (°C)	Largo producto (pb)
Cdc42_F	CHO	CCTCACACAGAAAGGCCTAAA	21	54,8	138
Cdc42_R	CHO	ACAACACCAGCTGTGCAGAA	20	57,4	
PYC_F	Sacc. Cer.	CTGGAAAAGGGACCATCTGA	20	54,3	127
PYC_R	Sacc. Cer.	CCAATCGTGGGTTCTGACT	20	55,0	
PYC_F	CHO	GGCAAGACTCTGCACATCAA	20	55,5	121
PYC_R	CHO	TTGCCTGGGTGTCTTTAACC	20	55,3	
MDHII_F	CHO	TTGACATCGTCAGAGCGAAC	20	55,0	151
MDHII_R	CHO	TGGTCTTGGGGAAAGTCAAC	20	55,0	

### 3.2.1 Expresión transcripcional

En el Gráfico 10 se muestran los resultados obtenidos en el qPCR. Se midieron los genes sobreexpresados MDHII y PYC2 además del gen PYC nativo de CHO. Los valores fueron normalizados por la muestra control CHO *wild-type*. En el Anexo B.5 se encuentra una tabla con los valores de Cp y los cálculos para la normalización de las muestras. En las muestras CHO PYC el gen PYC2 mostró un aumento en la expresión de 1,38 veces. Los genes PYC y MDHII mostraron una disminución de la expresión de 0,89 y 0,95 veces respectivamente. En las muestras CHO MDHII se vio un leve aumento de la expresión de los genes PYC2 y MDHII de 1,15 y 1,10 veces respectivamente y el gen PYC mostró una disminución de la expresión de 0,92 veces.

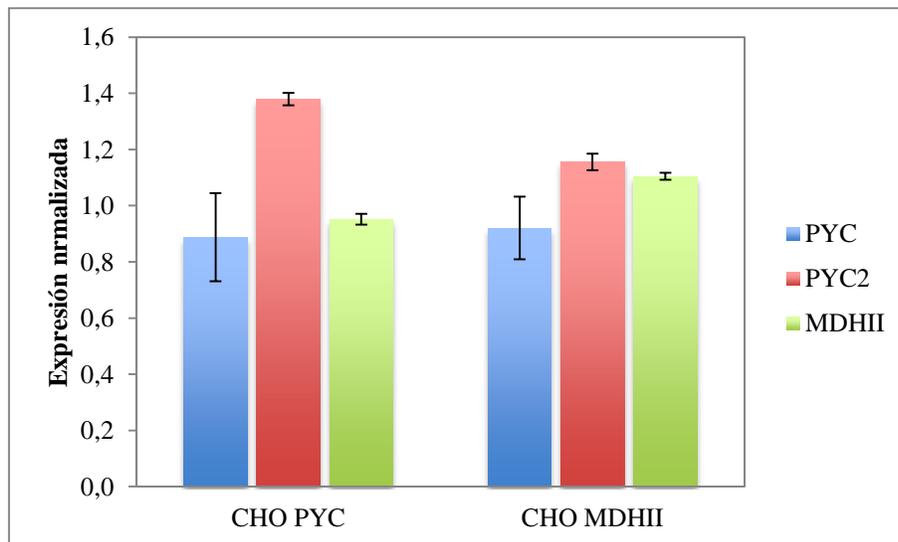


Gráfico 10. Expresión relativa de los genes PYC, PYC2 y MDHII en los clones CHO PYC y CHO MDHII. Las barras azules corresponden a la amplificación del gen PYC\_CHO, las barras rojas al gen PYC2\_ *Saccharomyces cerevisiae* y las barras verdes al gen MDHII\_CHO. Los valores fueron normalizados por la expresión de los genes en las células CHO *wild-type*.

Para confirmar la especificidad de los partidores utilizados, se realizaron curvas de *melting* para cada gen y para cada PCR. En las Figuras 11 a la 14 se muestran las curvas obtenidas en el primer PCR. Las curvas obtenidas en el segundo PCR siguen el mismo comportamiento, por lo que no se muestran. Además los controles de RNA y cDNA no mostraron amplificación, por lo que tampoco se muestran en los siguientes gráficos. En la Figura 11 y Figura 13 se observó un solo peak para todas las muestras, con una temperatura de *melting* aproximada de 84,5°C lo cual indica la presencia de un producto de PCR específico. Por lo tanto se puede asumir que los partidores de los genes *PYC* y *MDHII* amplificaron la misma secuencia en todas las muestras. En la Figura 14 se observan dos peaks, uno pequeño de  $T_m$  igual a 80°C y otra grande de  $T_m$  86°C. Debido a que todas las muestras presentaron ambos peaks, es probable que el peak pequeño se deba a la formación de dímeros de partidores. El tamaño del peak indica la intensidad de la fluorescencia, por lo tanto como los partidores son secuencias pequeñas de 20 p se espera que presenten una menor fluorescencia que los productos de PCR que presentan tamaños alrededor de 150 pb. Luego se puede asumir que los partidores del gen *Cdc42* (gen de referencia) también amplificaron una misma secuencia para todas las muestras. El caso para el gen *PYC2* es distinto, en la Figura 12 se observa un peak grande con una  $T_m$  aproximada de 84,5°C y distintas irregularidades en las muestras que no siguen un mismo patrón. Debido a que no existe un único peak como en el caso anterior, estos pueden no ser necesariamente dímeros de partidores. Por otro lado el peak grande estaría indicando que si hubo un producto de PCR específico y como las irregularidades son pequeñas en comparación con el peak mayor, estos no debieran interferir en gran medida en las mediciones obtenidas.

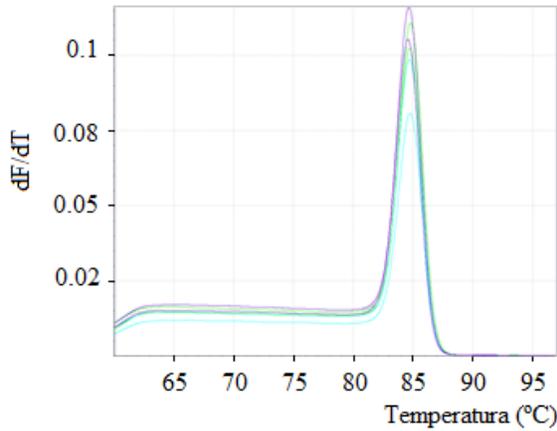


Figura 11. Curva de *melting* para gen PYC.

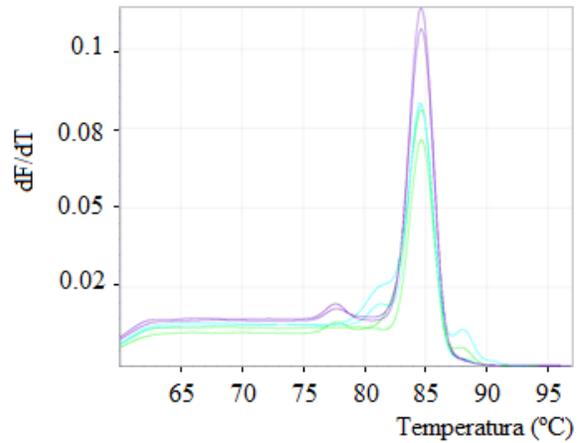


Figura 12. Curva de *melting* para gen PYC2.

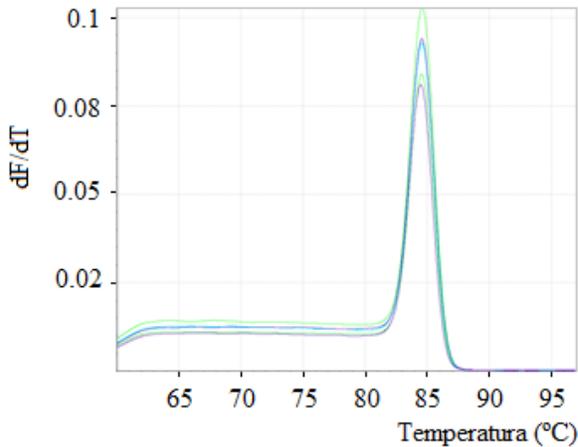


Figura 13. Curva de *melting* para gen MDHII.

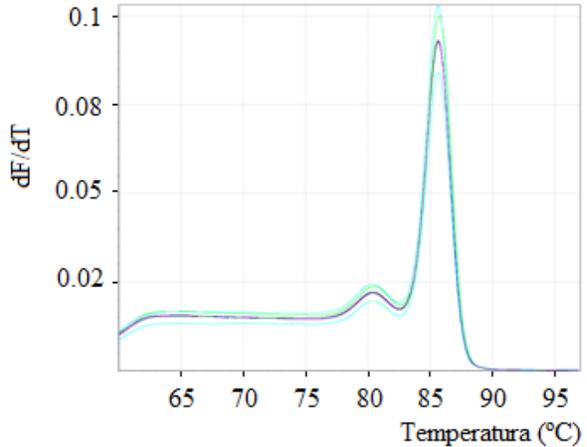


Figura 14. Curva de *melting* para gen Cdc42 (gen de referencia).

### 3.2.2 Análisis estadístico de la expresión transcripcional

Se realizó un análisis estadístico de los datos normalizados mediante el test de Kruskal-Wallis y el test de Dunn-Sidak. En el Anexo B.6 se encuentra el detalle de la aplicación de los test y los resultados obtenidos. Se probó comparando todas las muestras entre sí (Anexo B.6, Figura 15) y comparando solo los clones (Anexo B.6, Figura 16). En ambos casos los test arrojaron que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos, es decir no habría un aumento ni una disminución significativa en la expresión de los genes medidos. También se comparó solo la expresión del gen PYC2 y MDHII en las muestras CHO PYC y en ese caso sí se obtuvo una diferencia significativa (Anexo B.6, Figura 17). Sin embargo, este resultado no debiera verse de manera aislada ya que lo importante es comparar la expresión entre todas las muestras para ver si efectivamente los resultados son significativos.

Este resultado era esperable debido a distintos factores. El primero tiene que ver con el método utilizado en la cuantificación de la expresión transcripcional. Como se explicó en la metodología, sección 2.2.5.5, se debe utilizar un gen de referencia para normalizar los datos de la expresión de los genes. La normalización permite corregir la variación entre las muestras, debido a la diferencia en el número de células, integridad y/o cantidad de RNA o tratamientos experimentales. El gen utilizado para la normalización debe expresarse de manera invariable independientemente de las condiciones experimentales. Por lo mismo es necesario validar la estabilidad de la expresión para los requerimientos específicos de cada experimento. En este caso no se probó si el gen efectivamente no variaba al sobreexpresar los genes *PYC2* y *MDHII*, por lo que existe la posibilidad de que el gen de referencia seleccionado no fuera estable para las condiciones de este experimento. Por otro lado, los datos fueron tratados utilizando el método comparativo de los Cp. Este permite calcular el cambio de la expresión de los genes como las veces de cambio entre la muestra desconocida y una muestra control. Este método incluye una corrección para la eficiencia de amplificación. Idealmente se espera que en cada ciclo el material sea duplicado, pero en la práctica esto no ocurre. Para ello se debe medir, para cada muestra, la eficiencia de amplificación. El programa calcula la eficiencia a partir de una curva estándar que se hace con distintas diluciones de una muestra conocida. El problema es que para cada PCR es necesario correr el gen de referencia y el control para que las muestras puedan ser comparables, pero la cantidad de muestras que se pueden correr por PCR son 32, por lo que no hay espacio para correr además una curva para cada muestra. Esta a su vez, debe hacerse en cada PCR ya que depende mucho del pipeteo. Por lo tanto los resultados obtenidos se hicieron suponiendo un factor de eficiencia igual a 2, lo que puede implicar errores en los cálculos obtenidos. Otro factor muy importante es la concentración de cDNA. Esta debe ser la misma para todas las muestras de tal forma que sean comparables. A su vez esta depende de la cantidad de RNA a partir del cual se sintetizó el cDNA. Como se explica en la sección 2.2.5.3 en metodología, el cDNA se hace a partir de 1 µg de RNA y es igual para todas las muestras. Sin embargo la concentración de RNA se calcula mediante la medición de absorbancia en espectrofotómetro. Este método presenta errores en la medición que no son despreciables, por lo tanto es muy probable que no todas las muestras tengan la misma cantidad de cDNA. Por último el método de PCR es muy sensible a la persona que realiza el experimento, sobre todo por las variaciones en el pipeteo. Incluso la técnica de pipeteo más cuidadosa puede tener un error de 1% (Wong and Medrano, 2005).

