



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



**“DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DEL  
SISTEMA ESTABLE CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$  PARA LA  
PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$  HUMANO  
RECOMBINANTE”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN FARMACIA**

**PRESENTA:**

**L. F. MIRNA RODRIGUEZ AGUILAR**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. ANGÉLICA MENESES ACOSTA**

**ASESOR TÉCNICO**

**MF. CARLOS ALBERTO TAVIRA MONTALVÁN**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**FECHA: MAYO 2020**

Cuernavaca, Morelos a 11 de diciembre de 2019  
Folio: FF/D/SAC/ CIP /MF/087/2019

**LF. MIRNA RODRÍGUEZ AGUILAR**  
**ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA**  
**P R E S E N T E**

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asigno el siguiente jurado para evaluar la tesis "DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA ESTABLE CHO-SpcDNA3/IFN- $\gamma$  PARA LA PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$  HUMANO RECOMBINANTE"

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

**PRESIDENTE: Dr. Jorge Alberto Reyes Esparza**

**SECRETARIO: Dr. Erick Ayala Calvillo**

**V.1. cDr. Mauricio Barrón Castillo**

**V.2. MF. Lorena Uribe Toledo**

**V.3. Dra. Irene Vergara Bahena**

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente  
**Por una humanidad culta**  
*Una universidad de excelencia*



**Dr. Julio César Rivera Leyva.**  
**Jefatura de Posgrado**



ccp: archivo, jurado  
mitv

VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Mirna Rodríguez Aguilar

Título de la tesis: "DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA ESTABLE CHO-S  
pcDNA3/IFN- $\gamma$  PARA LA PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$  HUMANO RECOMBINANTE"

Grado a obtener:

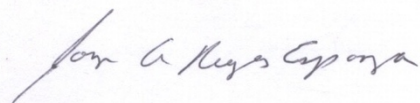
Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Jorge Alberto Reyes Esparza

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi  
decisión es:

La tesis:  
 Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



Firma del miembro del jurado

18/Mayo/2020

Fecha

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Mirna Rodríguez Aguilar

Título de la tesis: “DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA ESTABLE CHO-S  
pcDNA3/IFN- $\gamma$  PARA LA PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$  HUMANO RECOMBINANTE”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Erick Ayala Calvillo

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi  
decisión es:

La tesis:  
 Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

*Ayala Calvillo Erick*

\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

20/Mayo/2020

\_\_\_\_\_  
Fecha

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Mirna Rodríguez Aguilar

Título de la tesis: “DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA ESTABLE CHO-S  
pcDNA3/IFN- $\gamma$  PARA LA PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$  HUMANO RECOMBINANTE”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: cDr. Mauricio Barron Castillo

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi  
decisión es:

La tesis:  
 Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

15 Mayo 2020  
\_\_\_\_\_  
Fecha

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Mirna Rodríguez Aguilar

Título de la tesis: “DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA ESTABLE CHO-S  
pcDNA3/IFN- $\gamma$  PARA LA PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$  HUMANO RECOMBINANTE”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

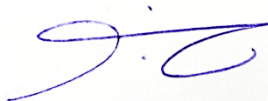
Miembro del jurado: M.F. Lorena Uribe Toledo

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi  
decisión es:

La tesis:  
 Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

18 de mayo de 2020

\_\_\_\_\_  
Fecha

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Mirna Rodríguez Aguilar

Título de la tesis: “DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA ESTABLE CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$  PARA LA PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$  HUMANO RECOMBINANTE”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Irene Vergara Bahena

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:  
 Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

18-05-2020

\_\_\_\_\_  
Fecha

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica (Laboratorio 7) de la Facultad de Farmacia en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), bajo la dirección de la Dra. Angélica Meneses Acosta.

Dicho trabajo fue financiado por el proyecto CONACyT INFR 2014 por medio del proyecto 226271 y el otorgamiento de la beca 892658.



---

## **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece el apoyo financiero otorgado por CONACyT CB 2015 257408 y al apoyo CONACyT INFR 2014 por medio del proyecto 226271. Asimismo, se agradece al CONACyT por el otorgamiento de la beca 892658.

A la Dra. Angélica Meneses Acosta, gracias por haber creído en mí, por aceptarme en su laboratorio y brindarme la confianza para realizar este proyecto, por todas las enseñanzas y comentarios, así como por el apoyo profesional y personal. Gracias por su tiempo, su paciencia y dedicación.

A mi comité tutorial conformados por la Dra. Dea Herrera Ruiz y el cDR. Mauricio Barrón Castillo y a el grupo de sinodales conformado por el Dr. Jorge A. Reyes Esparza, Dr. Erick Ayala Calvillo, cDr. Mauricio Barrón Castillo, MF. Lorena Uribe Toledo y la Dra. Irene Vergara Bahena, gracias por todos esos comentarios, me ayudaron a crecer como profesionista.

Al MF. Carlos A. Tavira Montalván por el apoyo técnico, la sabiduría, su amistad incondicional y la confianza depositada en mí, gracias por estar en cada una de las etapas de mi formación en el laboratorio.

## DEDICATORIA

A mi familia quien es la columna vertebral de lo que soy y lo que tengo, especialmente a mi madre Elizabeth Aguilar por ser esa mujer que supo sacarme adelante, por no rendirse ante nada y por enseñarme que, si me caigo 2 veces, 2 veces me levanto, por alentarme a ser una mejor persona cada día y a no conformarme.

## TABLA DE CONTENIDO.

<b>I. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1. Biofármacos y medicamentos biotecnológicos.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1.1. Proteínas recombinantes y su producción.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.1. Línea celular CHO-S.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.2. Producción de proteínas recombinantes en líneas celulares de mamíferos. ....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.2.1. .... Transferencia de ADN, plásmidos, y expresión génica de proteínas recombinantes.....</b>	<b>23</b>
<b>II. ANTECEDENTES. ....</b>	<b>26</b>
<b>2.1. Interferón gamma.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1.1. Principales funciones del IFN-<math>\gamma</math>.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1.2. Terapia con interferón gamma humano (rIFN- <math>\gamma</math>).....</b>	<b>28</b>
<b>2.2. Sistemas de expresión utilizados para la producción del Interferón gamma humano recombinante.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.1. Producción de rIFN-<math>\gamma</math> dentro del grupo de trabajo del laboratorio 7 de biotecnología farmacéutica de la facultad de farmacia. ....</b>	<b>30</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>33</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL. ....</b>	<b>34</b>
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>7.1. Características de los plásmidos.....</b>	<b>35</b>
<b>7.1.1. Plásmido pVAX1/IFN-<math>\gamma</math>.....</b>	<b>35</b>
<b>7.1.2. Plásmido pcDNA3 (+). ....</b>	<b>36</b>
<b>7.1.3. Amplificación de plásmidos.....</b>	<b>36</b>
<b>7.1.4. Purificación del ADN plasmídico.....</b>	<b>37</b>

7.1.5.	Cuantificación del ADN plasmídico.....	37
7.1.6.	Análisis de restricción.....	38
7.1.7.	Electroforesis en gel de agarosa.....	38
7.2.	Construcción molecular del vector de expresión pcDNA3/IFN- $\gamma$ .....	39
7.2.1.	Amplificación del gen IFN- $\gamma$ mediante PCR a partir del plásmido pVAX1/IFN- $\gamma$ .....	39
7.2.1.1.	PCR gradiente para determinar la Tm ideal.....	40
7.2.1.2.	Purificación del gen IFN- $\gamma$ a partir de geles de agarosa.....	40
7.2.2.	Reacción de doble digestión del plásmido pcDNA3 (+) y del fragmento IFN- $\gamma$ . 41	
7.2.3.	Reacción de ligación.....	42
7.2.4.	Células bacterianas quimiocompetentes.....	43
7.2.5.	Transformación bacteriana.....	43
7.2.6.	PCR de colonias.....	44
7.2.7.	Amplificación de colonias positivas y purificación del plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ .....	45
7.2.8.	Ensayo de restricción y PCR.....	46
7.2.9.	Secuenciación del plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ .....	48
7.3.	Cultivo de la línea celular CHO-S.....	48
7.3.1.	Características de la línea celular CHO-S.....	48
7.3.2.	Medio de cultivo.....	48
7.3.3.	Descongelamiento, mantenimiento y criopreservación celular.....	49
7.3.3.1.	Descongelamiento celular.....	49
7.3.3.2.	Subcultivo celular:.....	49
7.3.3.3.	Congelamiento celular.....	49
7.4.	Caracterización de la línea celular CHO-S.....	50
7.4.1.	Cinética de crecimiento.....	50
7.4.2.	Conteo y viabilidad celular.....	50

7.4.3.	Análisis de nutrientes y metabolitos celulares de la línea celular CHO-S.	51
7.4.4.	Curva de sensibilidad al antibiótico G418 de la línea celular CHO-S....	52
7.5.	Generación del sistema estable CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$ .....	53
7.5.1.	Transfección de las células CHO-S con el plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ y selección policlonal. ....	53
7.5.2.	Análisis de la expresión génica y proteica de interferón gamma. ....	55
7.5.3.	Análisis del ARNm de IFN- $\gamma$ mediante RT-PCR.....	55
7.5.4.	Cuantificación de IFN- $\gamma$ por la técnica de ELISA. ....	58
7.5.5.	Selección clonal. ....	60
7.6.	Caracterización del sistema estable CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$ .....	64
7.6.1.	Cinética de crecimiento.....	64
7.6.2.	Análisis de la expresión génica y proteica de interferón gamma. ....	64
VIII.	RESULTADOS. ....	65
8.1.	Amplificación de plásmidos y análisis de restricción. ....	65
8.2.	Construcción molecular del vector de expresión pcDNA3/IFN- $\gamma$ . ....	66
8.2.1.	Amplificación del gen IFN- $\gamma$ mediante PCR a partir del plásmido pVAX1/IFN- $\gamma$ . ....	66
8.2.2.	Reacción de doble digestión del plásmido pcDNA3 (+) y del fragmento IFN- $\gamma$ . 67	
8.2.6.	Análisis de secuenciación del plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ .....	70
8.3.	Caracterización de la línea celular CHO-S.....	71
8.3.1.	Cinética de crecimiento.....	71
8.3.2.	Análisis de metabolitos celulares de la línea celular CHO-S sin transfectar.....	74
8.3.3.	Curva de sensibilidad al antibiótico G418 de la línea celular CHO-S. ....	76
8.4.	Generación del sistema estable CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$ .....	79
8.4.1.	Transfección de las células CHO-S con el plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ y selección policlonal. ....	79

8.4.2.	<b>Análisis de la expresión génica y proteica de interferón gamma. ....</b>	<b>84</b>
8.4.2.1.	<b>Análisis del ARNm de IFN- <math>\gamma</math> en células transfectadas, mediante RT-PCR. 85</b>	
8.4.2.2.	<b>Cuantificación de IFN-<math>\gamma</math> por la técnica de ELISA. ....</b>	<b>85</b>
8.4.3.	<b>Selección clonal. ....</b>	<b>86</b>
8.5.	<b>Caracterización del sistema estable CHO-S pcDNA3/IFN-<math>\gamma</math>. ....</b>	<b>92</b>
8.5.1.	<b>Cinética de crecimiento. ....</b>	<b>92</b>
8.5.2.	<b>Análisis de la expresión génica y proteica de interferón gamma. ....</b>	<b>94</b>
IX.	<b>DISCUSIÓN. ....</b>	<b>97</b>
X.	<b>CONCLUSIÓN. ....</b>	<b>103</b>
XI.	<b>PERSPECTIVAS. ....</b>	<b>104</b>
XII.	<b>ANEXOS. ....</b>	<b>104</b>
XIII.	<b>REFERENCIAS. ....</b>	<b>110</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Modificaciones postraduccionales proteicas..	18
Figura 2. Proceso general de producción de proteínas recombinantes	18
Figura 3. Diagramas esquemáticos dos tipos de expresión o transfecciones diferentes.	25
Figura 4. Estructura dimérica del IFN- $\gamma$ biológicamente activo	26
Figura 5. Síntesis del interferón gamma..	27
Figura 6. Plásmido pVAX/IFN- $\gamma$ .	35
Figura 7. Plásmido pcDNA3 (+).	36
Figura 8. Secuencia del cADN del gen IFN- $\gamma$ . El cADN de la proteína IFN- $\gamma$ consta de 501 pb.	39
Figura 9. Diluciones seriadas, estándar de IFN- $\gamma$ .	59
Figura 10. Diagrama para la selección clonal mediante clonación unicelular.	61
Figura 11. Análisis de restricción del plásmido pcDNA3 (+) y amplificación del gen IFN- $\gamma$ .	65
Figura 12. PCR gradiente para determinar la Tm óptima para amplificar el gen IFN- $\gamma$ .	66
Figura 13. Doble digestión del plásmido pcDNA3 (+) y del fragmento IFN- $\gamma$ con las enzimas <i>KpnI</i> y <i>XbaI</i> .	67
Figura 14. Reacción de ligación.	68
Figura 15. PCR de colonias positivas.	69
Figura 16. Ensayo de restricción y PCR. A) Digestión del plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ .	70
Figura 17. Análisis Blast de la secuenciación de IFN- $\gamma$ .	71
Figura 18. Cinética de crecimiento de células CHO-S.	73
Figura 19. Fase exponencial en la cinética de crecimiento de la línea celular CHO-S sin transfectar.	73
Figura 20. Morfología del cultivo de la cinética de crecimiento de células CHO-S.	74
Figura 21. Análisis de metabolitos celulares de la línea celular CHO-S sin transfectar.	76

