



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



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

Mauricio Barrón-Castillo, Angélica Meneses-Acosta, Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich, Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos, 62250, [tonatiuh@ibt.unam.mx](mailto:tonatiuh@ibt.unam.mx).

*Palabras clave: Autofagia, Metabolismo, Temperatura subfisiológica*

**Introducción.** El cultivo de células CHO, entre 30 y 35°C ha mostrado mejorar la productividad de proteína recombinante (1). Eventos como estabilidad del mRNA, retraso de la muerte, arresto del ciclo celular y proteólisis, son algunas hipótesis que intentan explicar el fenómeno del aumento de la productividad (2,3,4). Sin embargo, éste no se ha descifrado completamente.

El objetivo de este trabajo fue intentar determinar el papel que juega la muerte celular en la productividad de proteína recombinante en cultivos de células CHO sometidos a temperatura subfisiológica.

**Metodología.** Cultivos celulares: Se cultivó la línea celular TF70R (tPA) en medio CDM4CHO (Hyclone) en frascos agitados en un volumen de 125 mL, en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% con una agitación de 60 rpm. Se realizaron 5 cultivos bifásicos de temperatura haciendo el cambio de temperatura de 37 a 30°C a las 24, 48, 72, 96 y 120h post inóculo. Se realizaron ensayos de inhibición de autofagia en frascos T de 75 cm<sup>2</sup> agregando LY294002 a concentración de 5µM. La Concentración celular fue medida en un Coulter multisizer II y la viabilidad por el método de exclusión de azul de tripano en un hematocitometro. La glucosa, lactato, glutamato y glutamina fueron medidos en un analizador bioquímico YSI. La proteína recombinante se midió por medio de ensayo de ELISA. El ciclo celular y la población sub-G1 fue medida por medio de citometría de flujo con el método de tinción de yoduro de propidio. Se realizaron microscopías de transmisión electrónica por fijación con solución de Karnousky, embebidas en resina epóxica y teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo.

**Resultados.** Mediante un barrido de tiempos de cambio de temperatura se determinó que el cultivo bifásico con mayor productividad volumétrica fue aquel con cambio a las 48h (0.053mg/L-h). Establecido lo anterior se caracterizaron y compararon 4 condiciones de cultivo (37°C, 30°C, 30°C y bifásico 48h) de los cuales el cultivo a 30°C mostró ser el menos eficiente metabólicamente ( $Y_{Lac/Glc}$ ), mientras que el cultivo bifásico a 48h mostró ventajas. En todas las condiciones de cultivo el agotamiento de glutamina coincidió con el inicio de la muerte celular masiva a excepción del cultivo a 30°C en el cual la glutamina no se agotó completamente.

Las cuatro condiciones de cultivo mostraron morfologías de muerte celular autofágica (aparición de autofagosomas y procesamiento de LC3) y apoptótica (degradación específica de DNA y aumento de población sub-G1), aunque en los cultivos expuestos a baja temperatura se presentó la morfología autofágica en los primeros tiempo de exposición. Debido a que en la literatura existen trabajos de inhibición química de procesos apoptóticos, en este trabajo se realizaron ensayos de inhibición química con LY294002, que es un inhibidor de la formación de autofagosomas. Los resultados mostraron que al inhibir a 37°C con LY294002 y comparándolo con un cultivo control, la viabilidad se mantiene hasta por cinco días más, mientras que al inhibir la autofagia a 30°C aumenta ligeramente la concentración celular.

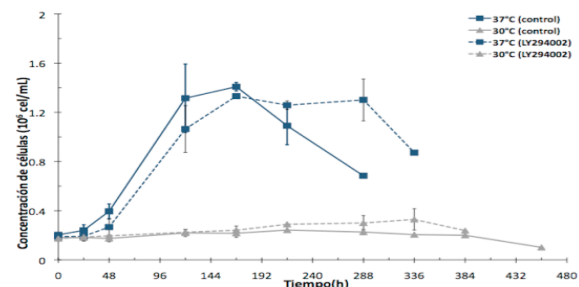


Fig. 2. Cinéticas de concentración celular de cultivos con inhibición de autofagia.

**Conclusiones.** La baja temperatura tiene efectos positivos en la productividad de la línea TF70R. Los cultivos a baja temperatura presentaron una alta actividad autofágica. La glutamina fue factor desencadenante de la muerte celular masiva a excepción de los cultivos a 30°C. La inhibición química de procesos autofágicos prolongó la vida del cultivo por 120h.

**Agradecimiento.** Se agradece el financiamiento para becas de maestría de CONACyT

### Bibliografía.

1. Al-Fageeh M, Marchant R, Carden M, Smales M, (2006) *biotechnol bioeng.* 93(5): 829-835.
2. Al-Fageeh M, Smales M, (2006) *Biochem. j.* 397: 247-259.
3. Shi M, Xie Z, Yu M, Shen B, Guo N (2005) *Biotechnol. Lett.* 27: 1879-1884.
4. Moore A, Mercer J, Dutina G, Donahue C, Bauer K, Mather J, Etcheverry T, Ryll T (1997) *Cytotechnol.* 23: 47-54