Si bien todas las razones descritas anteriormente son posibles causas de que las muestras no mostraran diferencias significativas, estas se ven más relacionadas con la variación en las mediciones, es decir con la varianza que presentan las muestras y que se percibe al comparar los Cp de un gen para una misma muestra. Esto se observa sobre todo en la medición del gen *PYC2*. Este gen solo se sobreexpresa en las células CHO *PYC*, sin embargo se vio que también amplificó para las células CHO *wild-type* y CHO *MDHII*. Esto indicaría que los partidores de *PYC2* se unirían a secuencias conservadas de *PYC*, ya que en la curva de *melting* (Figura 12) se observa que hubo un producto específico para todas las muestras. Por lo tanto es probable que la amplificación del gen *PYC2* sea la amplificación del gen *PYC* en las células CHO *wild-type* y CHO *MDHII*, y en las células CHO *PYC* debe ser la suma de la amplificación de *PYC2* y *PYC*. Para resolver este problema se diseñaron nuevos partidores para *PYC2* utilizando la herramienta Primer-Blast (NCBI). Los resultados obtenidos mostraron una mayor variación en los Cp para una misma muestra y la curva de *melting* mostró diferentes peaks, lo que indicó la amplificación de distintas secuencias y no de

un producto específico. En el Anexo B.7 se muestra los resultados obtenidos. Por lo tanto se puede inferir que este método no permite detectar la amplificación del gen PYC2, primero porque no es posible amplificar este gen aisladamente y segundo porque el método utilizado requiere de una muestra control para normalizar los datos, que en este caso mostró resultados erróneos, ya que el gen PYC2 no debiera amplificar en las células CHO *wild-type*.

En el caso de los genes PYC y MDHII, las razones de por qué no se encontraron diferencias significativas no son las mismas que para PYC2. El método utilizado si permite detectar la amplificación de estos genes, ya que estos se encuentran presentes en todas las muestras y es lo que se observó en los resultados. En las células CHO MDHII se observó un leve aumento de la expresión del gen MDHII, lo que era esperable al sobreexpresar este gen, sin embargo al comparar estadísticamente este resultado con los obtenidos en las otras muestras, este no presentaría una sobreexpresión significativa. En las células eucariontes, la transcripción y la traducción se realizan en compartimentos celulares diferentes. La transcripción se realiza en la membrana del núcleo de la célula y la traducción se realiza en el citoplasma. La separación espacial y temporal de estos procesos permite que la regulación de la expresión génica sea mucho más compleja (NCBI). Esto implica, que los niveles de transcripción no sean siempre directamente proporcionales al nivel de expresión de la proteína (Korke et al., 2002). Por lo tanto, si bien no fue posible demostrar que hubiera una mayor expresión del gen MDHII, esto no quiere decir que no haya una mayor producción de la enzima. Para demostrar esto habría que medir los niveles de la enzima MDHII en las células CHO MDHII ya que como se estableció en la caracterización metabólica, este clon si mostró una mayor eficiencia energética, la cual se debería al aumento de la enzima MDHII.

## CAPÍTULO IV. Conclusiones

---

Debido a la alta demanda de proteínas recombinantes por parte de las industrias biofarmacéuticas se busca optimizar los cultivos celulares para obtener mayores tasas de producción. Mediante la utilización de ingeniería celular se ha logrado modificar el metabolismo de las células para disminuir la producción de metabolitos que inhiben el crecimiento celular y la producción de proteína. Estos apuntan al mejoramiento de líneas celulares animales por su capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales. El objetivo de este trabajo fue hacer una caracterización metabólica y transcripcional de los genes MDHII y PYC2 en la línea celular CHO productora de IgG.

Las curvas de crecimiento permitieron la comparación de la producción de biomasa. Si bien en la selección, los clones CHO PYC y CHO MDHII mostraron mayores densidades celulares que el control, en la caracterización de los clones seleccionados no fue posible demostrar que los clones presentaran una mayor producción de biomasa. Esto se debió a que el control aumentó su producción de biomasa considerablemente sin ninguna causa aparente. Como los clones alcanzaron densidades similares a las obtenidas en la selección, se cree que la línea celular CHO *wild-type* experimentó una mejora.

El estado metabólico fue caracterizado por el valor de  $\Delta L/\Delta G$ . Los resultados permitieron demostrar que los clones CHO MDHII y CHO PYC presentan una disminución del valor de  $\Delta L/\Delta G$  en comparación con el control. En el caso del clon CHO MDHII se obtuvo una mayor eficiencia metabólica debido a la disminución en la producción de lactato. Esto se debería a un mayor flujo de carbonos desde la glicólisis al ciclo del TCA. Por otro lado, el clon CHO PYC mostró una leve mejora en el valor de  $\Delta L/\Delta G$  la que se debió principalmente a que hubo una menor diferencia entre las tasas de producción de lactato y consumo de glucosa, que las obtenidas en el control. Se cree que el clon CHO PYC no mostró una mayor eficiencia metabólica debido a que se generaría una acumulación de malato que no podría ser procesada por la enzima MDHII en el ciclo del TCA ya que estudios indican que existe un cuello de botella en esta enzima.

Los cálculos de productividad específica de IgG demostraron que la producción de proteína recombinante está asociada al crecimiento celular, ya que las tasas máximas de producción se obtuvieron en la fase de crecimiento exponencial. Esto fue consecuente con el hecho de que las células CHO *wild-type* presentaron mayor productividad y rendimiento de biomasa e IgG, y que el clon CHO PYC presentó menor producción y rendimiento de biomasa e IgG. Por otro lado, también se obtuvo mayor concentración de amonio en las células con mayor densidad y producción de proteína, lo cual se debería en teoría a un mayor consumo de glutamina.

El análisis de la expresión transcripcional no permitió detectar diferencias en la amplificación de los genes MDHII y PYC2, principalmente debido a la variación en los resultados obtenidos para cada muestra y a que no fue posible amplificar un producto específico para el gen PYC2. Otra razón se debería a que los niveles de transcripción no son siempre directamente proporcionales al nivel de expresión de la proteína.

Por último se puede concluir que el clon CHO MDHII resultó ser mejor que el clon CHO PYC, ya que presentó una mayor eficiencia metabólica debido a la menor producción de lactato y exhibió mayor producción de biomasa e IgG.

## 3.2 Recomendaciones

Para comprobar los resultados e hipótesis formuladas, se debiera medir la concentración de los metabolitos de la glicólisis y el ciclo del TCA, las enzimas más importantes como MDHII, PYC2, PDH, la concentración de ATP y el consumo de glutamina. También se aconseja medir la actividad de las enzimas antes mencionadas.

Para la medición de IgG se aconseja hacer los lavados dando vuelta la placa para botar el buffer en vez de resuspender con pipeta, para evitar que los complejos anticuerpo-antígeno se despeguen. Además los buffers deben estar frescos, es decir, prepararlos en el mismo momento en que se van a utilizar. Por otro lado, se debiera medir las concentraciones de cadena liviana y pesada del anticuerpo IgG para confirmar si efectivamente hubo un problema de ensamblaje o simplemente no hubo producción de la proteína.

En la medición de amonio, las soluciones deben mantenerse en hielo al igual que la placa donde se colocan las muestras, ya que la reacción ocurre muy rápido y los valores pueden dar fuera de la curva de calibración.

Se deben buscar otros métodos para medir la expresión transcripcional. Por ejemplo la utilización de sondas permitiría una detección más específica de los productos amplificados. Para disminuir la varianza en la amplificación para una misma muestra, se debiera utilizar otro método o instrumento para medir la concentración de RNA. Por un lado existe un colorante fluorescente llamado RiboGreen<sup>®</sup> que al unirse a los ácidos nucleicos emite fluorescencia con una intensidad mayor en varios órdenes de magnitud, que la forma no unida. Por otro lado existen instrumentos específicos como el Agilent Bioanalyzer 2100 que permiten la investigación rápida y sensible de muestras de ácido nucleico.

Por último se debieran generar nuevo clones CHO MDHII y CHO PYC a partir de las células CHO *wild-type* descritas en este trabajo, ya que mostraron tener una mayor producción de biomasa y proteína recombinante que las células control utilizadas en la selección de los clones.

## Referencias

---

1. Altamirano, C., Paredes C., Cairo J. J. and Godia F. 2000. Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnol Prog* 16, pp. 69-75.
2. Birch, J. R. and Racher A. J. 2006. Antibody production. *Adv Drug Deliv Rev* 58, pp. 671-685.
3. Borth, N., Mattanovich D., Kunert R. and Katinger H. 2005. Effect of increased expression of protein disulfide isomerase and heavy chain binding protein on antibody secretion in a recombinant CHO cell line. *Biotechnol Prog* 21, pp. 106-111.
4. Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, pp. 169-193.
5. Butler, M. 2005. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol* 68, pp. 283-291.
6. Chen, K., Liu Q., Xie L., Sharp P. A. and Wang D. I. 2001. Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnol Bioeng* 72, pp. 55-61.
7. Chon, J. H. and Zarbis-Papastoitsis G. 2011. Advances in the production and downstream processing of antibodies. *N Biotechnol* 28, pp. 458-463.
8. Chong, W. P., Goh L. T., Reddy S. G., Yusufi F. N., Lee D. Y., Wong N. S., Heng C. K., Yap M. G. and Ho Y. S. 2009. Metabolomics profiling of extracellular metabolites in recombinant Chinese Hamster Ovary fed-batch culture. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23, pp. 3763-3771.
9. Chong, W. P., Reddy S. G., Yusufi F. N., Lee D. Y., Wong N. S., Heng C. K., Yap M. G. and Ho Y. S. 2010. Metabolomics-driven approach for the improvement of Chinese hamster ovary cell growth: overexpression of malate dehydrogenase II. *J Biotechnol* 147, pp. 116-121.
10. Elvin, J. G., Couston R. G. and van der Walle C. F. 2011. Therapeutic antibodies: Market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int J Pharm.*
11. Europa, A. F., Gambhir A., Fu P. C. and Hu W. S. 2000. Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* 67, pp. 25-34.

12. Fitzpatrick, L., Jenkins H. A. and Butler M. 1993. Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture. *Appl Biochem Biotechnol* 43, pp. 93-116.
13. Gambhir, A., Korke R., Lee J., Fu P. C., Europa A. and Hu W. S. 2003. Analysis of cellular metabolism of hybridoma cells at distinct physiological states. *J Biosci Bioeng* 95, pp. 317-327.
14. Glacken, M. W., Fleischaker R. J. and 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. *Biotechnol Bioeng* 28, pp. 1376-1389.
15. Huang, Y. M., Hu W., Rustandi E., Chang K., Yusuf-Makagiansar H. and Ryll T. 2010. Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnol Prog* 26, pp. 1400-1410.
16. Inoue, Y., Tsukamoto Y., Yamanaka M., Nakamura S., Inoue A., Nishino N. and Kawahara H. 2010. Efficient production of recombinant IgG by metabolic control and co-expression with GLUT5 in a fructose-based medium. *Cytotechnology* 62, pp. 301-306.
17. Irani, N., Beccaria A. J. and Wagner R. 2002. Expression of recombinant cytoplasmic yeast pyruvate carboxylase for the improvement of the production of human erythropoietin by recombinant BHK-21 cells. *J Biotechnol* 93, pp. 269-282.
18. Irani, N., Wirth M., van Den Heuvel J. and Wagner R. 1999. Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnol Bioeng* 66, pp. 238-246.
19. Korke, R., Gatti Mde L., Lau A. L., Lim J. W., Seow T. K., Chung M. C. and Hu W. S. 2004. Large scale gene expression profiling of metabolic shift of mammalian cells in culture. *J Biotechnol* 107, pp. 1-17.
20. Korke, R., Rink A., Seow T. K., Chung M. C., Beattie C. W. and Hu W. S. 2002. Genomic and proteomic perspectives in cell culture engineering. *J Biotechnol* 94, pp. 73-92.
21. Kurano, N., Leist C., Messi F., Kurano S. and Fiechter A. 1990. Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor. 2. Effects of medium components and waste products. *J Biotechnol* 15, pp. 113-128.
22. Matasci, M., Hacker D.L., Baldi L. and Wurm F. M. 2009. Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects. *Drug Discovery Today: Technologies* 5, pp. 37-42.