<b>Figura 22. Curva de sensibilidad al antibiótico G418 de la línea celular CHO-S..</b>	<b>78</b>
<b>Figura 23. Morfología de las células CHO-S de la curva de sensibilidad al antibiótico G418.....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 24. Viabilidad de las células CHO-S transfectadas con el plásmido pcDNA3/IFN-<math>\gamma</math> mediante lipofección durante la selección policlonal.....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 25. Conteo de las células CHO-S transfectadas con el plásmido pcDNA3/IFN-<math>\gamma</math> mediante lipofección durante la selección policlonal (CV/mL).....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 26. Morfología del cultivo de la transfección y selección policlonal de la línea celular CHO-S con el plásmido pcDNA3/IFN-<math>\gamma</math>.....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 27. Análisis del ARNm para IFN-<math>\gamma</math> por RT-PCR en cultivos de CHO-S transfectados con el plásmido pcDNA3/IFN-<math>\gamma</math>. .....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 28. Cuantificación de IFN-<math>\gamma</math> producido a partir de los Minipools 1 y 2 mediante ELISA.....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 29. Morfología de la selección clonal utilizando el método de clonación unicelular.....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 30. Evaluación del porcentaje de suplemento con medio metabolizado en la selección clonal del sistema CHO-S/pcDNA/IFN-<math>\gamma</math>.. .....</b>	<b>88</b>
<b>Figura 31. Viabilidades obtenidas de la selección clonal.) .....</b>	<b>89</b>
<b>Figura 32. Curva estándar de IFN-<math>\gamma</math>.....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 33. Producción de la proteína IFN-<math>\gamma</math> 168 h post selección clonal. ....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 34. Curva estándar de IFN-<math>\gamma</math>. .....</b>	<b>91</b>
<b>Figura 35. Producción de la proteína IFN-<math>\gamma</math> 168h post selección clonal. ....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 36. Cinética de crecimiento del sistema CHO-S pcDNA3/IFN-<math>\gamma</math>. .....</b>	<b>93</b>
<b>Figura 37. Análisis del ARNm para IFN-<math>\gamma</math> por RT-PCR del sistema CHO-S pcDNA3/IFN-<math>\gamma</math>. .....</b>	<b>94</b>
<b>Figura 38. Producción de la proteína IFN-<math>\gamma</math> posterior a 168h de cultivo. ....</b>	<b>95</b>



## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1. Producción de IFN-<math>\gamma</math> en diferentes sistemas de expresión.....</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 2. Condiciones de digestión enzimática. ....</b>	<b>38</b>
<b>Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para amplificar el transgen de IFN-<math>\gamma</math>.....</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 4. Condiciones de reacción para determinar la Tm en PCR. ....</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 5. Condiciones para la PCR en la determinación de la Tm. ....</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 6. Condiciones para la reacción de doble digestión. ....</b>	<b>41</b>
<b>Tabla 7. Condiciones para la reacción de ligación. ....</b>	<b>43</b>
<b>Tabla 8. Condiciones de reacción para el PCR de colonias. ....</b>	<b>44</b>
<b>Tabla 9. Condiciones para el PCR de colonia. ....</b>	<b>45</b>
<b>Tabla 10. Condiciones de digestión enzimática. ....</b>	<b>47</b>
<b>Tabla 11. Condiciones de reacción en PCR para la identificación del gen de IFN-<math>\gamma</math>. ....</b>	<b>47</b>
<b>Tabla 12. Condiciones en PCR para la identificación del gen de IFN-<math>\gamma</math>.....</b>	<b>47</b>
<b>Tabla 13. Condiciones de digestión enzimática para la transfección. ....</b>	<b>54</b>
<b>Tabla 14. Condiciones para remover ADN genómico de extracciones de ARN. ....</b>	<b>56</b>
<b>Tabla 15. Condiciones para la síntesis de cADN. ....</b>	<b>57</b>
<b>Tabla 16. Disposición de las muestras en las tiras de la placa de ELISA.....</b>	<b>60</b>
<b>Tabla 17. Producción específica de proteína del sistema CHO-S pcDNA3/IFN-<math>\gamma</math>. ....</b>	<b>96</b>

## ABREVIATURAS.

<b>μ</b>	Velocidad específica de crecimiento	<b>Oligo</b>	Oligonucleótido
<b>μg/mL</b>	Microgramos por mililitro	<b>pb</b>	Pares de bases
<b>pg/mL</b>	Picogramos por mililitro	<b>rIFN-γ</b>	Proteína interferón gamma recombinante
<b>μL</b>	Microlitro	<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero	<b>RT-PCR</b>	Real Time Polymerase Chain Reaction
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>SDS-PAGE</b>	acrónimo en inglés de sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>cADN</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario	<b>pb</b>	Pares de bases
<b>CHO-S</b>	Células de ovario de hámster chino adaptadas a suspensión	<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>CMV</b>	Citomegalovirus	<b>RevIFN-g-<i>Xba</i> I</b>	Oligo Reverse de IFN-γ con la enzima <i>Xba</i> I
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono.	<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>CT/mL</b>	Células totales por mililitro de medio	<b>RT-PCR</b>	Real Time Polymerase Chain Reaction
<b>CV/mL</b>	Células vivas por mililitro de medio	<b>s</b>	Segundos
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	<b>SN</b>	Sobrenadantes
<b>h</b>	Hora (s)	<b>Tamb</b>	Temperatura ambiente
<b>IFN-γ</b>	Proteína interferón gamma	<b>Taq Polimerasa</b>	Enzima ADN polimerasa de la bacteria <i>Thermus aquaticus</i>
<b>FwdIFN-g-<i>Kpn</i> I</b>	Oligo Forward de IFN-γ con la enzima <i>Kpn</i> I	<b>Td</b>	Tiempo de duplicación
<b>LB</b>	Medio de cultivo para bacterias Luria Bertani	<b>Tm</b>	Temperatura Melting o temperatura de hibridación
<b>nM</b>	NanoMolar	<b>WB</b>	Western blot
<b>mM</b>	Milimolar		
<b>min</b>	Minuto (s)		
<b>mL</b>	Mililitros		
<b>MPM</b>	Marcador de peso molecular		
<b>ng/mL</b>	Nanogramos por mililitro		
<b>KDa</b>	KiloDaltons		

## RESUMEN.

En la producción de glicoproteínas como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), la elección del sistema de expresión es crucial, porque influye en la calidad y cantidad de la proteína recombinante. Las células de mamíferos son los huéspedes preferidos para la producción de estas proteínas, ya que generan complejas modificaciones postraduccionales, pliegan correctamente la proteína y son capaces de segregar el producto en el medio de cultivo. El éxito generalizado de la línea de células CHO se debe a su incomparable adaptabilidad, generalmente utilizada en la expresión estable o constitutiva de las glicoproteínas, ya que estos sistemas permiten caracterizar la función y estructura de proteínas recombinantes complejas.

Bajo este tenor dentro del grupo de trabajo se han generado sistemas transitorios utilizando células de mamífero como hospederos para producir la proteína interferón gamma dentro de los cuales con el sistema HEK293/AD5-IFN- $\gamma$  se optimizó la expresión de la proteína obteniendo así 19.2 pg/mL, siendo esta la concentración más alta obtenida en un sistema transitorio. Por ello, en el presente trabajo se pretende generar una línea celular CHO-S que exprese de manera estable interferón gamma en altas concentraciones y en forma de homodímero glicosilado, así como realizar la caracterización tanto de la línea celular como de la proteína producida.

Con el fin de lograr este objetivo se realizó primeramente la construcción del vector de expresión pcDNA3/IFN- $\gamma$ , Durante el análisis de la secuenciación de la construcción del plásmido se corroboró que el transgén insertado corresponde con la proteína de interés (IFN- $\gamma$ ).

Para la generación del sistema de expresión estable se realizó una selección policlonal obteniendo dos minipools con producciones bajas de interferón gamma. Seguido de la selección clonal para obtener dos clonas con producción alta de IFN- $\gamma$  expresando más de 1000 pg/mL de manera constante el transgén de interés por más de 200 generaciones desde su transfección, siendo considerablemente mayores comparadas con el sistema el transitorio HEK293/AD5-IFN- $\gamma$  el cual produce 19.22 pg/mL con lo cual se corrobora la hipótesis planteada en este proyecto.

## SUMMARY.

During the production of glycoproteins such as gamma interferon (IFN- $\gamma$ ), the choice of the expression system is crucial, as it has a great influence on the quality and quantity of the recombinant protein. Mammalian cells are the preferred hosts to produce these proteins, as they generate complex post-translational modifications, correctly fold the protein and can secrete the product into the culture medium. The widespread success of the CHO cell line is due to its incomparable adaptability, generally used in the stable or constitutive expression of glycoproteins, as these systems allow the characterization of the function and structure of complex recombinant proteins.

In this sense, the working group has generated transitional systems using mammalian cells as hosts to produce the interferon-gamma protein. With the HEK293/AD5-IFN- $\gamma$  system, the protein expression was optimized to obtain 19.2 pg/mL, which is the highest concentration obtained in a transitional system. Therefore, the present work aims to generate a CHO-S cell line that stably expresses gamma interferon in high concentrations and in the form of glycosylated homodimer, as well as to perform the characterization of both the cell line and the produced protein.

In order to achieve this objective, the expression vector pcDNA3/IFN- $\gamma$  was first constructed. During the analysis of the plasmid construction sequencing, it was corroborated that the inserted transgene corresponds to the protein of interest (IFN- $\gamma$ ).

For the generation of the stable expression system a polyclonal selection was performed obtaining two minipools with low gamma interferon productions. Following the clonal selection to obtain two clones with high production of IFN- $\gamma$  expressing more than 1000 pg/mL constantly the transgene of interest for more than 200 generations since its transfection, being considerably higher compared to the system the transitory HEK293/AD5-IFN- $\gamma$  which produces 19.22 pg/mL which corroborates the hypothesis raised in this project.

## I. MARCO TEÓRICO.

### 1.1. Biofármacos y medicamentos biotecnológicos.

La biotecnología ha tenido gran impacto en el área de la medicina, principalmente en el desarrollo de nuevas metodologías para determinar a nivel molecular la causa de diversas enfermedades (Gamboa and Trujillo-Roldán 2009). En los últimos 30 años, el desarrollo de biofármacos y medicamentos biotecnológicos ha crecido de manera exponencial debido a las nuevas posibilidades que estos brindan en el tratamiento de enfermedades crónico/severas y degenerativas tales como el cáncer, la artritis reumatoide, la osteoporosis, insuficiencia renal o esclerosis múltiple, infecciones y desórdenes autoinmunes, como la diabetes, entre otras (Bandaranayake and Almo 2014). Un biofármaco es una molécula biológica con fines terapéuticos obtenida a partir de un organismo vivo (Gamboa and Trujillo-Roldán 2009).