23. NCBI. Eukaryotic Transcription and Translation Are Separated in Space and Time. [en línea] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22433/>> [Consulta: 27/11/12].
24. NCBI. PCR. [en línea] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>> [Consulta: 13/11/2012].
25. NCBI. Real-Time qRT-PCR. [en línea] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml>> [Consulta: 13/11/2012].
26. Neermann, J. and Wagner R. 1996. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *J Cell Physiol* 166, pp. 152-169.
27. Nelson, D. L. and Cox Michael M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York, Palgrave Macmillan, 2008. 1100 p.
28. Nolan, R. P. and Lee K. 2012. Dynamic model for CHO cell engineering. *J Biotechnol* 158, pp. 24-33.
29. Reichert, J. M., Rosensweig C. J., Faden L. B. and Dewitz M. C. 2005. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol* 23, pp. 1073-1078.
30. RODRÍGUEZ Droguett, Cristian Eduardo. Efecto del uso de mezclas de lignocelulosas sobre la producción de etanol de segunda generación. Memoria (Ingeniería Civil, mención en Biotecnología y Química). Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2012. 79 h.
31. Stephanopoulos, G. and Stafford D. E. 2002. Metabolic engineering: a new frontier of chemical reaction engineering. *Chemical Engineering Science* 57, pp. 2595–2602.
32. van der Velden, V. H., Hochhaus A., Cazzaniga G., Szczepanski T., Gabert J. and van Dongen J. J. 2003. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 17, pp. 1013-1034.
33. Wang, I. K., Hsieh S. Y., Chang K. M., Wang Y. C., Chu A., Shaw S. Y., Ou J. J. and Ho L. 2006. A novel control scheme for inducing angiostatin-human IgG fusion protein production using recombinant CHO cells in a oscillating bioreactor. *J Biotechnol* 121, pp. 418-428.
34. Wilkens, C. A., Alatomirano C. and Gerdtzen Z. P. 2011. Comparative Metabolic Analysis of Lactate for CHO Cells in Glucose and Galactose. *Biotechnol. Bioeng* 16, pp. 714-724.

35. WILKENS Díaz-Muñoz, Camila Alejandra. Ingeniería metabólica de células CHO productoras de IgG: Construcción y análisis comparativo de clones a nivel génico y metabólico. Examen de Calificación. (Doctorado, mención Ciencias de la Ingeniería Química). Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2011. 119 h.
36. Wlaschin, K. F. and Hu W. S. 2007. Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport. *J Biotechnol* 131, pp. 168-176.
37. Wong, M. L. and Medrano J. F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39, pp. 75-85.
38. Yadav, V. G., De Mey M., Lim C. G., Ajikumar P. K. and Stephanopoulos G. 2012. The future of metabolic engineering and synthetic biology: towards a systematic practice. *Metab Eng* 14, pp. 233-241.
39. Yee, J. C., Gerdtzen Z. P. and Hu W. S. 2009. Comparative transcriptome analysis to unveil genes affecting recombinant protein productivity in mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* 102, pp. 246-263.
40. Zheng, N., Xu J., Wu Z., Chen J., Hu X., Song L., Yang G., Ji C., Chen S., Gu S., Ying K. and Yu X. 2005. *Clonorchis sinensis*: molecular cloning and functional expression of novel cytosolic malate dehydrogenase. *Exp Parasitol* 109, pp. 220-227.
41. Zhou, M., Crawford Y., Ng D., Tung J., Pynn A. F., Meier A., Yuk I. H., Vijayasankaran N., Leach K., Joly J., Snedecor B. and Shen A. 2011. Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. *J Biotechnol* 153, pp. 27-34.
42. Zhu, J. 2012. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol Adv* 30, pp. 1158-1170.

# Anexos

## Anexo A. Metodología

### Anexo A.1. Composición del medio de cultivo DMEM/F-12 (Gibco: Cat. No 12800-017/ Cat. No 21700-075)

<b>Componentes</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>	<b>(mM)</b>
<b>Aminoácidos</b>		
Glycine	18,75	0,250
L-Alanine	4,45	0,050
L-Arginine hydrochloride	147,489	0,699
L-Asparagine-H2O	7,5	0,050
L-Aspartic acid	6,65	0,050
L-Cysteine hydrochloride-H2O	35,288	0,201
L-Glutamic Acid	7,35	0,050
L-Glutamine	365	2,500
L-Histidine hydrochloride-H2O	31,5	0,150
L-Isoleucine	54,52875	0,416
L-Leucine	59,081	0,451
L-Lysine hydrochloride	91,2255	0,499
L-Methionine	17,2244	0,116
L-Phenylalanine	35,49975	0,215
L-Proline	17,25	0,150
L-Serine	26,25	0,250
L-Threonine	53,431	0,449
L-Tryptophan	9,0168	0,044
L-Tyrosine disodium salt dihydrate	48,67875	0,216
L-Valine	52,8255	0,452
<b>Vitaminas</b>		
Biotin	0,0036478	0,000
Cholinechloride	9,002	0,064
D-Calcium pantothenate	2,25144	0,005
Folic Acid	2,65041	0,006
i-Inositol	12,6	0,070
Niacinamide	2,018795	0,017
Pyridoxine hydrochloride	2,048773	0,010
Riboflavin	0,2177792	0,001
Thiamine hydrochloride	2,155115	0,006
Vitamin B12	0,697825	0,001
<b>Sales Inorgánicas</b>		
Calcium Chloride (CaCl <sub>2</sub> ) (anhyd.)	116,4945	1,050

Cupric sulfate (CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O)	0,00125	0,000
Ferric Nitrate (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> "9H <sub>2</sub> O)	0,050096	0,000
Ferric sulfate (FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O)	0,417	0,002
Magnesium Chloride (anhydrous)	28,595	0,301
Magnesium Sulfate (MgSO <sub>4</sub> ) (anhyd.)	48,84	0,407
Potassium Chloride (KCl)	311,625	4,155
Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	2438,5	29,030
Sodium Chloride (NaCl)	6999,44	120,680
Sodium Phosphate dibasic (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) anhydrous	71	0,500
Sodium Phosphate monobasic (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O)	62,514	0,453
Zinc sulfate (ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O)	0,432	0,002
<b>Otros Componentes</b>		
Ascorbic Acid	20	0,220
D-Glucose (Dextrose)	3150,9	17,505
Ethanolamine	0.1 ml	1,700
Hypoxanthine Na	2,385	0,015
Linoleic Acid	0,042	0,000
Lipoic Acid	0,10506	0,001
Mercaptoethanol	16.7 ml	11,850
Penicillin G	59,3	0,170
Phenol Red	18,109538	0,048
Pluronic F68 g	200	200,000
Putrescine 2HCl	1,0805	0,007
Sodium Selenite	5	28,902
Streptomycin	100	68,601
Thymidine	0,34969	0,001
Methatrexate	0,090888	0,200

### Anexo A.2. Descongelación de células CHO

Para que la recuperación de las células sea óptima es importante que el proceso descongelación sea rápido. Los crioviales, almacenados a -80°C, se colocan rápidamente en baño termoregulado durante 5 minutos o hasta que el contenido no presente hielo. Con una pipeta de 1 mL, se saca lentamente el contenido del vial y se transfiere a una placa de 100 mm o 75 cm<sup>2</sup> según sea necesario. Luego las placas son incubadas en atmósfera controlada a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95%.

### Anexo A.3. Pasaje de células

Cada cultivo en expansión no se debe dejar de incubar por más de tres días sin cambiar de medio ya que de lo contrario disminuye la viabilidad celular.

1. Se saca todo el medio de cultivo de la placa y se guarda en tubo falcon de 15 mL.

2. Se lava la placa 1-3 veces con 1-4 mL de PBS según el tamaño de la placa.
3. Se agrega 0.5-1 mL de Tripsina de acuerdo al tamaño de la placa y se incuba a 37°C por 5 minutos.
4. Se agrega el volumen necesario de medio de cultivo guardado, para detener la reacción. Se resuspende varias veces para despegar todas las células.
5. Se sacan 0.5 mL de muestra para medir concentración celular.
6. Se transfiere todo el contenido de la placa a un tubo falcon de 15 mL y se centrifuga a 1.000 x g por 5 minutos.
7. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en un volumen de medio tal que la concentración inicial del subcultivo se encuentre entre 0.15 y 0.20\*10<sup>6</sup> células/mL.

#### **Anexo A.4. Toma de muestras en curva de crecimiento**

1. Retirar el medio de la placa y anotar el volumen. Llenar 2 tubos de 1.5 o 2.0 mL de medio y descartar el resto.
2. Lavar la placa con 1 mL de PBS.
3. Agregar 0.5 mL de tripsina e incubar a 37°C por 5 min.
4. Centrifugar los tubos del paso 1 y luego traspasar 1 mL a otro tubo. Marcar el tubo con la fecha, hora y tipo de células, y guardar a -20°C.
5. Agregar 1 mL de medio a la placa con tripsina para detener la reacción.
6. Resuspender, guardar en tubo y medir volumen.
7. Contar células.

#### **Anexo A.5. Determinación de concentración celular y viabilidad**

Para determinar la viabilidad celular se emplea un método de exclusión celular utilizando el colorante azul tripán. Las células vivas son impermeables al colorante y se pueden observar brillantes al microscopio óptico, mientras que las células muertas son permeables al azul de tripán, quedando teñidas de azul.

1. Se prepara una solución de azul tripán al 0.2% en PBS.
2. Se mezclan X µL de azul de tripán al 0.2% con Y µL de la muestra, obteniendo una dilución de Y:(X+Y).
3. Se colocan 20 µL de la mezcla en un hemocitómetro.
4. Se procede con el conteo de células vivas y muertas en los 8 campos del hemocitómetro.

La concentración celular se determina según la siguiente fórmula:

$$X \left[ \frac{\text{células}}{\text{mL}} \right] = N^{\circ} \text{ células} * \frac{\text{dilución}}{N^{\circ} \text{ campos}} * 10.000$$

El porcentaje de viabilidad celular se calcula con la siguiente fórmula:

$$Viabilidad = \frac{N^{\circ} \text{ células}_{vivas}}{N^{\circ} \text{ células}_{vivas} + N^{\circ} \text{ células}_{muertas}} * 100$$

#### Anexo A.6. Determinación de la concentración de glucosa y lactato

Para medir la glucosa consumida y el lactato producido en el sobrenadante, se utiliza el kit RANDOX GLUC-PAP para glucosa y LAC-PAP para lactato. En placas de 96 pocillos se colocan 150  $\mu$ L de buffer y 3  $\mu$ L de muestra. Además se dejan pocillos para medir blanco donde solo se agrega el buffer y otros para la muestra estándar donde se agrega el buffer más 1.5  $\mu$ L del estándar. Las muestras de glucosa fueron diluidas 1:2 y las muestras de lactato 1:8. Para medir glucosa, las muestras se incuban a 37°C por 10 min y luego se lee la absorbancia a 500 nm en espectrofotómetro de placa de 96 pocillos. Para medir lactato las muestras se incuban a 37°C por 5 min y luego se lee la absorbancia a 550 nm. La concentración se calcula como se indica en las siguientes fórmulas.

##### Cuantificación glucosa

$$Conc. \text{ glucosa} \left( \frac{mmol}{l} \right) = \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{standard}} * Conc. \text{ Standard} \left( \frac{mmol}{l} \right)$$

##### Cuantificación lactato

$$\left( \frac{mmol}{l} \right) = \frac{A_{muestra}}{A_{standard}} * \text{Standard conc.} \left( \frac{mmol}{l} \right) * 4$$

#### Anexo A.7. Determinación de la concentración de Amonio

El método utilizado para cuantificar la concentración de amonio se basa en la reacción de Berthelot. El amonio reacciona con clorina libre para formar cloramina, la cual se condensa con dos moléculas de fenol produciéndose indofenol (compuesto de color azul). Dado que el fenol y el hipoclorito están en exceso, la cantidad de indofenol es directamente proporcional a la concentración de amonio presente en la muestra. Para acelerar la reacción entre amonio e hipoclorito, disminuyendo el tiempo de incubación, se agrega nitroferricianuro también llamado nitroprusiato de sodio,  $[Fe(CN)_5NO]$  como catalizador.

El protocolo ha sido adaptado para trabajar en placas de 96 pocillos y cuantificar entre 0 y 6 mM de amonio.

##### A. Preparación de soluciones

- 1) Solución acuosa de hipoclorito de sodio 33,3 mM y NaOH 562,5 mM.
- 2) Solución acuosa de fenol 487,6 mM y nitroprusiato de sodio 1mM.

3) Solución acuosa 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

## B. Procedimiento

1. Se construye una curva de calibración empleando como estándar diluciones de una solución de 10 mM de  $\text{NH}_4^+$ , la que se prepara con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y medio de cultivo. En la Tabla 19 se muestra como se prepara cada punto.

Tabla 19. Preparación de la curva de calibración de amonio.

Nº	Concentración mM	Solución 3 [ $\mu\text{L}$ ]	$\mu\text{L}$ de Medio de cultivo
1	0	0	6
2	0,5	0,3	5,7
3	1,0	0,6	5,4
4	1,5	0,9	5,1
5	2,0	1,2	4,8
6	3,0	1,8	4,2
7	4,0	2,4	3,6
8	6,0	3,6	2,4

2. La placa se ubica en un lugar frío, generalmente una caja de plumavit con fríopacks, para evitar la evaporación de las muestras durante el llenado.
3. En cada pozo se adicionan 6  $\mu\text{L}$  de muestra ó estándar, luego 120  $\mu\text{L}$  solución acuosa de hipoclorito e hidróxido de sodio y finalmente 120  $\mu\text{L}$  de solución acuosa de fenol.
4. Se incuba por 10 minutos a 37 °C y luego se lee la absorbancia a 630 nm.
5. La concentración de amonio de la muestra se determina interpolando el valor de su absorbancia en la curva de calibrado realizada en la misma placa.

El error del método implementado es menor al 7%.

## Anexo A.8. Determinación de la concentración de anticuerpo IgG

Soluciones:

### Solución PBS 10x (1 L)

80 g NaCl  
2 g KCl  
11,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
(pH  $\approx$  7,3)

### Buffer de lavado (4L)

3,6 L  $\text{H}_2\text{O}$  (Milli Q)  
400 ml Solución PBS 10x  
2 mL Tween 20 (0,05 %)

**Coating Buffer (1 L)**

1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
 2,94 g NaHCO<sub>3</sub>  
 0,2 g NaN<sub>3</sub>  
 pH 9,6 ajustar con HCl

**Buffer TSTA (2L)**

13,1 g Trisma HCl.  
 40 g de BSA fraction 5  
 16,52 g NaCl  
 1 ml de Tween 20  
 pH a 7,4  
 Guardar a -20°C

**Estandar:**

Pierce (PI31879) - 10mg ImmunoPure Human Gamma Globulin

**Coating:**

Sigma-Aldrich (I3391)-1ML Anti-Human IgG (Fc specific)

**Anticuerpo secundario:**

Sigma-Aldrich (A2064), Monoclonal Anti-Human IgG–Alkaline Phosphatase

**Protocolo**

1. Diluir 6 µL de Anti-Fc en 6 mL de Coating Buffer.
2. Agregar 50 µL por pocillo e incubar toda la noche a oscuras a 4°C.
3. Lavar la placa una vez con 100 µL de Buffer de Lavado.
4. Agregar 200 µL por pocillo de Buffer TSTA e incubar 1 hr a 37°C.
5. Lavar la placa una vez con 100 µL de Buffer de Lavado.
6. Agregar 50 µL por pocillo de Buffer TSTA.
7. Preparar estándares transfiriendo la cantidad apropiada al siguiente pocillo, como se muestra en la Tabla 20.

Tabla 20. Diluciones de la muestra estándar del ensayo ELISA. La concentración con que comienza la solución de IgG es de 11,3 mg/mL.

Identificados	TSTA (mL)	Muestra estándar (µL)	Concentración	Dilución
A1/A2	1,5	15	113 µg/mL	1:100
B1/B2	1,5	15	1,13 µg/mL	1:100
C1/C2	0,91	500	400 ng/mL	

### Vista de la placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200 ng/mL	200 ng/mL										
B	100 ng/mL	100 ng/mL										
C	50 ng/mL	50 ng/mL										
D	25 ng/mL	25 ng/mL										
E	12,5 ng/mL	12,5 ng/mL										
F	BCO.	BCO.										
G	BCO.	BCO.										
H	BCO.	BCO.										

8. Agregar 50  $\mu$ L de C1/C2 a los pocillos A1 y A2, y diluir apropiadamente transfiriendo 50  $\mu$ L al siguiente pocillo. No agregar a los pocillos BCO.
9. Agregar 50  $\mu$ L de cada muestra a sus pocillos y diluir apropiadamente transfiriendo 50  $\mu$ L al siguiente pocillo.
10. Incubar 1 hr a 37°C
11. Lavar la placa 3 veces, cada vez con 100  $\mu$ L de Buffer de Lavado.
12. Diluir 6  $\mu$ L del anticuerpo secundario en 6 mL de Buffer TSTA
13. Agregar 50  $\mu$ L por pocillo e incubar 1 hr a 37°C.
14. Lavar la placa 3 veces, cada vez con 100  $\mu$ L de Buffer de Lavado.
15. Mezclar 1 paquete dorado con uno plateado en 6 mL de agua Milli Q.
16. Agregar 50  $\mu$ L por pocillo y leer absorbancia a 405 nm durante 15 minutos.

### Anexo A.9. Extracción de RNA

1. Soltar el pellet dando pequeños golpes al tubo. Agregar 600  $\mu$ L de Buffer RLT a cada muestra.
2. Pasar el lisado al menos 5 veces a través de una jeringa de 0,9 mm de diámetro, libre de RNasa.
3. Agregar 600  $\mu$ L de etanol al 70% (preparar con agua libre de RNasa) para homogenizar el lisado y mezclar bien con pipeta.
4. Transferir hasta 700  $\mu$ L de la muestra, incluyendo cualquier precipitado que se haya formado, a una columna colocada en un tubo de 2 mL. Cerrar la tapa con cuidado y centrifugar por 15 segundos a 8.000 g (10.000 rpm) a temperatura ambiente. Descartar el Buffer que quedan en el tubo de 2 mL (no botar el tubo de 2 mL).

Nota: si el volumen de la muestra excede los 700  $\mu$ L, centrifugar alícuotas sucesivas en la misma columna. Descartar el buffer en cada centrifugación.

5. Agregar 700  $\mu$ L de Buffer RW1 a la columna. Cerrar la tapa con cuidado y centrifugar por 15 segundos a 8.000 g (10.000 rpm) a temperatura ambiente, para lavar la membrana de la columna. Descartar el Buffer que quedan en el tubo de 2 mL (no botar el tubo de 2 mL).
6. Agregar 500  $\mu$ L de Buffer RPE a la columna. Cerrar la tapa con cuidado y centrifugar por 15 segundos a 8.000 g (10.000 rpm) a temperatura ambiente, para lavar la membrana de la columna. Descartar el Buffer que quedan en el tubo de 2 mL (no botar el tubo de 2 mL). Repetir este paso nuevamente centrifugando a velocidad completa por 1 min.
7. Colocar la columna en un nuevo tubo de 1.5 mL. Agregar 50  $\mu$ L de agua libre de RNAsa directamente a la membrana de la columna. Cerrar la tapa y centrifugar por 1 min a 8.000 g (10.000 rpm) a temperatura ambiente, para eluir el RNA.

#### **Anexo A.10. Electroforesis en gel de agarosa**

##### Gel 1% Agarosa:

1. Pesar 0,5 g de agarosa. Agregar 50 ml de buffer TAE 1x con DEPC en frasco de tapa azul rotulado Agarosa para RNA.
2. Calentar en microondas hasta diluir la agarosa.
3. Añadir 5ul de bromuro de etidio.
4. Enfriar hasta 45°C y verter en cámara. Colocar peineta con n° de dientes según cantidad de muestras.
5. Cubrir la cámara con buffer TAE 1x con DEPC.
6. Cargar 5  $\mu$ l de *ladder* 1kb en primer pocillo.
7. Cargar 1 $\mu$ l de buffer de carga 6x con 5  $\mu$ l de muestra (depende de la cantidad de RNA).
8. Se corre gel hasta que *dye* avance hasta la mitad a 40 V.

##### TAE con DEPC:

- Para gel: Diluir 1 ml de TAE 50x en 49 ml de H<sub>2</sub>O con DEPC.
- Para cámara: diluir 4 ml de TAE 50x en 196 ml de H<sub>2</sub>O con DEPC (puede ser sin DEPC).

#### **Anexo A.11. Digestión con DNasa**

Primero se calcula el volumen de RNA para obtener 10  $\mu$ g. En la Tabla 21 se muestra la cantidad de RNA para cada reacción y la cantidad de agua necesaria para completar un volumen de reacción de 50  $\mu$ L. Luego se agrega a cada muestra: 5  $\mu$ L de DNase I Buffer y 1

$\mu\text{L}$  de rDNase I. Cada mix se prepara en tubos eppendorf de 0,2 mL estériles. Las muestras se incuban a 37°C por 20 minutos. Luego se agrega 5  $\mu\text{L}$  de DNase Inactivation Reagent a cada muestra y se incuba a temperatura ambiente por 2 minutos, mezclando 2-3 veces durante el tiempo de incubación. Las muestras son centrifugadas a 10.000 x g por 1,5 minutos para que el reactivo de inactivación de la enzima se deposite en el fondo. La fase superior, correspondiente al RNA digerido, se transfiere a tubos Eppendorf de 0,5 mL estériles.

Tabla 21. Volumen de RNA de cada muestra para obtener 10  $\mu\text{g}$  y la cantidad de agua necesaria para completar un volumen de reacción de 50  $\mu\text{L}$ .

Muestra	RNA [ $\mu\text{L}$ ]	Agua [ $\mu\text{L}$ ]
C1	18	26
C2	6	38
P1	3	41
P2	8	36
M1	4	40
M2	16	28

#### Anexo A.12. Síntesis de cDNA

Primero se calcula el volumen de RNA para obtener 1  $\mu\text{g}$ . En la Tabla 22 se muestra la cantidad de RNA para cada reacción y la cantidad de agua necesaria para completar un volumen de reacción de 13  $\mu\text{L}$ . Además a cada muestra se agrega 1  $\mu\text{L}$  de partidor. El mix se prepara en tubos Eppendorf de 0,2 mL.

Tabla 22. Volumen de RNA de cada muestra para obtener 1  $\mu\text{g}$  y la cantidad de agua necesaria para completar un volumen de reacción de 13  $\mu\text{L}$ .

Muestra	Concentración [ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]	RNA [ $\mu\text{L}$ ]	Agua [ $\mu\text{L}$ ]
C1	0,258	3,9	8,1
C2	0,222	4,5	7,5
P1	0,084	11,9	0,1
P2	0,204	4,9	7,1
M1	0,140	7,1	4,9
M2	0,272	3,7	8,3

Se incuban los tubos con el mix a 65°C por 10 min para denaturar las estructuras secundarias del RNA. Al finalizar la incubación, las muestras se conservan en hielo. Se prepara el mix para cada reacción como se muestra en la Tabla 23 y se agregan 7  $\mu\text{L}$  del mix a cada tubo para completar un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ .

Tabla 23. Preparación del mix de síntesis de cDNA.

Componente	1x [ $\mu$ L]
Buffer 5x	4
Protector Inhibidor RNasa	0,5
Mix dNTPs	2
Enzima transcriptasa reversa	0,5
Volumen final	7

Se centrifuga las muestras brevemente para que el mix se deposite en el fondo. Se colocan las muestras en el termociclador y se corre el siguiente programa: 60 minutos a 50°C y 5 minutos a 85°C. Al terminar la reacción se colocan las muestras en hielo y luego se guardan a -20°C.