Un número creciente de estos biofármacos exitosos son proteínas recombinantes con fines terapéuticos, que presentan mayor acción terapéutica y menos reacciones secundarias con respecto a tratamientos tradicionales, al ser prácticamente homólogas a las producidas por el organismo humano. Estas moléculas se producen a partir de un organismo vivo, ya sea a partir de bacterias, hongos, células animales, levaduras, entre otros (Gamboa and Trujillo-Roldán 2009). Sin embargo, el uso de diferentes sistemas de producción sigue siendo materia de estudio, ya que es necesario tener sistemas competitivos que tengan productividades aceptables y brinden productos con la calidad y eficacia adecuadas (Bandaranayake and Almo 2014).

#### 1.1.1. Proteínas recombinantes y su producción.

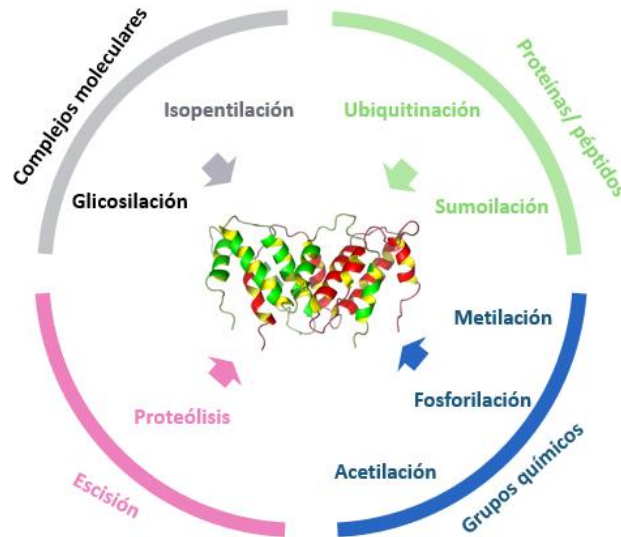
Las proteínas recombinantes (PR) son aquellas que se obtienen al expresar un gen codificante clonado en un sistema de expresión distinto al organismo productor original (Guevara-Hernández et al. 2013). Un ejemplo de proteína recombinante es la insulina humana producida de manera *in vitro*, obtenida a partir de cultivos de *E. coli* (Baeshen et al. 2014).

Hoy en día, los sistemas de expresión de proteínas recombinantes se han convertido en una herramienta muy popular, ya que es posible obtener altas cantidades de proteína con bajos costos de producción y alta pureza. Un aspecto importante de estas proteínas de uso

terapéutico es que son específicas contra padecimientos que antes se consideraban incurables, o bien cuando el medicamento existente sólo lograba controlar la enfermedad, en la mayoría de los casos de manera ineficaz (Gamboa and Trujillo-Roldán 2009).

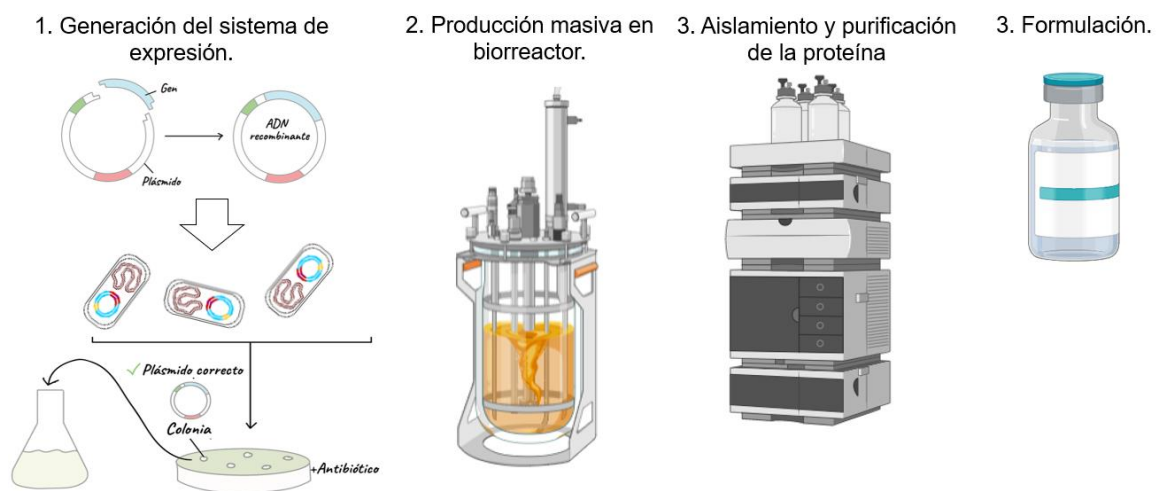
La producción de PR se lleva a cabo mediante la tecnología del ADN recombinante, la cual ha permitido conocer y separar los genes codificantes para las proteínas de interés, que son transferidos a diferentes microorganismos diferentes a los nativos llamados sistemas hospederos (Valdez-cruz et al. 2018).

Dentro de la primera etapa de producción del bioproceso es importante la elección del sistema productor, ya que algunos retos involucrados durante la producción son el hecho de que este genere la proteína en cantidades adecuadas para el uso humano, que sea capaz de producir la secuencia proteica correcta con las modificaciones postraduccionales (cambios químicos que las proteínas pueden sufrir después de la traducción (Bürkle 2001)) necesarias (**Figura 1**) para que ésta tenga la función, actividad y estabilidad requeridas (M. Butler and Meneses-Acosta 2012), ya que estas modificaciones desempeñan un papel fundamental en la regulación del plegamiento de proteínas, su orientación a compartimentos subcelulares específicos, su interacción con ligandos u otras proteínas y su estado funcional, así como la actividad catalítica en el caso de enzimas o la función de señalización de proteínas (Bürkle 2001; Wang, Peterson, and Loring 2014).



**Figura 1. Modificaciones postraduccionales proteicas.** La estructura, la estabilidad y la función de las proteínas en las células pueden ser alteradas dinámicamente por estas modificaciones (Tomado y modificado de Wang, Peterson, and Loring 2014).

La serie de pasos fundamentales para obtener proteínas recombinantes durante el bioproceso son: 1) Tener un gen que codifique para la proteína de interés y un hospedero que realice las modificaciones que se requieran para obtener una proteína funcional; 2) Que la proteína sea expresada a las concentraciones requeridas y se lleve a una escala de producción mayor; 3) Un método de separación y purificación, un sistema de estabilización; 4) Finalmente la formulación (Drago and Sainz 2006) (**Figura 2**).



**Figura 2. Proceso general de producción de proteínas recombinantes** (Tomado y modificado de Silva, 2012).

## 1.2. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes.

Investigaciones recientes en ingeniería genética y expresión de proteínas heterólogas han acelerado el desarrollo de biofármacos tales como anticuerpos, vacunas, hormonas, citocinas y una gran variedad de otros agentes terapéuticos, los cuales se han expresado a través de múltiples sistemas biológicos. Estos sistemas abarcan desde la expresión utilizando bacterias como la *Escherichia coli* para proteínas estructuralmente simples, hasta la producción de péptidos que presentan diversos niveles de complejidad estructural y funcional, los cuales se expresan en células de mamíferos, células de levaduras y células de insectos (Noguera and Fermín 2013).

- Sistemas de expresión en bacterias.

Los microorganismos más utilizados para la síntesis de proteínas recombinantes son las bacterias, siendo la *E. coli* ampliamente utilizada en la industria biotecnológica (García et al. 2013). Esta bacteria es fácil de cultivar y de modificar genéticamente. A nivel de síntesis de proteínas, se obtienen de manera rápida y con altos rendimientos (llegando a acumular hasta el 80% de su peso seco de proteínas recombinantes) lo que hace que sea la primera posibilidad que se tiene en cuenta cuando se quiere expresar proteínas recombinantes (Martínez and Martos 2011).

Las bacterias son ideales para producir proteínas de pequeño tamaño que no requieran modificaciones postraduccionales. Entre las ventajas que este microorganismo brinda como hospedero están: mayor velocidad específica de crecimiento que las levaduras y células de mamíferos, no posee requerimientos costosos asociados a medios de cultivo o equipamiento a diferencia de las células de organismos superiores, existe una gran variedad de vectores de expresión estables y es un microorganismo aprobado por las entidades reguladoras para su utilización como hospedero en la producción de biofármacos (García et al. 2013).

- Sistemas de expresión en levaduras.

Las levaduras presentan muchas de ventajas comparadas con los sistemas bacterianos (alto rendimiento, estabilidad de la cepa productora, crecimiento a alta densidad, productividad, crecimiento en medios baratos y químicamente definidos). Además, son capaces de glicosilar y de plegar proteínas complejas, incluyendo aquellas que tienen un número elevado de puentes disulfuro, ya que su proceso de producción es muy similar al



de las células de mamífero. La adición de una secuencia señal en el gen permite la excreción de la proteína al medio de cultivo. Algunas levaduras, como *S. cerevisiae*, tienen una larga historia de utilidad en procesos de fermentación industrial (Martínez and Martos 2011). Su principal desventaja es que producen proteínas con un patrón de glicosilación de alta manosa, el cual puede ser inmunogénico (Almo et al. 2013).

- Sistemas de expresión en células de insecto.

Las células de insecto son transformadas mediante vectores basados en baculovirus. Un vector de este tipo infecta fácilmente cultivos de células larvarias de insectos de manera muy específica. Las células de insecto son capaces de llevar a cabo modificaciones postraduccionales mucho más complejas que las levaduras, abarcando no sólo glicosilaciones, sino también fosforilaciones, procesamiento de péptidos señal, procesamientos proteolíticos correctos, acilaciones, carboximetilaciones, etc (Martínez and Martos 2011). Procesan los puentes disulfuro correctamente y además muestran altos niveles de expresión. Su principal desventaja es que el patrón de glicosilación no es similar al de humano y la fucosa introducida en este proceso es altamente inmunogénica (Drago and Sainz 2006).

- Sistemas de expresión en líneas celulares de mamíferos.

Las células de mamífero son, en la mayoría de los casos, el sistema óptimo para producir proteínas de mamíferos ya que las proteínas recombinantes resultantes son muy similares a la forma natural. Una de las ventajas más grandes es que en este tipo celular se pueden producir proteínas que requieren modificaciones postraduccionales específicas de mamífero, por otra parte, con respecto a los demás sistemas el mantenimiento tiene un alto costo debido a que las células crecen muy despacio (24-30 h dependiendo de la línea celular y las condiciones de cultivo), el medio de cultivo es caro y requiere suministro constante de CO<sub>2</sub> y necesitan medios con un mayor número de nutrientes, siendo esta su principal desventaja. Además, el rendimiento de la producción es más bajo que en otros sistemas y se requieren muchos más esfuerzos para conseguir buenas cantidades de proteínas purificadas (Martínez and Martos 2011).

### **1.2.1. Línea celular CHO-S.**

Las líneas celulares de mamífero son los hospederos de elección para la producción de biofármacos debido a sus propiedades de generar modificaciones postraduccionales

complejas, plegamiento correcto de la proteína y tener la capacidad de excretar el producto al medio de cultivo para su posterior purificación (Zhu 2012). El éxito generalizado de la línea celular CHO se debe a su inigualable adaptabilidad, permitiendo el crecimiento de estas células a altas densidades en los cultivos de suspensión y facilita la adaptación a las condiciones libres de suero, teniendo una producción de proteínas recombinantes más seguras, simplificado los procesos de downstream, ya que contienen menos contaminantes proteínicos (Kuo et al. 2018).

La línea celular CHO-S ha sido adaptada a suspensión mediante métodos físicos utilizando medios químicamente definidos libres de suero (el uso de medios químicamente definidos ha tenido una gran mejora en la calidad y disponibilidad de los mismos, debido a que que no requieren suplementos con suero derivado de animales son más seguros al haber menos riesgo de contaminación viral y por priones del suero bovino (Bandaranayake and Almo 2014)), que provienen de una línea celular CHO-K1, esta deriva de un explante del ovario de una hembra adulta de hámster chino (*Cricetulus griseus*). Proveniente de la línea celular de ovario de hámster chino original (CHO) la cual fue aislada por Theodore T. Puck en el año 1957. Desde entonces, las células CHO han sido una línea celular de elección debido a su rápido crecimiento en el cultivo en suspensión y la alta producción de proteínas (Kildegaard et al. 2013).