### Anexo A.13. Secuencias de los genes medidos en el PCR en tiempo real

- **Secuencia nucleótidos gen MDHII\_CHO (EGW01835)**

AACAATGCTAAAGTAGCCGTGCTCGGAGCATCTGGGGGCATTGGGCAGCCCCCTTTCCCTCCTCCTGAAGAACGCC  
 CCCTAGTGAGCCGCCTGACCCCTCTACGATATTGCTCATAACCTGGTGTGGCGGCGGATCTGAGTCACATCGAGA  
 CCAGAGCAAATGTGAAAGGCTACCTCGGACCTGAGCAGCTGCCAGACTGCCTGAAAGGTTGTGATGTGGTGGTGA  
 TCCCAGCTGGAGTGCCAGGAAGCCAGCTGAAGTTTTTAAGAAGCATGGAGTGTACAACCCCAACAAGATCTTCG  
 GTGTGACAACCCCTTGACATCGTCAGAGCGAACACATTTCGTGGCAGAGCTGAAGGGTTTTGGATCCCTCTCGAGTCA  
 ATGTGCCTGTCATTGGTGGCCACGCTGGGAAGACCATCATCCATTGATCTCTCAGTGTACCCCCAAGGTTGACT  
 TTCCCCAAGACCAGCTGACCGCACTCACCAGGAGAATCCAGGAGGCTGGCACGGAAGTCGTGAAGGCCAAGGCTG  
 GAGCAGGTTCTGCCACTCTGTCCATGGCTTACGCTGGAGCCCGTTTTGTCTTCTCCCTTGTGGACGCCATGAATG  
 GGAAGGAAGGTGTCGTTGAGTGTCTTTTGTTCAGTCCAAAGAGACAGAGTGCACCTTACTTCTCCACACCCTTGC  
 TGTTGGGGAAAAAGGCCCTGGAGAAGAACCTGGGCATTGGCAAATCACTCCTTTTGGAGAGAAGATGATTGCCG  
 AGGCCATCCCTGAGCTAAAAGCCTCCATCAAGAAAGGCGAGGACTTTGTCAAGAACATGAAGTGA

- **Secuencia nucleótidos de gen PYC\_CHO (JF935145.1)**

ATGCTGAAGTTCCAAACAGTTTCGAGGGGGCCTGAGGCTCCTGGGTGTCCGCCGTTCCCTCCTCTGCCCCAGTTGCC  
 TCCCCAAATGTCCGGCGCCTGGAGTACAAACCTATTAAGAAAGTCATGGTGGCCAACAGAGGTGAGATTGCCATC  
 CGAGTGTTCGTCGTTGTACGGAGTTGGGCATCCGCACAGTGGCCGTCTACTCAGAGCAGGACACAGGCCAGATG  
 CATCGACAGAAAGCTGATGAAGCCTACCTTATTGGTCGTGGCTTGGCACCTGTGCAGGCCCTACCTGCACATCCCA  
 GACATCATCAAGGTGGCCAAGGAGAATGGTGTAGATGCTGTGCACCCTGGCTATGGGTTCCCTCTCAGAGCGAGCA  
 GACTTTGCTCAGGCCTGCCAGGATGCTGGAGTCCGGTTCATTGGGCCAAGTCCAGAGGTGGTCCGCAAGATGGGA  
 GACAAGGTGGAGGCCCGGGCCATTGCCATCGCTGCAGGTGTCCCAGTGGTCCCTGGCACTGATGCCCCATCAAT  
 TCCCTGCATGAGGCCCATGAGTTCTCCAACACTTATGGCTTCCCCATTATCTTCAAGGCTGCCTACGGAGGTGGG  
 GGCCGTGGCATGAGGGTTGTGCACAGCTATGAGGAGCTGGAGGAGAATTACACCCGAGCCTACTCTGAGGCCTTG  
 GCAGCCTTCGGGAATGGGGCACTATTTGTGGAGAAGTTTATTGAGAAACCACGGCACATCGAGGTGCAGATCCTG  
 GGGGACCAATATGGGAACATCCTGCACCTGTATGAGCGTACTGCTCCATCCAGCGACGGCACAGAAAGGTGGTA  
 GAGATTGCTCCTGCTGCCACCTGGACCCCCAACTTCGTTACGCCTCACCAGTACTCTGTCAAACCTTGCCAAG  
 CAGGTGGGATACGAGAACGCAGGCACTGTGGAGTTCTGGTGGATAAGCATGAAAGCACTACTTCATCGAGGTC  
 AATTCGCCCTGCAGGTGGAGCACACGGTCACTGAGGAGATCACAGATGTAGATCTGGTCCATGCTCAGATCCAT  
 GTGTCTGAGGGCCGGAGCCTGCCTGACCTGGGCCTGAGGCAGGAGAACATCCGCATCAATGGCTGTGCCATTGAG

TGTCGAGTCACCACTGAGGACCCTGCACGTAGCTTCCAGCCTGACACTGGCCGCATTGAGGTTTTCCGGAGTGGT  
GAGGGCATGGGCATCCGCCTGGACAATGCCTCTGCCTTCCAAGGGGCTGTCATCTCACCCCACTATGATTCTCTG  
CTTGTCAAAGTCATCGCCCATGGCAAAGACCACCCACAGCTGCTACCAAGATGAGCAGAGCCCTGGCTGAGTTC  
CGTGTCCGAGGGGTAAAGACCAACATCCCCTTCTGCAGAACGTGCTCAACAACCAGCAGTTCTTAGCAGGCACT  
GTGGATAACCCAGTTCATCGATGAGAATCCTGAGCTGTTCCAGCTGCGGCCCTGCACAGAACCAGGGCCAGAAGCTG  
CTACATTACCTCGGACATGTCATGGTAAATGGCCCTACCACTCCAATCCCTGTCAAGGCCAGTCCCAGCCCTGTG  
GACCCCGTTGTTCTGCAGTACCTATAGGCCACCCACCTGGCCAGGGACTGCTGCTGATGGACACAACCTTC  
CGGGATGCCACCAGTCACTACTGGCCACTCGAGTGCACACACATGATCTCAAAAAGATFGCGCCCTATGTTGCC  
CACAACCTCAACAAGCTCTTCAGCATGGAGAACTGGGGAGGGGCCACATTTGATGTTGCCATGCGCTTCTTATAT  
GAGTGTCCCTGGAGGCGGCTGCAGGAGCTCCGGGAGCTCATCCCCAACATTCCGTTCCAGATGCTGCTTCGGGG  
GCCAATGCCGTGGGCTACACCAATTATCCTGACAATGTGGTCTTCAAGTTCTGTGAGGTGGCCAAGGAGAATGGT  
ATGGACGTCTTCCGAATCTTTGACTCCCTCAACTACTTGCCAAACATGCTGCTGGGCATGGAAGCAGCAGGCAAT  
GCTGGGGCGTGGTGGAAAGCTGCCATCTCGTATACTGGTGTAGCTGACCCCACTGCGACAAAATACTCGCTG  
GAGTACTACATGGGCTTGGCTGAAGAAGTGGTGCAGCTGGCACCCACATCCTATGCATTAAGGACATGGCCGG  
CTACTGAAGCCTGCAGCCTGCACCATGCTGGTGCAGCTCCCTCCGCAACAGATTTCTGACCTACCGCTGCACATC  
CATACCCATGACACATCAGGGGCAGGTGTGGCAGCCATGCTGGCCTGTGCACAAGCTGGGGCTGATGTTGTGGAT  
GTGGCAGTAGACTCCATGTCTGGGATGACTTCACAGCCAGCATGGGTGCCCTGGTGGCTTGTACCAAAGGGACT  
CCTCTGAACACAGAGGTGCCCTGGAGCGTGTGTTTACTACAGTGAATACTGGGAAGGGGCTCGGGGCTGTAT  
GCGGCCCTTTGACTGCACGGCTACCATGAAGTCTGGCAACTCAGATGTGTATGAGAATGAGATCCCAGGGGGCCAG  
TACACCAACCTACACTTCCAGGCCACAGCATGGGGCTTGGCTCCAAGTTCAAGGAGGTCAAGAAGGCCTATGTG  
GAGGCTAACAGATGCTGGGGGACCTCATCAAGGTGACACCATCCTCCAAGATTGTGGGGGACCTGGCCCAGTTC  
ATGGTGCAGAATGGGTTAAGCCGAGCAGAGGCTGAAGCTCAGGCAGAAGAGCTGTCTTCCCTCGCTCTGTGGTG  
GAATTCCTGCAGGGCTACATTGGAATTCCTCATGGAGGCTTCCCTGAGCCCTTCCGCTCTAAGGTGCTAAAGGAC  
CTGCCAAGAGTAGAGGGGAGGCCTGGAGCCTCCCTTCTTCCCTGAACCTGCAGGAGCTGGAGAAGGACCTGATT  
GAGCGGCATGGGGAGGAGGTGACCCAGAGGATGTCTCTCTGCAGCCATGTACCCTGATGTCTTCTCCCAATTC  
AAAGACTTCACAGCCACCTTCGGCCCACTGGACAGCCTCAATACCCGCCTCTTTCTTCAAGGACCCAAAATTCGA  
GAGGAGTTTGGAGTGAAGTGAAGCAGGGGCAAGACTCTGCACATCAAAGCCCTGGCAGTGAGTGACCTGAATCGG  
GCTGGCCAGAGGCAGGTTTTCTTTGAACTCAATGGGCAGCTTCCGGTCCATTCTGGTTAAAGACACCCAGGCAATG  
AAGGAGATGCACTTCCATCCCAAGGCTCTGAAGGATGTGAAGGGCCAGATTGGGGCCCTATGCCTGGGAAGGTC  
ATAGACATCAAGGTGGCGGCAGGAGACAAGGTGGTTAAGGGCCAGCCCTCTGTGTTCTCAGTGCCATGAAGATG  
GAGACTGTGGTGACCTCACCCATGGAGGGCACCATCCGCAAGGTTACAGTGACCAAGGACATGACACTGGAAGGC  
GATGACCTCATCCTAGAGATTGAGTGA

- **Secuencia de nucleótidos gen *PYC2\_Saccharomyces cerevisiae* (U35647.1)**

GATCTTTTTATGTAATAACAGGAAGCAGAAAACAAAATGAGATATCAATACCAGTGTAATCTGTTAATGAGAATCA  
TCACATTATCCCAGTTTTTTCCATGCAAGGGAAAAATATACTATAACGACATTTCTATACTTTAATATCAATTA  
GGTCATCTTTCTGTACGAAAATAACCACGATTGTACTAACGACGTGTCCCTTACCCGACGCAGCTGCTGATAG  
CTACCGCACAGGCACAGCCAGCTCTTCTGTGATTGGCAGAGAGGGGTCCTTCCCTGCGGAAGACGCCGAAAGGCA  
CATATGACTAACCTTTTTTTTTTCGCAATTAATTTTCTAATAGTTTTTCATTTTTTTTTACAATTTTGGCAGTT  
ACGTCTCGAGCTATTTATTATAAGAGTCAGAATTGGCGCAGGGAGTGTAAAGTAAGAAGTACTCCCATCGGATA  
TTTTCTATTGTGTTTCTGTGATTTTTAGTCCTTTTTTCTTTTCTTACTTTTCGGTATCCCTACTTGATTACATA  
CATAACAAGCCCTCTTTTCTTCCAAACTCTGTAGCTTACTATCTGTGGCCCGTCATTTGAGTTTGATTTTTT  
TGCCAACTACTATATTGCAAAAATAAAGGACAGTTACTAGGAGAGAAAATAAGGGACATAGAGAACAAAATAAAAT  
ATGAGCAGTAGCAAGAAATTTGGCCGGTCTTAGGGACAATTTTCAAGTTTGGCTCGGGGAAAAAGAAATAAGATCTTGGTC  
GCCAATAGAGGTGAAATTTCCGATTAGAATTTTTAGATCTGCTCATGAGCTGTCTATGAGAACCATCGCCATATAC  
TCCCATGAGGACCGTCTTTCAATGCACAGGTTGAAGGCGGACGAAGCGTATGTTATCGGGGAGGAGGGCCAGTAT  
ACACCTGTGGGTGCTTACTTGGCAATGGACGAGATCATCGAAATTTGCAAGAAGCATAAGGTGGATTTCATCCAT  
CCAGGTTATGGGTTCTTGTCTGAAAATTTCCGAAATTTGCCGACAAAGTAGTGAAGGCCGGTATCACTTGGATCGGC  
CCTCCAGCTGAAGTTATTGACTCTGTGGGTGACAAAGTCTCTGCCAGACACTTGGCAGCAAGAGCTAACGTTCTT  
ACCGTTCCCGTACTCCAGGACCTATCGAAACTGTGCAAGAGGCACTTGAAGTTTCAATGAATACGGCTACCCG  
GTGATCATTAAAGGCCGCTTTGGTGGTGGTGGTAGAGGTATGAGAGTCGTTAGAGAAGGTGACGACGTGGCAGAT

GCCTTTCAACGTGCTACCTCCGAAGCCCGTACTGCCTTCGGTAATGGTACCTGCTTTGTGGAAAGATTCTTTGGAC  
AAGCCAAAGCATATTGAAGTTCAATTGTTGGCTGATAACCACGGAAACGTGGTTCATCTTTTCGAAAGAGACTGT  
TCTGTGCAAAGAAGACACCAAAAAGTTGTCGAAGTTCGCTCCAGCAAAGACTTTGCCCGTGAAGTTCGTGACGCT  
ATTTTGGACAGATGCTGTTAAATTAGCTAAGGTATGTGGTTACAGAAAACGCAGGTACCGCCGAATTCTTTGGTTGAC  
AACCAAAACAGACACTATTTTCATTGAAATTAATCCAAGAATTCAGTGGAGCATAACCATCACTGAAGAAAATCACC  
GGTATTGACATTGTTTCTGCCCAAATCCAGATTGCCGCAGGTGCCACTTTGACTCAACTAGGTCTATTACAGGAT  
AAAATCACCACCCGTGGGTTTTCCATCCAATGTTCGTATTACCACTGAAGATCCCTCTAAGAATTTCCAACCGGAT  
ACCGGTCGCCTGGAGGTCTATCGTTCTGCCGGTGGTAATGGTGTGAGATTGGACGGTGGTAACGCTTATGCAGGT  
GCTACTATCTCGCCTCACTACGACTCAATGCTGGTCAAATGTTTCATGCTCTGGTTCTACTTATGAAATCGTCCGT  
AGGAAGATGATTTCGTGCCCTGATCGAATTCAGAATCAGAGGTGTTAAGACCAACATTCCTTCTTATGACTCTT  
TTGACCAATCCAGTTTTTATTGAGGGTACATACTGGACGACTTTTATTGACGACACCCCACTGTTCCAAATG  
GTATCGTCACAAAACAGAGCGCAAAAACACTGTTACACTATTTGGCAGACTTTGGCAGTTAACGGTCTTCTATTAAG  
GGTCAAATTTGGCTTGCCAAAACATAAATCAAATCCAAGTGTCCCCCATTTGCACGATGCTCAGGGCAATGTCATC  
AACGTTACAAAGTCTGCACCACCATCCGGATGGAGACAAGTGTACTGGAAGGGGACCATCTGAATTTGCCAAG  
CAAGTCAGACAGTTCAATGGTACTCTACTGATGGACACCACCTGGAGAGACGCTCATCAATCTCTACTTGCAACA  
AGAGTCAGAACCACGATTTGGCTACAATCGCTCCAACAACCGCACATGCCCTTGCAGGTGCTTTTCGCTTTAGAA  
TGTTGGGGTGGTGTACATTCGACGTTGCAATGAGATTCTTGCATGAGGATCCATGGGAACGTTCTGAGAAAATTA  
AGATCTCTGGTGCCTAATATTCCATTCCAAATGTTATTACGTGGTGGCAACGGTGTGGCTTACTCTTCATTACCT  
GACAATGCTATTGACCATTTTGTCAAGCAAGCCAAGGATAATGGTGTGATATATTTAGAGTTTTTGTGCTTTG  
AATGATTTAGAACAATTAAGTTGGTGTGAATGCTGTCAAGAAGGCCGGTGGTGTGTGCGAAGCTACTGTTTGT  
TACTCTGGTGACATGCTTCAGCCAGGTAAGAAATACAACCTTAGACTACTACCTAGAAGTTGTTGAAAAAATAGTT  
CAAATGGGTACACATATCTTTGGGTATTAAGGATATGGCAGGTACTATGAAACCGGCCGCTGCCAAATTAATTAAT  
GGCTCCCTAAGAACCAGATATCCGGATTTACCAATTCATGTTACAGTCATGACTCCGCAGGTACTGCTGTTGCG  
TCTATGACTGCATGTGCCCTAGCAGGTGCTGATGTTGTGCGATGTAGCTATCAATTCATGTCGGGCTTAACTTCC  
CAACCATCAATTAATGCACGTTGGCTTCATTAGAAGGTAACATTGATACTGGGATTAACGTTGAGCATGTTTCGT  
GAATTAGATGCATACTGGGCCGAAATGAGACTGTTGTATTCTTGTTCGAGGCCGACTTGAAGGGACCAGATCCA  
GAAGTTTACCAACATGAAATCCCAGGTGGTCAATGACTAACTTGTATTCCAAGCTCAACAACCTGGGTCCTGGT  
GAACAATGGGCTGAAACTAAAAGAGCTTACAGAGAAGCCAATTACCTACTGGGAGATATTGTTAAAGTTACCCCA  
ACTTCTAAGGTTGTGCGGTGATTTAGCTCAATTCATGGTTTTCTAACAACACTGACTTCCGACGATATTAGACGTTTA  
GCTAATTTCTTTGGACTTTCTGACTCTGTTATGGACTTTTTTTGAAGGTTTAATTGGTCAACCATAACGGTGGGTT  
CCAGAACCATTAAGATCTGATGTATTGAGAAAACAAGAGAAGAAAGTTGACGTGCCGTCCAGGTTTAGAATTAGAA  
CCATTTGATCTCGAAAAAATTAGAGAAGACTTGCAGAACAGATTCCGGTATATTGATGAATGCGATGTTGCTTCT  
TACAATATGTATCCAAGGGTCTATGAAGATTTCCAAAAGATCAGAGAAAACATAACGGTGATTTATCAGTTCTACCA  
ACCAAAAATTTCTTAGCACCAGCAGAACCTGATGAAGAAAATCGAAGTCACCATCGAACAAGGTAAGACTTTGAT  
ATCAAATTTGAAGCTGTTGGTGACTTAAATAAGAAAACCTGGGCAAGAGAAGTGTATTTTGAATTGAACGGTGAA  
TTAAGAAAAGATCAGAGTTGCAGACAAGTCACAAAACATAACAATCTGTTGCTAAACCAAAGGCTGATGTCCACGAT  
ACTCACCAATCGGTGCACCAATGGCTGGTGTATCATAGAAGTTAAAGTACATAAAGGGTCTTTGGTGAAGAAAG  
GGCGAATCGATTGCTGTTTTGAGTGCCATGAAAATGGAAATGGTTGTCTCTTACCAGCAGATGGTCAAGTTAAA  
GACGTTTTTCATTAAGGATGGTGAAGTGTGACGCATCAGATTTGTTGGTTGTCTTAGAAGAAGAAACCTTACCC  
CCATCCCAAAAAAAGTAATTTTTACTCGTTAATTATATTTTATGACATCTGAAAATACTAGCTGTACTATATATG  
CGGTATATTTTATCTAGTTATGTTCCATGTATATTTAAA

- **Secuencia nucleótidos de gen Cdc42\_CHO (XM\_003503632.1)**

TGTCCGGCAGCCGAGGAGGCCCGCGCAGTGTGCCAACGCCCGGGGAGAAAGCTGAGGTCACCATCTAATTTG  
AAATATTAAGTGGATACAAAACATTTCCACAATGCAGACAATTAAGTGTGTTGTTGGTGGTGGTGTGCTGT  
TGGTAAAACATGTCTCCTGATATCCTATACAACAACAAAATTTCCATCGGAATATGTACCAACTGTTTTGCACAA  
CTATGCAGTCACAGTTATGATTGGTGGAGAGCCATATACTCTTGGACTTTTTGATACTGCAGGGCAAGAGGATTA  
TGACAGACTACGACCGCTGAGTTACCCACAAACAGACGTTTTCTAGTATGTTTTTCAGTGGTCTCTCCATCCTC  
ATTTGAAAATGTGAAAGAAAAGTGGGTGCCTGAGATAACTCACCACTGTCCAAAGACTCCTTTCTTGTGTTGG  
GACCCAAATTTGATCTCAGAGATGACCCCTCTACTATTGAGAAAACCTTCCAAGAACAACAGAAAGCCTATCACTCC  
AGAGACTGCTGAGAAGCTGGCCCGGATCTGAAGGCTGTAAAGTATGTGGAGTGTCCGCCCTCACACAGAAAGG  
CCTAAGAATGTGTTTGTGATGAAGCAATATTGGCTGCCCTGGAGCCTCCAGAACCAGAAAGAGCCGAGGTGTGT

GCTGCTATGAACGCCTCTCCAGAGCCCTTTCTGCACAGCTGGTGTGTCATCATACTAAAAGCAATGTTTAAATC  
AAACTAAAGATTAAAAATTTAAATTTGGTTTCTGCAATAATGACAAAACGCCCTGCACCTACCCACATGCACTCACG  
TGAGACAAGGCCCGTTGGTATGGCTCCCTCCTTGCCCTTCCAGTAATAGTTAATTTTGAATAATTGTGTATTGTC  
TGAAAAGTGACGAGTGTTAGTTTTTGTTCCTTGTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAGATCCCACCAATCTTTTGTTTG  
TTTTGTTTTGTTTTAAAAGCAAGGCA

## Anexo B. Resultados y Discusiones

### Anexo B.1. Selección de Clones

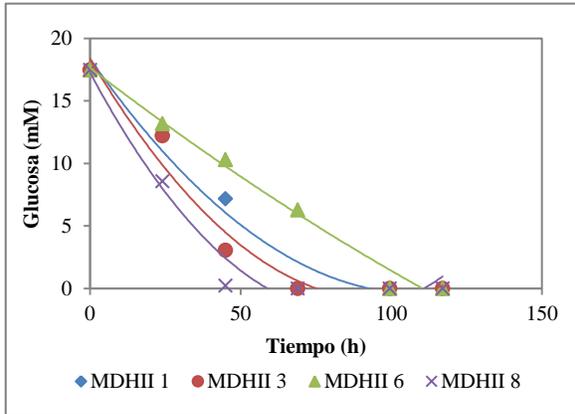


Gráfico 11. Consumo de glucosa de los clones CHO MDHII. La línea azul corresponde al clon 1, la línea roja al clon 3, la línea verde al clon 6 y la línea morada al clon 8.

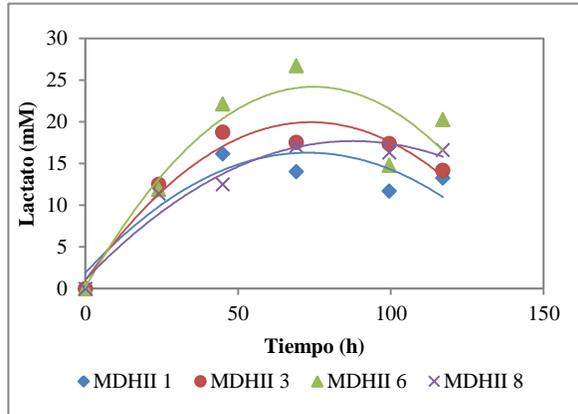


Gráfico 12. Producción de lactato de los clones CHO MDHII. La línea azul corresponde al clon 1, la línea roja al clon 3, la línea verde al clon 6 y la línea morada al clon 8.

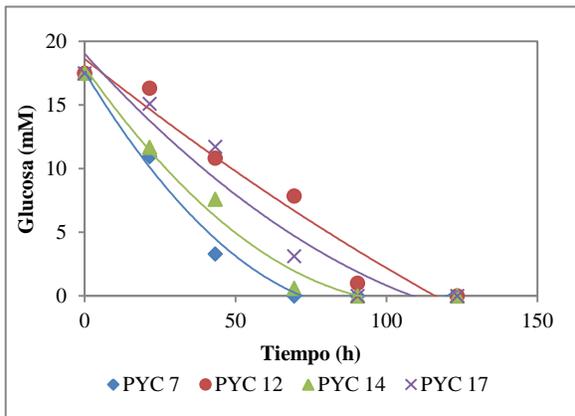


Gráfico 13. Consumo de glucosa de los clones CHO PYC. La línea azul corresponde al clon 7, la línea roja al clon 12, la línea verde al clon 14 y la línea morada al clon 17.

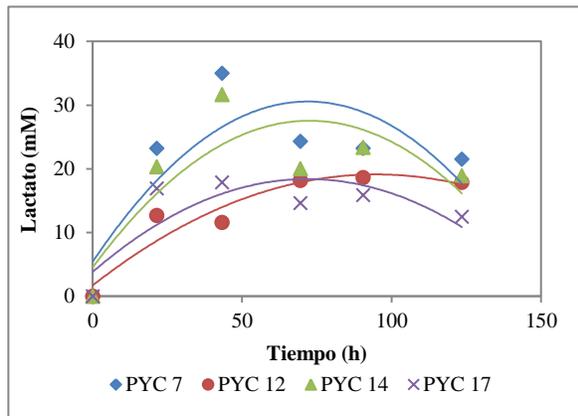


Gráfico 14. Producción de lactato de los clones CHO PYC. La línea azul corresponde al clon 7, la línea roja al clon 12, la línea verde al clon 14 y la línea morada al clon 17.

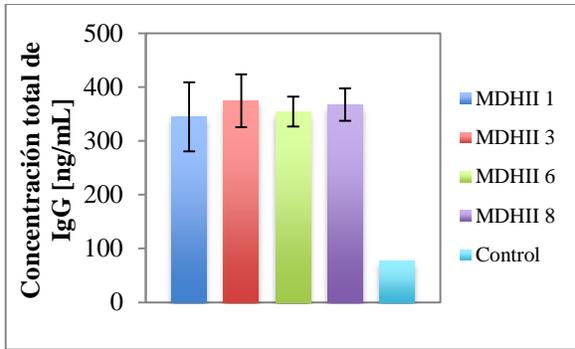


Gráfico 15. Producción total de IgG de los clones CHO MDHII. La barra azul corresponde al clon 1, la barra roja al clon 3, la barra verde al clon 6, la barra morada al clon 8 y la barra calipso al control CHO *wild-type*.