Actualmente la línea celular CHO es uno de los sistemas productores de proteínas terapéuticas de mamíferos frecuentemente utilizado debido a varias ventajas clave sobre otros tipos de células, tales como:

- a) Un crecimiento robusto en un cultivo en suspensión definido químicamente y libre de suero.
- b) Un perfil de seguridad razonable con respecto a la replicación del virus patógeno humano, ya que un análisis global de los genes de susceptibilidad viral en CHO-K1 indicó que muchos genes importantes de entrada viral no están expresados, lo que explica la resistencia de las células CHO a muchos virus (Kildegaard et al. 2013) .
- c) La capacidad de expresar proteínas recombinantes con modificaciones postraduccionales similares a las humanas (Bandaranayake and Almo 2014).
- d) Además, una de las características más importantes del sistema de células CHO es la facilidad para generar clones de células modificadas que son capaces de expresar

de forma estable un gen de interés con un rendimiento suficiente y una calidad aceptable para el uso humano (Fischer, Handrick, and Otte 2015).

Hoy en día, existen tres líneas celulares CHO diferentes, las cuales se utilizan comúnmente para la fabricación de productos biofarmacéuticos:

1. La línea celular CHO-K1 que aún alberga un gen DHFR funcional (Kim and Eberwine 2010).
2. La línea celular CHO-DXB11 (también conocido como CHO-DUKX) la cual se mutagenizó con metanosulfonato de etilo para generar una línea celular que carece de actividad de dihidrofolato reductasa (DHFR) (Urlaub and Chasin 1980).
3. La línea celular CHO-DG44 en la que los dos alelos DHFR fueron suprimidos utilizando radiación gamma.

### **1.2.2. Producción de proteínas recombinantes en líneas celulares de mamíferos.**

La producción de biofármacos se realiza en diversos sistemas biológicos, utilizando como hospederos desde bacterias hasta células de mamíferos (Zhu 2012). Se prefieren los sistemas de expresión de células animales para la producción de proteínas grandes y complejas que requieren modificación postraduccional para su actividad biológica (Durocher and Butler 2009). La expresión en células de mamífero se ha convertido en el sistema dominante de producción de PR para aplicaciones clínicas debido a su capacidad para la modificación postraduccional y el ensamblaje de la estructura molecular similar a la proteína humana (Bandaranayake and Almo 2014).

Ya que los sistemas eucariotes introducen modificaciones postraduccionales como glicosilaciones, eliminación de la metionina inicial, ruptura proteolítica de un precursor, formación de puentes disulfuro que darán forma a la estructura terciaria, entre otros, asemejando las proteínas recombinantes a las endógenas (Gamboa and Trujillo-Roldán 2009), se han utilizado diferentes líneas celulares animales tales como Baby Hamster Kidney (BHK21), fibrosarcoma humano (HT1080), linfoma humano (Namalwa), Human Embryo Kidney 293 (HEK293) y Chinese hamster ovary (CHO) (Durocher and Butler 2009).

Una de las modificaciones postraduccionales más importantes que generan las células de mamífero es la glicosilación de proteínas, ya que es bien sabido que tiene un papel fundamental en la regulación de la estructura y la estabilidad de la proteína, la transducción de señales, las interacciones célula-célula y el entorno celular, la respuesta inmune,

temporalidad en el torrente sanguíneo, entre otros (Wang, Peterson, and Loring 2014; Lalonde and Durocher 2017). Para la producción de glicoproteínas suelen emplearse células de mamíferos, siendo las de primera elección las líneas celulares CHO (ovario de hámster chino) o HEK293 (riñón embrionario humano) (Almo et al. 2013).

Las células CHO generalmente se utilizan en la expresión estable o constitutiva de glicoproteínas por lo que la selección de clonas así como el trabajo molecular y su estabilidad son puntos críticos para obtener una línea celular altamente productora que genere glicoproteínas con patrones de glicosilación semejantes al humano (Baldi et al. 2007).

#### **1.2.2.1. Transferencia de ADN, plásmidos, y expresión génica de proteínas recombinantes.**

El procedimiento para producir una PR consiste en introducir el ADN que codifica para la proteína de interés en un vector de sobreexpresión (plásmidos, virus, cósmidos) (Guevara-Hernández et al. 2013). El vector contiene un origen de replicación que le permite copiarse dentro de la célula hospedera, una región promotora que permite la producción de la proteína de interés, un sitio de clonación múltiple (SCM), que es una región que contiene diversos sitios de restricción que permiten la inserción de ADN entre ellos y genes de resistencia a antibióticos y genes reporteros, que facilitan la selección de las colonias bacterianas que tendrían el vector con la información genética insertada (Hacker and Balasubramanian 2016).

Para la generación de un plásmido recombinante, se lleva a cabo un procedimiento de ligación que permite insertar dentro del SCM del vector un segmento de ADN codificante para la proteína de interés. Al producto de este vector, más el fragmento de ADN codificante o inserto, se denomina “construcción”. El siguiente paso es la “transformación”, ésta se realiza al insertar la construcción dentro de la célula hospedera siendo nuestro sistema productor de dicha proteína (Palomares, Estrada-Mondaca, and Ramírez 2004).

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN cerradas, las cuales se caracterizan por que se pueden replicar de manera independiente del ADN genómico en las células bacterianas (Khan 2013). Los plásmidos pueden constituir una cantidad sustancial del contenido genético total de un organismo, representando más del 25% del material genético

de la célula hospedera. Pueden incorporar genes por recombinación o transposición, favoreciendo así los intercambios genéticos en poblaciones celulares (del Solar et al. 1998).

Existen dos maneras de poder expresar proteínas recombinantes mediante la utilización de plásmidos.

**a. Expresión transitoria:**

Una estrategia para acelerar el proceso de producción de proteínas es eliminar el paso de selección del fármaco mediante la realización de transfusiones transitorias a escala. Utilizando este enfoque, las líneas celulares clonales no son necesarias, ya que las células se cultivan (y transfectan) directamente a la escala de producción y, por lo tanto, no es necesario cultivarlas durante largos períodos de tiempo (Baldi et al. 2007).

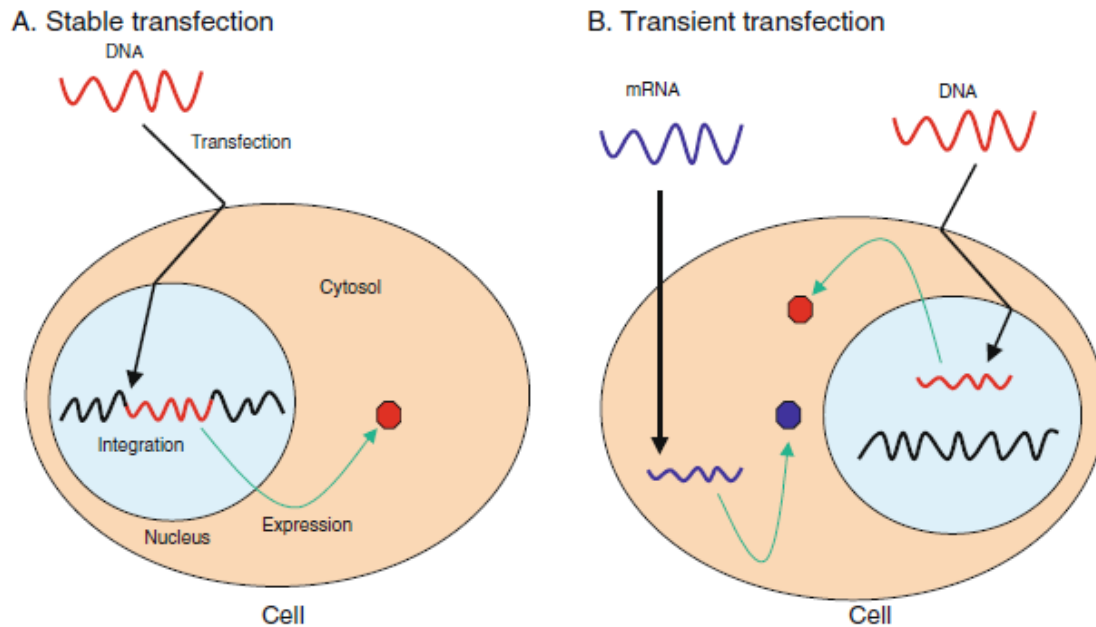
En la mayoría de los casos, los primeros intentos de expresar transitoriamente proteínas recombinantes se ejecutaron con vectores de expresión "estándar" que contienen fuertes promotores virales, como SV40 o un promotor del citomegalovirus (CMV). Más recientemente, al menos uno de los promotores no virales, el promotor del factor de elongación (EF)-1, ha recibido fuertes respaldos porque parece ser tan fuerte o más fuerte que algunos de los promotores virales (Bandaranayake and Almo 2014).

**b. Expresión estable:**

En una transfección estable, el ADN del plásmido se integra con éxito en el genoma celular y se transmitirá a las generaciones futuras de la célula. Esto puede lograrse después de la inserción de un gen o plásmido en el genoma de la célula huésped a través de la integración específica (homóloga) del sitio o la integración aleatoria (no homóloga) seguida de la amplificación del gen utilizando los sistemas de dihidrofolato reductasa o glutamina sintetasa (Fischer, Handrick, and Otte 2015), finalmente formar una gran estructura concatenaria que eventualmente se integra al cromosoma (Baldi et al. 2007).

Todas las transfecciones estables comienzan como una transfección transitoria, pero el uso de marcadores de selección (genes que exprese resistencia a los antibióticos, marcadores metabólicos como el gen Lac Z o marcadores auxotróficos) expresados en el ADN del plásmido, que permiten la selección de cualquier célula que haya integrado con éxito el gen en su genoma. El tratamiento con antibiótico continuado de las células a largo plazo resulta en la expansión de sólo las células transfectadas de forma estable, mientras que las células

no estables mueren debido a la falta de resistencia a los antibióticos. El ADN lineal parece ser mejor para una transfección estable, aunque su captación sigue siendo menor que con el ADN superenrollado (Zhou et al. 2010).



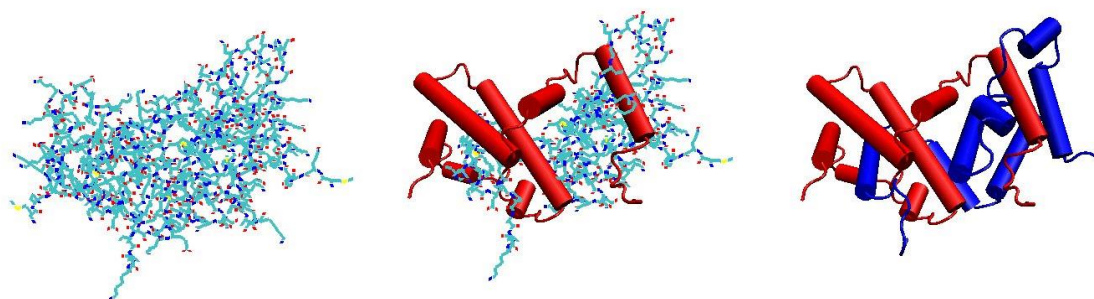
**Figura 3. Diagramas esquemáticos dos tipos de expresión o transfecciones diferentes. (A) Transfección estable.** El ADN extracelular (onda roja) se introduce al núcleo a través las membranas celulares y nucleares. El ADN se integra en el genoma del hospedero (onda negra) y es expresado de manera sostenible. **(B). Transfección transitoria.** El ADN es entregado en el núcleo celular pero no se integra. El ARNm extracelular (onda azul) se introducir en el citosol donde es traducido. Los hexágonos son las proteínas expresadas para posteriormente ser excretadas al medio de cultivo. (Kim and Eberwine 2010).