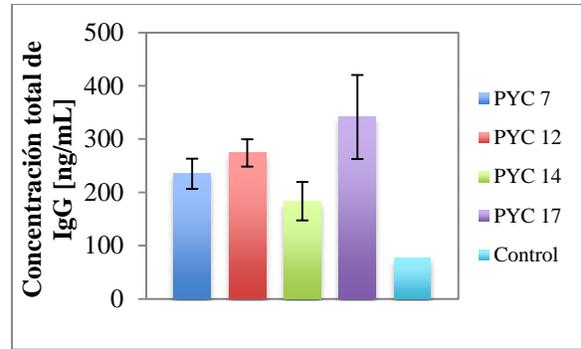


Gráfico 16. Producción total de IgG de los clones CHO PYC. La barra azul corresponde al clon 7, la barra roja al clon 12, la barra verde al clon 14, la barra morada al clon 17 y la barra calipso al control CHO *wild-type*.

## Anexo B.2. Productividad específica de Amonio

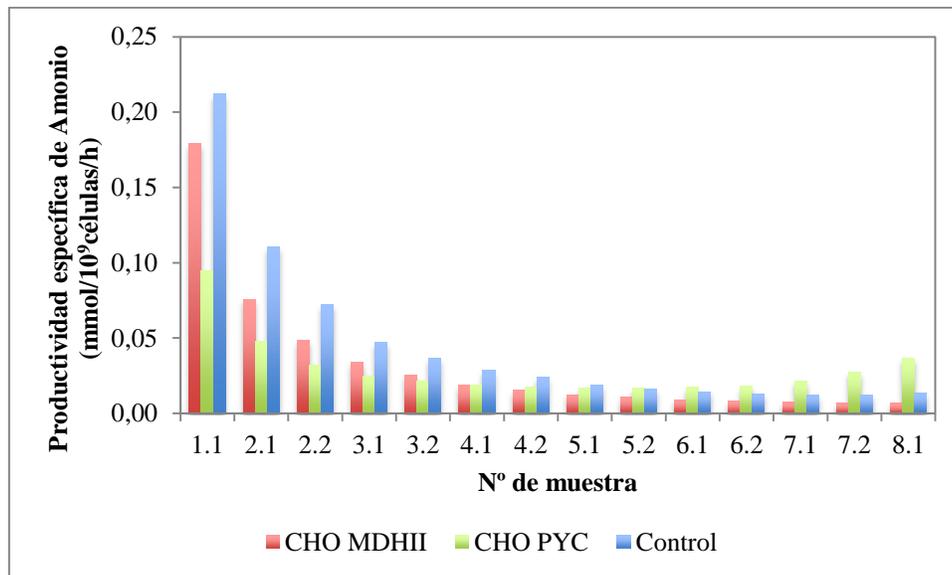


Gráfico 17. Comparación de la productividad específica de amonio. La barra roja corresponde al clon CHO MDHII, la barra verde al clon CHO PYC y la barra azul al control CHO *wild-type*.

### Anexo B.3 Productividad específica de anticuerpo IgG

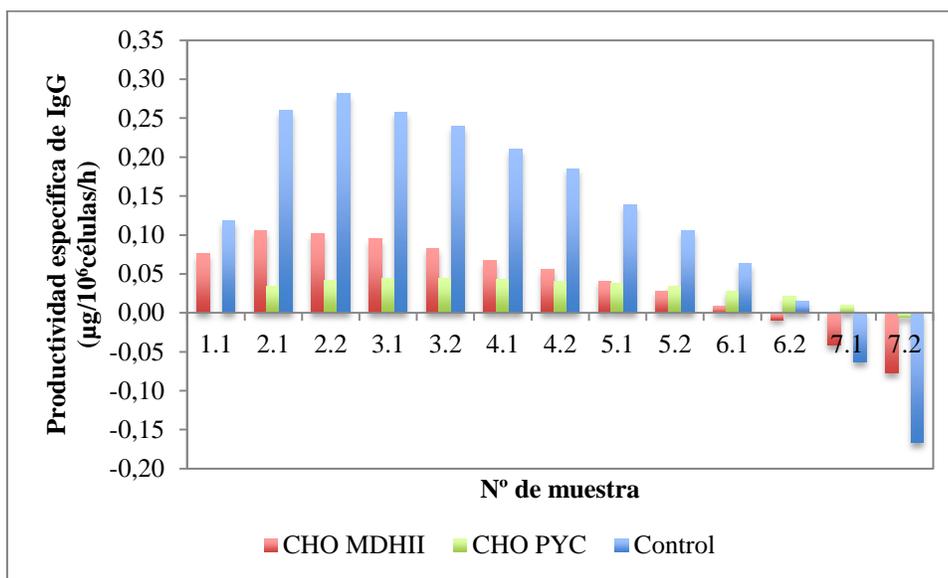


Gráfico 18. Comparación de la productividad específica de IgG. La barra roja corresponde al clon CHO MDHII, la barra verde al clon CHO PYC y la barra azul al control CHO *wild-type*.

### Anexo B.4. Rendimientos de anticuerpo IgG y biomasa

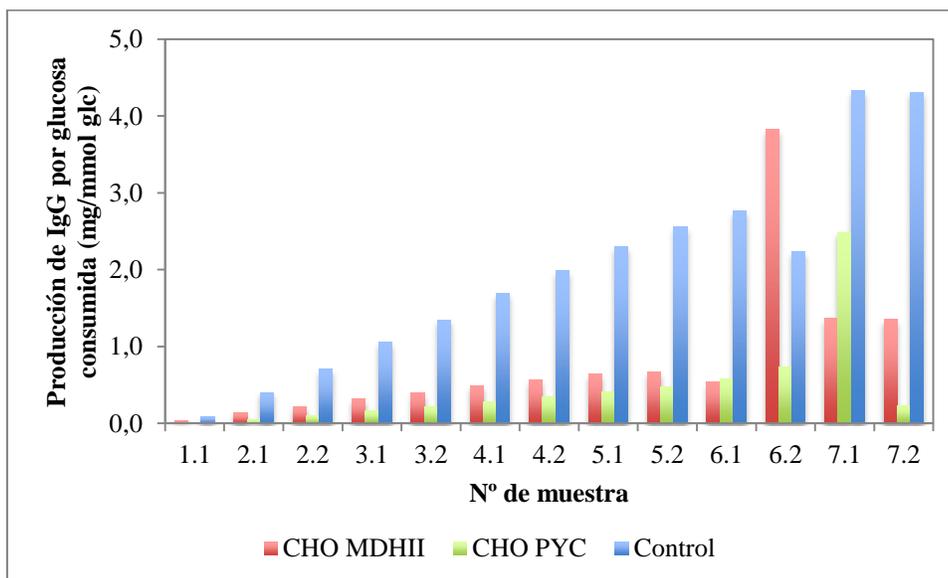


Gráfico 19. Comparación de la producción de IgG por glucosa consumida. La barra roja corresponde al clon CHO MDHII, la barra verde al clon CHO PYC y la barra azul al control CHO *wild-type*.

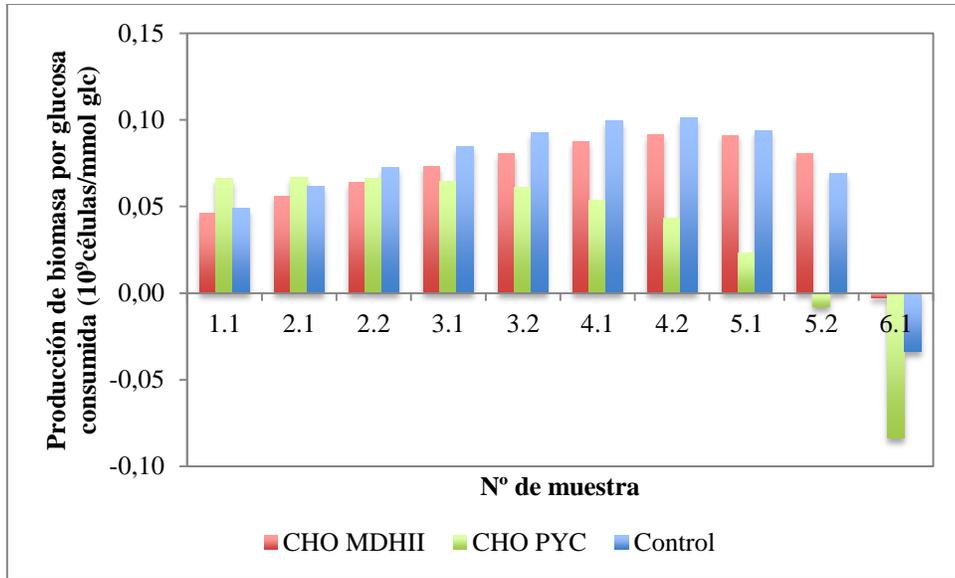


Gráfico 20. Comparación de la producción de biomasa por glucosa consumida. La barra roja corresponde al clon CHO MDHII, la barra verde al clon CHO PYC y la barra azul al control CHO *wild-type*.

## Anexo B.5. Caracterización transcripcional de los clones seleccionados

Tabla 24. Datos y cálculos obtenidos del qPCR 1.

Control 1	Cp				ΔCq			ΔΔCq			Expresión relativa		
	Target 1	Target 2	Target 3	Reference	Target 1	Target 2	Target 3	Target 1	Target 2	Target 3	Target 1	Target 2	Target 3
	27,499	36,531	24,493	22,008	5,4815	14,5135	2,4755	-0,043	-0,792	-0,119	1,030	1,731	1,086
	27,585	38,115	24,731	22,027	5,5675	16,0975	2,7135	0,043	0,792	0,119	0,971	0,578	0,921
Promedio	<b>27,542</b>	<b>37,323</b>	<b>24,612</b>	<b>22,0175</b>	<b>5,5245</b>	<b>15,3055</b>	<b>2,5945</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1,000</b>	<b>1,155</b>	<b>1,003</b>
DE	0,043	0,792	0,119	0,0095	0,043	0,792	0,119	0,043	0,792	0,119	0,0298	0,5770	0,0826
CHO PYC 1	Cp				ΔCq			ΔΔCq			Expresión relativa		
	Target 1	Target 2	Target 3	Reference	Target 1	Target 2	Target 3	Target 1	Target 2	Target 3	Target 1	Target 2	Target 3
	28,105	37,657	25,462	22,779	5,3075	14,8595	2,6645	-0,217	-0,446	0,07	1,162	1,362	0,953
	28,412	37,677	25,524	22,816	5,6145	14,8795	2,7265	0,09	-0,436	0,132	0,940	1,353	0,913
Promedio	<b>28,2585</b>	<b>37,667</b>	<b>25,493</b>	<b>22,7975</b>	<b>5,461</b>	<b>14,8695</b>	<b>2,6955</b>	<b>-0,0635</b>	<b>-0,441</b>	<b>0,101</b>	<b>1,051</b>	<b>1,358</b>	<b>0,933</b>
DE	0,1535	0,01	0,031	0,0185	0,1535	0,01	0,031	0,1535	0,005	0,031	0,111	0,005	0,020
CHO MDHII 1	Cp				ΔCq			ΔΔCq			Expresión relativa		
	Target 1	Target 2	Target 3	Reference	Target 1	Target 2	Target 3	Target 1	Target 2	Target 3	Target 1	Target 2	Target 3
	26,418	36,294	23,402	21,207	5,3935	15,2695	2,3775	-0,131	-0,036	-0,217	1,095	1,025	1,162
	26,59	35,877	23,582	20,842	5,5655	14,8525	2,5575	0,041	-0,453	-0,037	0,972	1,369	1,026
Promedio	<b>26,504</b>	<b>36,0855</b>	<b>23,492</b>	<b>21,0245</b>	<b>5,4795</b>	<b>15,061</b>	<b>2,4675</b>	<b>-0,045</b>	<b>-0,2445</b>	<b>-0,127</b>	<b>1,034</b>	<b>1,197</b>	<b>1,094</b>
DE	0,086	0,2085	0,09	0,1825	0,086	0,2085	0,09	0,086	0,2085	0,09	0,062	0,172	0,068

Tabla 25. Datos y cálculos obtenidos del qPCR 2.