## II. ANTECEDENTES.

### 2.1. Interferón gamma.

El interferón gamma humano (IFN- $\gamma$ ) es una glicoproteína cuyo gen se localiza en el cromosoma 12 (12q24.1) en humanos. La secuencia de su ADN fue reportada por primera vez por Gray y Goeddel en 1982, posteriormente, se encontró que es codificado por un solo gen, el cual contiene cuatro intrones y tres exones (Sato et al. 2018).

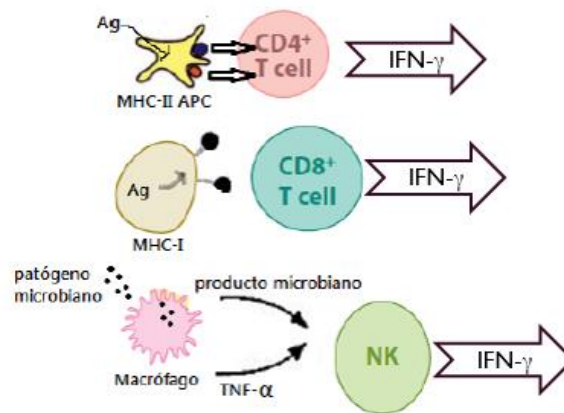
Es una potente molécula reguladora con actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras y es un miembro importante de la familia de las citocinas. La forma biológicamente activa del IFN- $\gamma$  es un homodímero. Las subunidades monoméricas están unidas entre sí de forma no covalente y antiparalela, formando una estructura globular compacta. El IFN- $\gamma$  humano contiene dos sitios potenciales de glicosilación en las posiciones Asn-25 y Asn-97 de su cadena de polipéptidos maduros de 143 aminoácidos de largo plazo. Basándose en la estructura tridimensional del dímero IFN- $\gamma$ , los sitios de glicosilación N están situados en la superficie (T Sareneva et al. 1995). Los residuos de glicano que se encuentran en Asparagina-25 juegan un papel importante en la resistencia a proteasas tales como la catepsina G, la elastasa y la plasmita. Por lo tanto, una adecuada glicosilación aumenta el tiempo de vida media del IFN- $\gamma$  biológicamente activo en la circulación, la cual corresponde a un homodímero estabilizado por fuerzas no covalentes, y con un peso molecular de aproximado de 50 kDa (Timo Sareneva et al. 1996).



**Figura 4. Estructura dimérica del IFN- $\gamma$  biológicamente activo** (Thiel et al. 2000).

El IFN- $\gamma$  o interferón inmune tipo II es producido por linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, células T $\gamma$  / $\delta$ , así como por células Natural killer (NK) en respuesta a algún estímulo inmune o inflamatorio. El IFN- $\gamma$  no comparte receptores con los interferones de tipo I y su estructura proteica es

distinta, ya que cuando es biológicamente activo está formado dos monómeros antiparalelos, lo que le da la capacidad de promover la actividad de las células NK, aumenta la presentación de antígenos y la actividad lisosómica de los macrófagos (Mata-Espinosa and Hernández-Pando 2008).



**Figura 5. Síntesis del interferón gamma.** La producción de IFN- $\gamma$  es exclusiva de algunos tipos celulares, como lo son las células NK activadas por la presencia de TNF- $\alpha$  y de un segundo estímulo, como puede ser un producto bacteriano y, por las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, en respuesta al antígeno presentado por medio de moléculas MHC-II o por linfocitos T citotóxicos después de haber reconocido al antígeno presentado por MHC-I (Billiau and Matthys 2009).

### 2.1.1. Principales funciones del IFN- $\gamma$ .

Se ha demostrado que IFN- $\gamma$  facilita la maduración de múltiples células inmunes, es esencial para las respuestas inmunes y regula la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes en la subpoblación TH1, activación, expansión, homeostasis y supervivencia la regulación de otras funciones celulares como la activación de macrófagos y la inmunidad celular frente a los microorganismos intracelulares, además activa la producción de la IL-12 y favorece la diferenciación de los linfocitos. Una de las primeras funciones que se descubrió para el IFN- $\gamma$  fue la actividad antiviral, así como para los interferones tipo I (IFN- $\alpha$ /IFN- $\beta$ ) los cuales constituyen los antivirales más potentes. La eliminación de patógenos intracelulares requiere la producción de IFN- $\gamma$  por las células T. La generación y activación de células reguladoras T requiere IFN- $\gamma$  (Catriona H.T. Miller, Stephen G. Maher 2017). Entre sus efectos más importantes se conoce que induce la expresión de estructuras que favorecen el reconocimiento de células blanco (estimulación de moléculas MHC I y II) y promueve la producción de compuestos tóxicos derivados de macrófagos, como son especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como factor de necrosis tumoral (Shtrichman and Samuel 2001).



### **2.1.2. Terapia con interferón gamma humano (rIFN- $\gamma$ ).**

Actualmente en el mercado existe interferón gamma recombinante bajo el nombre comercial de IMUKIN® y ACTIMMUNE® (IFN- $\gamma$  1-b) aprobados por la FDA. Son polipéptidos de aproximadamente 140 aa producidos por fermentación en *E. coli* en forma de dos monómeros idénticos sin glicosilaciones (Kamińska et al. 1999). Ambos medicamentos se administran de forma subcutánea y están indicados para reducir la frecuencia de infecciones severas en pacientes con enfermedad Granulomatosa crónica y Osteopetrosis maligna grave. ACTIMMUNE se ha demostrado que es efectivo contra una amplia variedad de enfermedades, incluyendo cáncer, tuberculosis (infecciones por *Mycobacterium avium complex*), fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, esclerodermia, infecciones fúngicas invasivas, especialmente en pacientes inmunodeprimidos, como leucemia, en el tratamiento de la osteopetrosis congénita, en el tratamiento contra infecciones fúngicas en pacientes con trasplante de riñón (Catriona H.T. Miller, Stephen G. Maher 2017; Mata-espinoza and Hernández-pando 2008).

En general, el tratamiento con interferón gamma recombinante es bien tolerado, pero dada la toxicidad asociada con el interferón es un campo abierto para la búsqueda de nuevas formas que reduzcan los efectos adversos, además de los costos que la hagan más accesibles (Mata-espinoza and Hernández-pando 2008).

### **2.2. Sistemas de expresión utilizados para la producción del Interferón gamma humano recombinante.**

En la década de los 80's, el IFN- $\gamma$  se producía exponiendo los linfocitos T humanos a estímulos mitogénicos o mediante la traducción del ARNm en ovocitos, lo que dio lugar a una baja expresión y actividad de  $10^2$ - $10^4$  IU<sup>1</sup> mL<sup>-1</sup>. Hubo una serie de problemas de purificación debido a la formación de agresivos citoplasmáticos y a los costosos procesos de desnaturalización (Billiau and Matthys 2009).

Con el desarrollo de la tecnología de ADN recombinante, el cDNA del IFN- $\gamma$  fue clonado con éxito y expresado en *E. coli* en 1982 debido a su sencillo requerimiento de nutrientes, su elevada tasa de crecimiento y su bien entendida fisiología y genética molecular. IMUKIN® y ACTIMMUNE® (IFN- $\gamma$  1-b) son los producidos actualmente bajo este sistema de expresión. Se ha observado que derivado de la falta de glicosilación tiene una vida media corta cual limita su eficacia, la solubilidad, la resistencia a proteasas y la producción es costosa debido a la formación de cuerpos de inclusión y a la contaminación por endotoxinas (Curling et al. 1990).

Debido a esta problemática se ha explorado una producción más rentable en los sistemas eucarióticos como levaduras (*Pichia pastoris*), protozoos (*Leishmania sp.*) y células de mamíferos, por ejemplo, CHO, HEK293, mieloma murino (NS0, Sp2/0), etc. (**Tabla 1**). Obteniendo mejores resultados hasta la fecha en los sistemas de expresión de mamíferos aumentando productividad, mayor similitud con el IFN- $\gamma$  nativo en la glicosilación y la proteína plegable (Razaghi et al. 2017).

**Tabla 1. Producción de IFN- $\gamma$  en diferentes sistemas de expresión.**

Sistema de expresión	Producción (mg/L)	Peso molecular en monómero (KDa)	Referencia
Homo sapiens (Cultivo de tejido humano)	6	*	(Timo Sareneva et al. 1996)
Glándula mamaria de ratón ( <i>Mus spp.</i> )	23X10 <sup>-6</sup> 350-570	20-25	(Lagutin et al. 1999)
<i>E. coli</i>	1700	17	(Arbabi et al. 2003)
<i>Bacillus sp.</i> (bacteria)	2-20	17	(Rojas Contreras et al. 2010)
<i>Leishmania sp.</i> (protozoo)	9.5	17	(Davoudi et al. 2011)
<i>Pichia pastoris</i> (levadura)	1-1.6X10 <sup>-3</sup>	*	(Razaghi et al. 2017)
<i>Spodoptera spp./ Baculovirus</i>	2	18-23	(Razaghi et al. 2017)
Células de ovario de hámster chino (CHO) ( <i>Cricetulus sp.</i> )	10-15	20-26	(Farges et al. 2008)
Hek293	0.62-1.66	*	(Román et al. 2018)

\*Dato no publicado.

Aunque cada sistema de expresión eucariótica produce una proteína biológicamente activa *in vitro*, la estructura de los oligosacáridos que se añaden al polipéptido IFN- $\gamma$  durante el proceso de glicosilación varía significativamente con el tipo de célula (Timo Sareneva et al. 1996). Existen diversos problemas con el tipo de glicosilación, ya que se sabe que al no ser similar a la proteína humana, induce potencialmente inmunogenicidad y afecta la estabilidad (Lalonde and Durocher 2017). Por ejemplo, la alta manosa del IFN- $\gamma$  expresado en levadura y en células de insecto tienen una vida media más corta y genera alta inmunogenicidad *in vivo* debido a la generación de anticuerpos neutralizantes (Demain and Vaishnav 2009).

Por lo general, las proteínas recombinantes expresadas en las células CHO son las que más se parecen a las proteínas humanas naturales. Sin embargo, existen diferencias en la estructura del N-glicano de IFN- $\gamma$  expresada ya que pueden darse diferencias en el contenido de ácido siálico de las glicoproteínas que pueden dar lugar a amplias diferencias de carga y a tasas de eliminación alteradas *in vivo*, debido a receptores específicos en el hígado que reconocen las asialoglicoproteínas (Farges et al. 2008). Por ello se han hecho investigaciones para producir dicha proteína en células de origen humano las HEK293, ya que por su propia naturaleza el patrón de glicosilación sería similar a la proteína nativa, sin embargo, la producción es baja comparada con las células CHO. En las últimas décadas investigadores han centrado sus estudios en mejorar la producción en estos sistemas controlando desde la temperatura, pH, nutrientes, CO<sup>2</sup> o recurriendo a sistemas de expresión estable (del Solar et al. 1998; Razaghi, Owens, and Heimann 2016).

### **2.2.1. Producción de rIFN- $\gamma$ dentro del grupo de trabajo del laboratorio 7 de biotecnología farmacéutica de la facultad de farmacia.**

El grupo de trabajo del laboratorio se ha centrado en producir la proteína IFN- $\gamma$  recombinante en diversos sistemas de expresión de manera transitoria. Por otra se ha evaluado de su efecto anticancerígeno en líneas celulares modelo de cáncer.

En el año 2014 Romero-Martínez reportó la generación de vectores que expresan interferón gamma en células humanas, realizó la construcción molecular del plásmido pVAX/IFN- $\gamma$  y el vector pAd5/IFN- $\gamma$  los cuales contenían el transgen codificante (501 pb) para posteriormente expresar de manera transitoria en células HEK 293 A549 y C33A

demostrando la capacidad de promover la expresión de esta citocina en cultivos de células cancerígenas (Romero-Martínez 2014).

En el año 2017 García-López utilizó el vector adenoviral pAd5/IFN- $\gamma$  para transducir en la línea celular A549 en donde confirmó la transcripción de ARNm específicos para ese gen, así como la expresión del interferón gamma humano obteniendo concentraciones de 5.33 pg/mL (García-López 2017). Este mismo año Sánchez-Pacheco demostró que en la línea celular MCF-7 utilizando el mismo vector a una MOI de 30 se produce la proteína de IFN- $\gamma$  obteniendo concentraciones de 18.67 pg/mL (Sánchez-Pacheco 2017).

Sosa-García en su tesis de maestría utilizó el sistema HEK293/AD5-IFN- $\gamma$  para optimizar la expresión de la proteína obteniendo así 19.2 pg/mL a una MOI de 5, siendo esta la concentración más alta obtenida en un sistema transitorio (Sosa-García 2018).

### III. JUSTIFICACIÓN.

La elección de los sistemas de expresión de proteínas para uso humano es crucial, ya que este tiene gran influencia en la calidad y cantidad de proteína recombinante obtenida. Durante la producción de glicoproteínas, tal como el interferón (IFN- $\gamma$ ) humano es imprescindible la selección del sistema productor, ya que esta citocina contiene dos sitios potenciales de glicosilación importantes para su estructura y función, brindándole a la proteína mayor estabilidad y por ende mayor tiempo de vida media en torrente sanguíneo.

Actualmente, existen diversos sistemas de expresión los cuales presentan ciertas características que los hacen atractivos durante su elección. Los dos sistemas de expresión más utilizados son las células bacterianas y las de mamífero, sin embargo, a diferencia de las bacterias las células animales son los hospederos de elección para la producción de glicoproteínas, debido a que son capaces de secretar el producto al medio de cultivo, generan modificaciones postraduccionales complejas y realizan un plegamiento correcto de las proteínas, lo cual influye en la estabilidad y bioactividad (función) de las moléculas.

La línea celular CHO es la más utilizada en la producción comercial a gran escala, donde se produce alrededor del 70% de los biofármacos que se encuentran en el mercado. Su éxito generalizado se debe a su inigualable adaptabilidad, usándose generalmente en la expresión estable o constitutiva de glicoproteínas, ya que estos sistemas permiten caracterizar la función y estructura de las proteínas recombinantes complejas.

Dentro del grupo de trabajo se han utilizado diversos sistemas de expresión transitoria, utilizando el adenovirus pAd5/IFN- $\gamma$  en células HEK 293 A549 y MCF7 a diferentes MOI para producir la proteína IFN- $\gamma$  obteniendo bajas concentraciones de ésta. Por ello, a través de este proyecto, se generó una línea celular CHO-S que expresa de manera constitutiva la proteína IFN- $\gamma$  humano.

#### **IV. HIPÓTESIS.**

El sistema CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$  tiene la capacidad de expresar de manera estable la proteína de IFN- $\gamma$ .

#### **V. OBJETIVOS.**

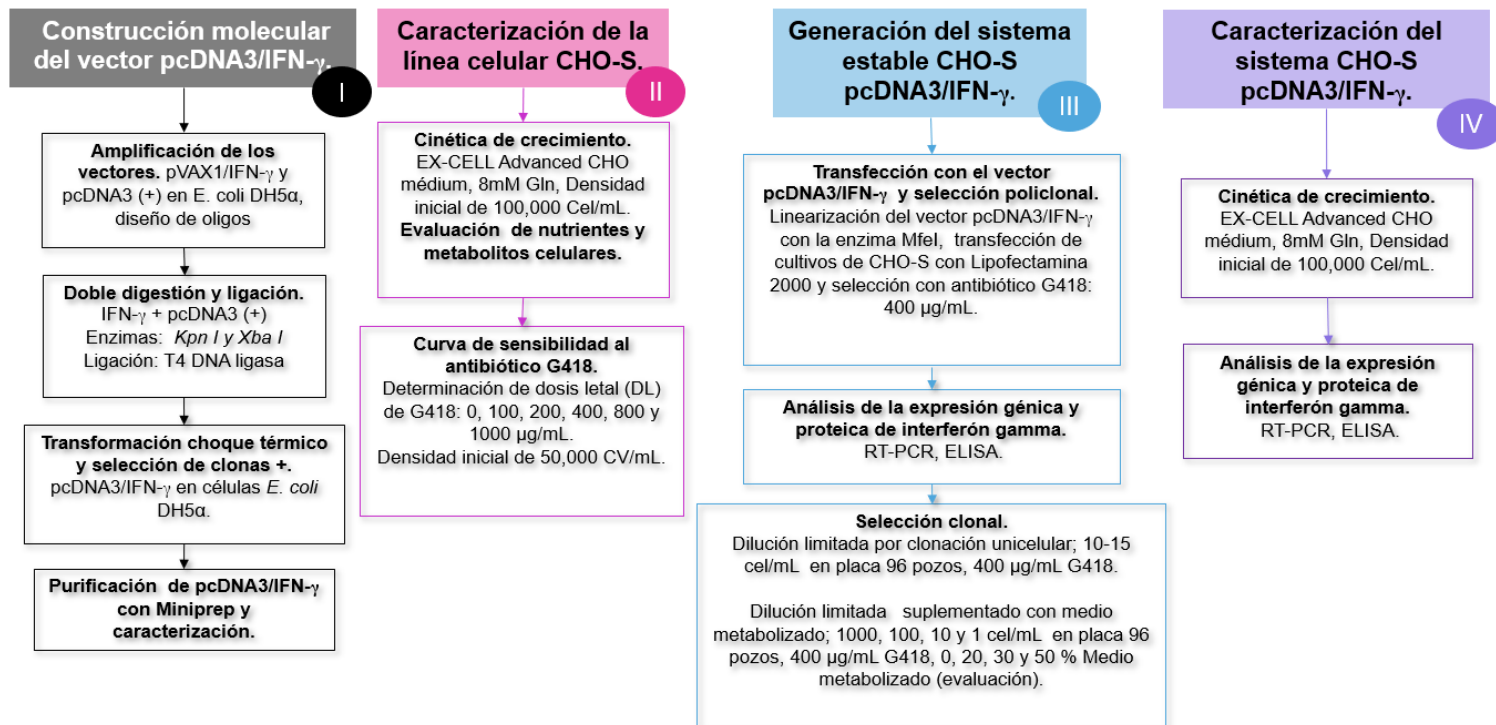
- **Objetivo general:**

Generar y caracterizar el sistema de expresión estable CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$  para la producción de la proteína interferón gamma y así obtener una mayor productividad en comparación con sistemas de expresión de transitoria.

- **Objetivos específicos:**

1. Realizar el diseño, construcción y amplificación molecular del vector de expresión pcDNA3/IFN- $\gamma$ .
2. Caracterizar la línea celular CHO-S mediante cinéticas de crecimiento, evaluación de metabolitos celulares y evaluación de la concentración letal con el antibiótico G418.
3. Generar una línea CHO-S estable que contenga de manera constitutiva el gen del interferón gamma mediante selección policlonal y selección clonal con el antibiótico G418 para obtener un banco celular de CHO-S que exprese la proteína.
4. Analizar la expresión de la proteína de interés mediante RT-PCR y ELISA.

## VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.



## VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 7.1. Características de los plásmidos.

#### 7.1.1. Plásmido pVAX1/IFN- $\gamma$ .

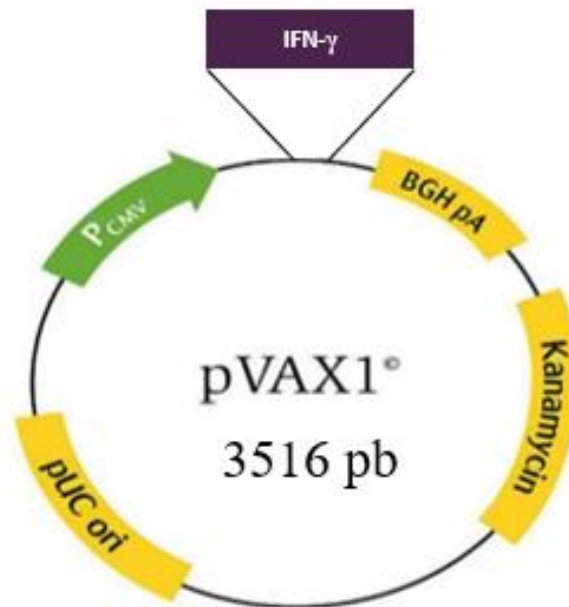


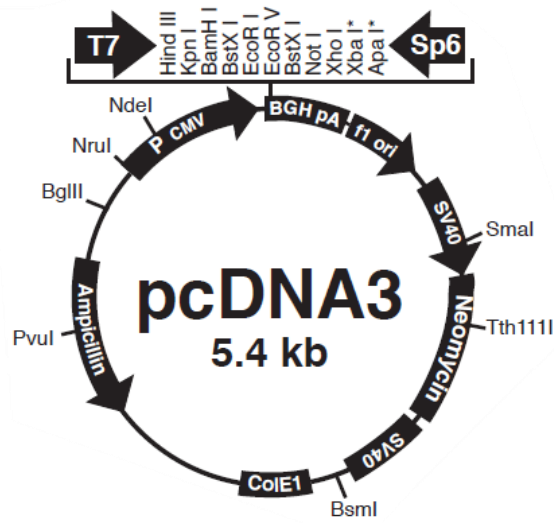
Figura 6. Plásmido pVAX1/IFN- $\gamma$ .

pVAX1/IFN- $\gamma$  es un vector transitorio de 3516 pb que contiene insertado el cADN del gen que codifica para la proteína interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) con un tamaño de 501 pb. Esta construcción fue realizada por Romero-Martínez (2014). Las características de este vector incluyen:

Contiene un gen del promotor CMV; un sitio del oligo del promotor T7; un sitio múltiple de clonación; una señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento bovino (BGH), para eficientar la terminación de la transcripción y de poliadenilación del ARNm; un gen de resistencia a kanamicina; y, un sitio de replicación bacteriano (origen pUC).



### 7.1.2. Plásmido pcDNA3 (+).



**Figura 7. Plásmido pcDNA3 (+).**

El pcDNA3 (+) fue donado por el Dr. Oscar Peralta Zaragoza del CISEI-INSP. Es el plásmido base utilizado para la construcción molecular con el gen IFN- $\gamma$  con un peso molecular de 5.4 kb. Consta de un promotor de citomegalovirus humano (CMV) constitutivo de alto nivel de expresión de genes para células animales; un promotor T7 conveniente para la expresión de genes en bacterias; un sitio múltiple de clonación, la cual permite insertar el gen de interés y facilita su clonación; una señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento bovino [(BGH), para eficientar la terminación de la transcripción y de poliadenilación del ARNm]; un gen de resistencia a ampicilina para selección clonal en bacterias; un gen de resistencia a la neomicina para selección clonal en células animales; un origen f1, permite el rescate de ADN de una sola cadena; un promotor temprano SV40, permite una expresión eficiente y de alto nivel del gen de resistencia a la neomicina y replicación episomal en células que expresan el antígeno T SV40; origen pUC, el cual es el sitio de replicación bacteriano.

### 7.1.3. Amplificación de plásmidos.

Con la finalidad de tener suficiente cantidad de plásmido para los experimentos subsiguientes, estos se amplificaron utilizando células bacterianas *E. coli* DH5 $\alpha$  ya transformadas con ambos plásmidos, por lo que se reactivaron en cajas Petri con medio de cultivo Luria-Bertani [LB (Idgplc, No. Cat 074692)] con antibiótico (Kanamicina 50  $\mu$ g/mL para el plásmido pVAX1/IFN- $\gamma$  o ampicilina 100  $\mu$ g/mL para el plásmido pcDNA3 (+)). Se

incubaron a 37 °C por 24 h. Al día siguiente se realizó una segunda selección de colonias, resemebrando en placas nuevas. Finalmente, las cajas se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior.

#### **7.1.4. Purificación del ADN plasmídico.**

Se seleccionaron 5 colonias de cada plásmido y se inocularon en 5 mL de medio LB con antibiótico, se incubaron a 37 °C a 200 rpm durante 12 h. Se colocaron 200 µL del precultivo en 6 mL de medio LB con antibiótico y se incubó bajo las mismas condiciones. Finalmente, se purificó el ADN plasmídico de acuerdo con el protocolo por kit comercial: “GeneJET Plasmid Miniprep Kit” (Thermo Fisher Scientific, No. Cat K0503).