Control 2	Cp				ΔCq			ΔΔCq			Expresión relativa		
	Target 1	Target 2	Target 3	Reference	Target 1	Target 2	Target 3	Target 1	Target 2	Target 3	Target 1	Target 2	Target 3
	27,751	37,258	24,633	22,042	5,7315	15,2385	2,6135	0,185	0,2765	-0,046	0,880	0,826	1,032
	27,381	36,705	24,725	21,997	5,3615	14,6855	2,7055	-0,185	-0,2765	0,046	1,137	1,211	0,969
Promedio	<b>27,566</b>	<b>36,9815</b>	<b>24,679</b>	<b>22,0195</b>	<b>5,5465</b>	<b>14,962</b>	<b>2,6595</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>1,008</b>	<b>1,018</b>	<b>1,001</b>
DE	0,185	0,2765	0,046	0,0225	0,185	0,2765	0,046	0,185	0,2765	0,046	0,129	0,193	0,032
CHO PYC 2	Cp				ΔCq			ΔΔCq			Expresión relativa		
	Target 1	Target 2	Target 3	Reference	Target 1	Target 2	Target 3	Target 1	Target 2	Target 3	Target 1	Target 2	Target 3
	26,757	35,247	23,458	20,689	5,991	14,481	2,692	0,4445	-0,481	0,0325	0,735	1,396	0,978
	26,772	35,222	23,479	20,843	6,006	14,456	2,713	0,4595	-0,506	0,0535	0,727	1,420	0,964
Promedio	<b>26,7645</b>	<b>35,2345</b>	<b>23,4685</b>	<b>20,766</b>	<b>5,9985</b>	<b>14,4685</b>	<b>2,7025</b>	<b>0,452</b>	<b>-0,4935</b>	<b>0,043</b>	<b>0,731</b>	<b>1,408</b>	<b>0,971</b>
DE	0,0075	0,0125	0,0105	0,077	0,0075	0,0125	0,0105	0,0075	0,0125	0,0105	0,004	0,012	0,007
CHO MDHII 2	Cp				ΔCq			ΔΔCq			Expresión relativa		
	Target 1	Target 2	Target 3	Reference	Target 1	Target 2	Target 3	Target 1	Target 2	Target 3	Target 1	Target 2	Target 3
	26,128	35,811	22,751	20,361	5,77	15,453	2,393	0,2235	0,491	-0,2665	0,856	0,712	1,203
	26,294	34,486	22,965	20,355	5,936	14,128	2,607	0,3895	-0,834	-0,0525	0,763	1,783	1,037
Promedio	<b>26,211</b>	<b>35,1485</b>	<b>22,858</b>	<b>20,358</b>	<b>5,853</b>	<b>14,7905</b>	<b>2,5</b>	<b>0,3065</b>	<b>-0,1715</b>	<b>-0,1595</b>	<b>0,810</b>	<b>1,247</b>	<b>1,120</b>
DE	0,083	0,6625	0,107	0,003	0,083	0,6625	0,107	0,083	0,6625	0,107	0,047	0,536	0,083

## Anexo B.6. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el qPCR

Primero se aplicó el test estadístico ANOVA (análisis de varianzas) para determinar si existen diferencias significativas en la expresión de los genes. Pero antes de aplicar el test fue necesario ver si los datos cumplían con los siguientes requisitos (RODRÍGUEZ Droguett, 2012):

- La expresión de los genes son independientes entre sí.
- La distribución de cada expresión sigue una distribución Normal (Test de Shapiro-Wilk).
- La varianza de cada una de las distribuciones es la misma (homocedasticidad, Test de Levene).

Los resultados preliminares arrojaron que los datos cumplían con los dos primeros requisitos, pero no cumplieron el requisito de homocedasticidad. Por lo tanto se aplicó el test no paramétrico Kruskal-Wallis (análogo a ANOVA) y el test de Dunn-Sidak. Ambos test se aplicaron usando el software MATLAB® (Versión 7.8.0.247 (R2009), 32 bits). Los resultados se muestran en las siguientes figuras.

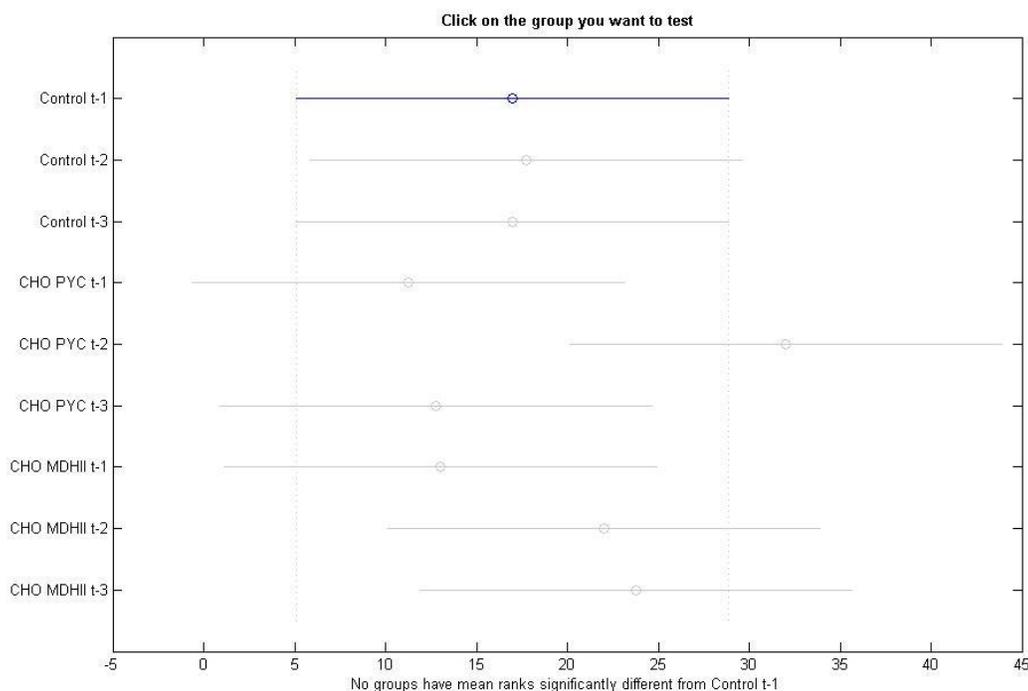


Figura 15. Resultado del análisis estadístico I. En la figura se compara la expresión de los tres genes: PYC (t-1), PYC2 (t-2) y MDHII (t-3) en las tres muestras: CHO *wild-type* (Control), CHO PYC y CHO MDHII. No se observan diferencias significativas en ningún grupo.

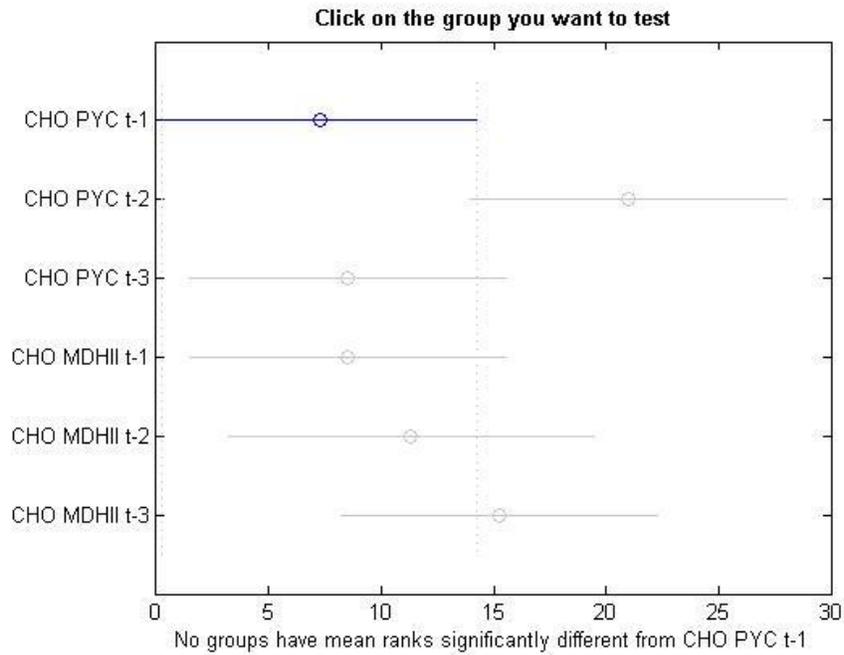


Figura 16. Resultado del análisis estadístico II. En la figura se compara la expresión de los tres genes: PYC (t-1), PYC2 (t-2) y MDHII (t-3) en los dos clones: CHO PYC y CHO MDHII. No se observan diferencias significativas en ningún grupo.

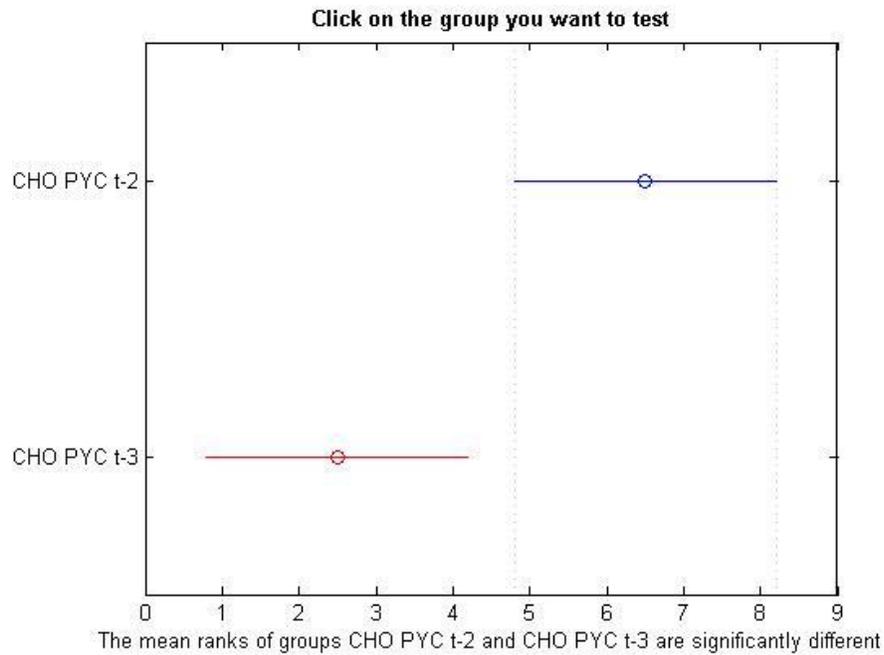


Figura 17. Resultado del análisis estadístico III. En la figura se compara la expresión de dos genes: PYC2 (t-2) y MDHII (t-3) en el clon CHO PYC. Se observan diferencias significativas en la expresión del gen PYC2 y MDHII en el clon CHO PYC.

### Anexo B.7. qPCR con partidores específicos para la amplificación de PYC2.

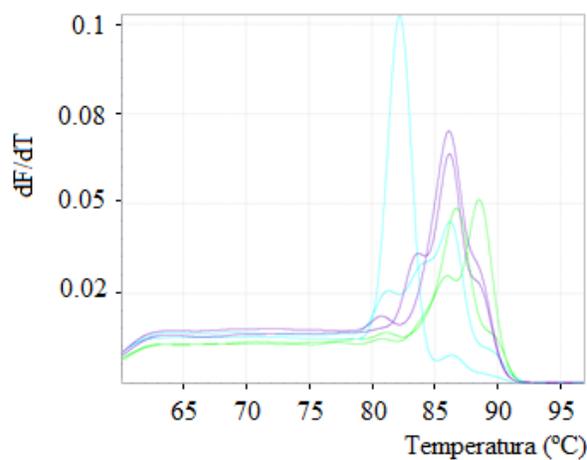


Figura 18. Curvas de *melting* para el nuevo partidor del gen PYC2 en el qPCR 1.

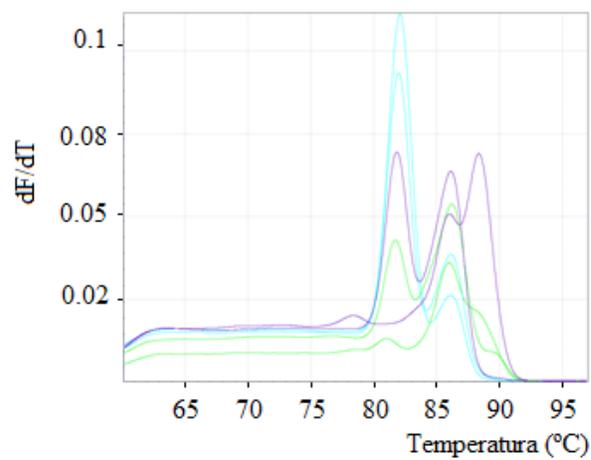


Figura 19. Curvas de *melting* para el nuevo partidor del gen PYC2 en qPCR 2.