Este método permitió separar eficientemente el ADN plasmídico de *E. coli* DH5α mediante lisis alcalina. A continuación, se describen brevemente el protocolo utilizado:

##### **“GeneJET Plasmid Miniprep Kit”.**

Se centrifugaron 5 mL del cultivo bacteriano por 30 s a 10, 000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 250 µL de la solución “Resuspension Solution”. Se añadieron 250 µL de “Lysis Solution” y se mezcló por inversión de 4-6 veces. Se añadieron 350 µL de “Neutralization Solution” frío, mezclando completamente. Se invirtió la muestra de 4 a 6 veces para asegurar la completa neutralización y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min. Se transfirió el sobrenadante (~900 µL) en la “Thermo Scientific GeneJET Spin Column” evitando perturbar el sedimento. Se colocó la columna en un tubo colector y se centrifugó por 1 min. Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 500 µL de “Wash solution” a la columna. Se centrifugó 30 s y se realizó un segundo lavado de la columna adicionando nuevamente 500 µL de “Wash solution” centrifugando por 30 s. Se transfirió la columna a un nuevo tubo eppendorf estéril y se adicionaron 40 µL del “Elution Buffer” directamente a la matrix de la columna dejando reposar el buffer durante 2 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó por 2 min para eluir el ADN y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

#### **7.1.5. Cuantificación del ADN plasmídico.**

Después de la purificación de las muestras de ADN, se cuantificó su concentración y pureza usando el equipo “The Thermo Scientific NanoDrop 2000 Spectrophotometer”.

Para dicha medición se tomaron alícuotas de 2 µL de ADN y las lecturas se registraron en unidades de concentración: ng/ µL. También se tomó la lectura de la relación ADN/proteínas: 260/280 nm, y los valores de la relación ADN/sales: 260/230 considerando

que los valores óptimos obtenidos son: ~1.8 y 1.8-2.2 para proteínas y sales, respectivamente.

### 7.1.6. Análisis de restricción.

Para verificar que el ADN del plásmido pcDNA3 (+) purificado fuera el deseado se realizó un ensayo de restricción. Para lo cual se utilizó la endonucleasa FastDigest *Bam*HI. A continuación, se presenta la enzima utilizada con sus respectivos sitios de corte:



Todas las reacciones enzimáticas se trataron de la misma manera. Las condiciones empleadas se muestran en la **Tabla 2**. Una vez que fueron colocados todos los componentes de la reacción, ésta se incubó a 37 °C durante 5 min para finalmente verificar el tamaño de los fragmentos resultantes mediante electroforesis en gel de agarosa.

**Tabla 2. Condiciones de digestión enzimática.**

Componente	[Final]	Volumen
Buffer de la enzima 10x	1X	2.0 µL
ADN (0.5- 1 µg/µL)	1.0 µg	2.0 µL
Enzima 10 U/µL	0.5 U	2.0 µL
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	hasta 20 µL	14 µL

### 7.1.7. Electroforesis en gel de agarosa.

Se prepararon geles al 1 % de agarosa (Promega No. Cat V3121) en un volumen final de 24.5 mL de agua destilada. A la mezcla disuelta se le adicionaron 0.5 mL de TAE 50 X (242 g/L Tris base, 57.1 mL/L HCH<sub>2</sub>COOH glacial, 100 mL/L EDTA 0.5 M pH 8.0) y 1 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL). La mezcla se solidificó en el soporte de la cámara de electroforesis. Finalmente, se agregó solución de buffer TAE 1X en la cámara y se cargaron las muestras en cada pozo. En el primer pozo se colocaron 2 µL de marcador de peso molecular (MPM, "O'Gene Ruler 1 kb ADN Ladder", Fermentas No. Cat SM1163). El gel corrió en una cámara de electroforesis horizontal (Accesolab, No. Cat 0030401) a 80 Volts,

150 mA de 1-1:15 h. Transcurrido el tiempo, se reveló el gel con ayuda de un transiluminador (Bio-Rad, ChemiDocXRS No. Cat 1708070).

## 7.2. Construcción molecular del vector de expresión pcDNA3/IFN- $\gamma$ .

### 7.2.1. Amplificación del gen IFN- $\gamma$ mediante PCR a partir del plásmido pVAX1/IFN- $\gamma$ .

Utilizando programas como Snapgene y OligoCalc se diseñaron oligonucleótidos específicos que permitieran la liberación y amplificación del cADN de IFN- $\gamma$  con un tamaño de 520 pb a partir del plásmido pVAX1/IFN- $\gamma$  insertando a los extremos los sitios de reconocimiento para las enzimas *KpnI* para el oligonucleótido Forward y *XbaI* para el oligonucleótido Reverse seleccionándose de acuerdo con el sitio múltiple de clonación de plásmido base. A continuación, se muestra la secuencia del cADN de IFN- $\gamma$  con el diseño de las secuencias de las enzimas y los oligonucleótidos diseñados de acuerdo con la secuencia del gen:

GGTACCGATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTTTTCAGCTCTGCATCTTTT  
GGGTTCTCTTGGCTGTTACTGCCAGGACCCATATGTAAAAGAAGCAGAAAA  
CCTTAAGAAATATTTTAATGCAGGTCATTCAGATGTAGCGGATAATGGA  
CTTTTCTTAGGCATTTTGAAGAATTGGAAAGAGGAGAGTGACAGAAAAATAA  
TGCAGAGCCAAATTGTCTCCTTTTACTTCAAACCTTTTAAAACTTTTAAAGAT  
GACCAGAGCATCCAAAAGAGTGTGGAGACCATCAAGGAAGACATGAATGTC  
AAGTTTTTCAATAGCAACAAAAAGAAACGAGATGACTTCGAAAAGCTGACTA  
ATTATTCGGTAACTGACTTGAATGTCCAACGCAAAGCAATACATGAACTCAT  
CCAAGTGATGGCTGAACTGTCGCCAGCAGCTAAAACAGGGAAGCGAAAAAG  
GAGTCAGATGCTGTTTCGAGGTCGAAGAGCATCCCAGTAATCTAGA

**Figura 8. Secuencia del cADN del gen IFN- $\gamma$ .** El cADN de la proteína IFN- $\gamma$  consta de 501 pb. En azul se encuentra la secuencia de reconocimiento de la enzima *KpnI* y en color morado la secuencia de reconocimiento a la enzima *XbaI*.

**Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para amplificar el transgen de IFN- $\gamma$ .**

Nombre	Secuencia del oligonucleótido	Tm	%	No.
			GC	nucleótidos
FwdIFN-g-Kpn I	5'>CGCGGTACCGATGAAATATACAAGTTATATC<3'	67.92	39	31
RevIFN-g-Xba I	5'>CTATCTAGACTTGGGATGCTCTTCGAC<3'	69.12	45	29

Se mandaron sintetizar los oligonucleótidos diseñados al laboratorio especializado de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN (USSDNA) del IBT-UNAM.

### 7.2.1.1. PCR gradiente para determinar la Tm ideal.

Se realizó un PCR gradiente en punto final para determinar la temperatura óptima de alineamiento, utilizando 7 temperaturas diferentes de alineamiento; 53°C, 55.3°C, 58.5°C, 61°C, 63°C, 64°C, y 65.6°C. Para lo cual se preparó una mezcla como se muestra en la **Tabla 4**, utilizando el mix de DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, No. Cat K1071). Las condiciones de PCR empleadas se muestran en la **Tabla 5**.

**Tabla 4. Condiciones de reacción para determinar la Tm en PCR.**

Componente	[Final]	Volumen
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	0.2 mM	5.0 µL
Cebador Sentido 2.5 µM	0.5 µM	0.2 µL
Cebador Antisentido 2.5 µM	0.5 µM	0.2 µL
Templado de ADN	10 µg – 1 µg	-----
Agua libre de nucleasas	hasta 10 µL	Hasta 10 µL

**Tabla 5. Condiciones para la PCR en la determinación de la Tm.**

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	30 s	
Alineamiento	Gradiente	30 s	30
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	5 min	1

Se determinó la Tm ideal y el tamaño del gen amplificado mediante un gel de agarosa al 1 % como se describe en la sección 7.2.4. Posteriormente, se prepararon 10 reacciones más de PCR como se describió anteriormente y se amplificaron para después purificarse el segmento de interés a partir de geles de agarosa como se describe a continuación.

### 7.2.1.2. Purificación del gen IFN-γ a partir de geles de agarosa.

Con la finalidad de eliminar los posibles remanentes de la reacción de PCR, se purificó el fragmento amplificado del gen IFN-γ a partir del gel de agarosa. Esta etapa se realizó con

el kit comercial “Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit” (Zymo research corp, No. Cat D40015). El procedimiento empleado se describe brevemente:

Se cortó el fragmento de agarosa que contenía el segmento en ~520 pb con ayuda de un bisturí quirúrgico y de luz UV. Se añadieron tres volúmenes del buffer ADB™ por cada volumen de agarosa escindida. Se incubó a 55 °C por 10 min a 500 rpm. Después, se transfirió la solución a la columna Zymo-Spin™. Se centrifugó a 16 000 g durante 30 seg, se descartó el sobrenadante y se añadieron 200 µL de buffer de lavado a la columna. Se centrifugó a 16,000 g por 30 seg y se repitió el paso de lavado. Se colocó la columna dentro de un tubo eppendorf nuevo y se añadieron 15 µL de agua libre de nucleasas directamente a la matrix de la columna. Se incubó durante 1 min y se centrifugó a 16,000 g por 60 seg para eluir el ADN.

Se cuantificó la concentración de ADN obtenida, como se describe en la sección 7.1.5. Finalmente, se almacenó el ADN a -20 °C hasta su posterior uso.

### 7.2.2. Reacción de doble digestión del plásmido pcDNA3 (+) y del fragmento IFN-γ.

Para realizar la construcción mediante la unión del plásmido pcDNA3 (+) con el fragmento IFN-γ fue necesario hacer la doble digestión enzimática antes de llevar a cabo la reacción de ligación. Para ello, se utilizaron las enzimas *KpnI* y *XbaI*. La estrategia que se siguió se detalla a continuación:

Se prepararon tubos con las condiciones y cantidades mostradas en la Tabla 6. Se incubó cada tubo a 37 °C durante 4 horas. Al término del tiempo, se tomó una alícuota de 4 µL de cada tubo y el producto se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 7.2.4). Además, se adicionó a cada tubo la misma cantidad de la siguiente enzima y su buffer. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 4 horas, de tal manera que ambas enzimas reaccionaran de manera individual en el mismo tubo de reacción. Posteriormente, se corrió un gel de agarosa con el producto de la reacción.

**Tabla 6. Condiciones para la reacción de doble digestión.**

Tubos con IFN-γ		
Componente	[Final]	Volumen
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	hasta 20 µL	6.0 µL
Buffer de la enzima 10x	1X	2.0 µL

ADN	1.0 $\mu\text{g}$	10 $\mu\text{L}$
Enzima 10 U/ $\mu\text{L}$ (tubo 1-KpnI, tubo 2-XbaI)	0.5 U	2.0 $\mu\text{L}$
<b>Tubos con pcDNA3 (+)</b>		
Componente	[Final]	Volumen
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	hasta 20 $\mu\text{L}$	15 $\mu\text{L}$
Buffer de la enzima 10x	1X	2.0 $\mu\text{L}$
ADN	1.0 $\mu\text{g}$	1.0 $\mu\text{L}$
Enzima 10 U/ $\mu\text{L}$ (tubo 1-KpnI, tubo 2-XbaI)	0.5 U	2.0 $\mu\text{L}$

Una vez terminada la reacción de doble digestión, se purificó el ADN mediante extracción fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Finalmente, se cuantificó el ADN (sección 7.1.5). A continuación, se describen brevemente el protocolo utilizado para la purificación:

#### **Extracción fenol/cloroformo/alcohol isoamílico.**

A cada muestra se le adicionaron 80  $\mu\text{L}$  de buffer TE o se llevaron a un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezclaron gentilmente y se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 min a 4°C para separar 2 fases (fase acuosa y fase orgánica). En un tubo eppendorf se separó la fase acuosa (fase superior) y se descartó la fase orgánica. A la fase acuosa se le adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de etanol al 95 %, 25  $\mu\text{L}$  de NH<sub>4</sub>Oac 10 M y 1  $\mu\text{L}$  de glicógeno (20 mg/mL). Se mezcló ligeramente y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se cubrió cuidadosamente el pellet con 300  $\mu\text{L}$  de etanol al 70 % y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C. Se aspiró el sobrenadante cuidando de no tocar el pellet y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por aproximadamente 15 min. Se resuspendió el pellet en 15  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y se almacenó a -20°C.

#### **7.2.3. Reacción de ligación.**

Una vez purificados los productos de ADN, se realizó una reacción de ligación del plásmido pcDNA3 (+) y el gen IFN- $\gamma$ . El protocolo para la reacción de ligación se describe a continuación:

Primeramente, se realizó un cálculo para conocer la concentración de vector e inserto con ayuda del software “BioMath Calculators Molar Ratio of Insert to Vector” de Promega disponible en <http://www.promega.com>. Para ello se empleó la ecuación base

$$\frac{kb \text{ del inserto}}{kb \text{ del vector}} * ng \text{ del vector} = ng \text{ del inserto (relación 1:1)}$$

Posteriormente, se agregaron al tubo de reacción los componentes de la **Tabla 7**, los cuales se incubaron a 4 °C durante 12 h.

**Tabla 7. Condiciones para la reacción de ligación.**

Componente	[Final]	Volumen
ADN del vector lineal	100 ng	
ADN inserto IFN- $\gamma$	1:5 relación molar vector: inserto	0.2 $\mu$ L
Buffer de la ligasa 10xT4	1X	2.0 $\mu$ L
Enzima LigasaT4 5 U/ $\mu$ L	0.5 U	2.0 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	hasta 20 $\mu$ L	Hasta 20 $\mu$ L

#### 7.2.4. Células bacterianas quimiocompetentes.

Se prepararon células bacterianas *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes, mediante un tratamiento con CaCl<sub>2</sub>. A continuación se describe el protocolo utilizado:

Se inocularon 5 mL de medio LB líquido con células *E. coli* DH5 $\alpha$  tomadas de un vial almacenado a -70 °C. Este preinóculo, se incubó a 37 °C toda la noche con una agitación de 150 rpm. Al día siguiente, se inocularon 50 mL de medio LB con 500  $\mu$ L del preinóculo y el cultivo se monitoreó hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 0.4-0.6, valor que se alcanzó en 4 h aproximadamente. Se centrifugó el cultivo a 2000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 20 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío. Se incubó el cultivo a 4 °C durante 90 min. Se centrifugó el cultivo por 10 min a 2000 rpm a 4 °C, se decantó el sobrenadante, se agregaron 2 mL de CaCl<sub>2</sub> frío y se adicionó 1 mL de glicerol estéril frío al 50%. Se alicuotaron 100  $\mu$ L de esta mezcla en tubos eppendorf y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

#### 7.2.5. Transformación bacteriana.

Se amplificaron los plásmidos de interés mediante transformación de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes. El protocolo utilizado se describe a continuación:



Se descongeló un vial de 100  $\mu\text{L}$  de células bacterianas *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes en hielo y a continuación se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de plásmido. La mezcla se incubó en hielo durante 20 min. Posteriormente, se dio un choque térmico a 42  $^{\circ}\text{C}$  por 90 s y se incubó en hielo por 4 min. Después se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de medio LB sin antibiótico y se incubó el cultivo a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 1 h a 150 rpm. Finalmente, se plaqueó el cultivo distribuyendo 200  $\mu\text{L}$  en cajas con medio LB sólido con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

En todos los casos se realizó una segunda selección de las colonias positivas, tomando una colonia obtenida de la transformación y sembrándola nuevamente en placa Petri con antibiótico (de acuerdo con lo descrito anteriormente).

Además, se prepararon cajas como controles de crecimiento, es decir, como control positivo se sembraron bacterias en medio de cultivo LB carente de antibiótico y como control negativo se sembraron bacterias en LB adicionado con antibiótico. Se incubaron las cajas plaqueadas a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 12 h. Al día siguiente se realizó una segunda selección de colonias, resembrando en placas nuevas. Finalmente, las cajas se almacenaron a 4 $^{\circ}\text{C}$  hasta su uso posterior.

### 7.2.6. PCR de colonias.

Con la finalidad de verificar que las colonias que crecieron en la placa fueran positivas para el gen de interés, se realizó una reacción de PCR, que amplifica el gen del IFN- $\gamma$  utilizando los oligonucleótidos de la sección 7.2.1. Para lo cual se preparó una mezcla como se muestra en la **Tabla 8**. Las condiciones de PCR empleadas se muestran en la **Tabla 9**.

**Tabla 8. Condiciones de reacción para el PCR de colonias.**

Componente	[Final]	Volumen
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	0.2 mM	5.0 $\mu\text{L}$
Cebador Sentido 2.5 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{M}$	0.2 $\mu\text{L}$
Cebador Antisentido 2.5 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{M}$	0.2 $\mu\text{L}$
Templado de ADN	10 $\mu\text{g}$ – 1 $\mu\text{g}$	-----
Agua libre de nucleasas	hasta 10 $\mu\text{L}$	Hasta 10 $\mu\text{L}$

**Tabla 9. Condiciones para el PCR de colonia.**

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	30 s	
Alineamiento	64	30 s	30
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	5 min	1

### 7.2.7. Amplificación de colonias positivas y purificación del plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ .

Una vez seleccionadas las colonias positivas para IFN- $\gamma$  mediante PCR, se amplificaron en medio LB líquido de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Se inoculó parte de la colonia seleccionada en 5 mL de medio LB con antibiótico (ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubó a 37 °C a 200 rpm durante 12 h. Se colocaron 200  $\mu\text{L}$  del precultivo en 6 mL de medio LB con antibiótico y se incubó bajo las mismas condiciones. Finalmente, se purificó el ADN plasmídico mediante el kit de Miniprep (Thermo Fisher Scientific, No. Cat. K0503). Además, se obtuvo un banco celular con *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas: se mezclaron 200  $\mu\text{L}$  de glicerol frío y estéril al 50% en 200  $\mu\text{L}$  del cultivo y se almacenaron a -70 °C hasta su uso posterior. Se cuantificó el ADNp mediante espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop 2000.

#### “GeneJET Plasmid Miniprep Kit”.

Se centrifugaron 5 mL del cultivo bacteriano por 30 s a 10, 000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de la solución del buffer “Resuspension Solution”. Se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de buffer de Lysis Solution y se mezcló por inversión de 4-6 veces. Se añadieron 350  $\mu\text{L}$  de buffer “Neutralization Solution” frío, mezclando completamente. Se invirtió la muestra de 4 a 6 veces para asegurar la completa neutralización y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min. Se transfirió el sobrenadante (~900  $\mu\text{L}$ ) en la “Thermo Scientific GeneJET Spin Column” evitando perturbar el sedimento. Se colocó la columna en un tubo colector y se centrifugó por 1 min. Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  del “Buffer Wash solution” a la columna. Se centrifugó 30 s y se realizó un segundo lavado de la columna adicionando nuevamente 500  $\mu\text{L}$  del “Buffer Wash solution” centrifugando por

30 s. Se transfirió la columna a un nuevo tubo eppendorf estéril y se adicionaron 40  $\mu$ L del “Elution Buffer” directamente a la matrix de la columna dejando reposar el buffer durante 2 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó por 2 min para eluir el ADN y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Posteriormente, para obtener mayor cantidad de plásmido para los experimentos subsecuentes se realizó una purificación mediante el kit de Plasmid Maxi Kit (QIAGEN®, No. Cats. 12162, 12163 y 12165).

#### “QIAGEN® Plasmid Maxi Kit”.

Se inoculó parte de la colonia seleccionada en 120 mL de medio LB con antibiótico (ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  a 200 rpm durante 12 h. Se centrifugó el inóculo del cultivo bacteriano por 15 min a  $6000 \times g$  a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Se descartó el sobrenadante y el pellet se re suspendió en 10 ml del buffer P1. Se añadieron 10 ml del buffer P2 y se mezcló por inversión de 4-6 veces y se incubó a temperatura ambiente ( $15-25^{\circ}\text{C}$ ) durante 5 min. Se añadieron 10 ml buffer P3 preenfriado y se mezcló por inversión de 4-6 veces y se incubó en hielo por 20 min. Se centrifugó a  $20,000 \times g$  por 1 h a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . EL sobrenadante se pasó a otro tubo y se re centrifugó a  $20,000 \times g$  por 30 min a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Se equilibrio la columna QIAGEN-tip500 con 10 mL del buffer QBT. Colocar el sobrenadante en la membrana equilibrada y dejar que se vacíe por gravedad. Se lavó dos veces la columna con 30 mL de buffer QC. Se eluyó el ADN con 15 mL del buffer QF en un tubo de 15mL. Se precipitó el ADN con 10.5 ml de isopropanol y se centrifugó a  $15,500 \times g$  por 30 min a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet agregando 5 mL de etanol al 70%, se centrifugó a  $15,500 \times g$  por 10 min a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por 5 min. Finalmente, el pellet se resuspendió en 2 mL de buffer TE y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### 7.2.8. Ensayo de restricción y PCR.

Para comprobar el tamaño de la construcción pcDNA3/IFN- $\gamma$  se realizó un análisis de restricción utilizando la enzima *KpnI*. Las condiciones empleadas se muestran en la **Tabla 10**. Una vez colocados todos los componentes de la reacción, esta se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 5 h para finalmente verificar el tamaño de los fragmentos resultantes mediante electroforesis en gel de agarosa.

**Tabla 10. Condiciones de digestión enzimática.**

Componente	[Final]	Volumen
Buffer de la enzima 10x	1X	2.0 µL
ADN (0.5- 1 µg/µL)	1.0 µg	2.0 µL
Enzima 10 U/µL	0.5 U	2.0 µL
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	hasta 20 µL	14 µL

Por otro lado, para corroborar que el gen se encontraba insertado se realizó un PCR para amplificar una sección de 520 pb correspondientes al gen de interés. Para lo cual se preparó una mezcla como se muestra en la **Tabla 11**, utilizando el mix de DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, No. Cat K1071). Las condiciones de PCR empleadas se muestran en la **Tabla 12**.

**Tabla 11. Condiciones de reacción en PCR para la identificación del gen de IFN-γ.**

Componente	[Final]	Volumen
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	0.2 mM	5.0 µL
Cebador Sentido 2.5 µM	0.5 µM	0.2 µL
Cebador Antisentido 2.5 µM	0.5 µM	0.2 µL
Templado de ADN	10 pg – 1 µg	-----
Agua libre de nucleasas	hasta 10 µL	Hasta 10 µL

**Tabla 12. Condiciones en PCR para la identificación del gen de IFN-γ.**

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	30 s	
Alineamiento	64	30 s	30
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	5 min	1

### 7.2.9. Secuenciación del plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ .

Una vez purificada la construcción del plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ , se preparó una muestra de la siguiente manera para ser enviado a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN (USSDNA) del IBT, UNAM para secuenciación.

Se preparó una mezcla ADN/Oligo, la cual se entregó en un volumen final de 16  $\mu$ l, en un tubo eppendorf de tapa plana de 0.2 ml para PCR, sin anotaciones en la tapa. Dicha mezcla contenía 10 pmolas del Oligonucleótido FwdIFN-g-KpnI para secuenciar y 500 ng del plásmido.

Después de obtener la secuencia de nucleótidos, se realizó un análisis BLAST de la secuenciación para determinar si el transgen insertado correspondía al de interés.

## 7.3. Cultivo de la línea celular CHO-S.

### 7.3.1. Características de la línea celular CHO-S.

La línea celular empleada en el presente trabajo es la CHO-S (Invitrogen, No. Cat. R800-07), es una línea celular estable aneuploide, proveniente de las células CHO-K1 que han sido adaptadas en cultivo a suspensión. La línea celular CHO-K1 deriva de un explante epitelial de tejido de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*). Las células CHO son los hospederos de mamíferos más utilizados para la producción industrial de proteínas terapéuticas recombinantes.

### 7.3.2. Medio de cultivo.

**Mantenimiento:** Se empleó el medio de cultivo EX-CELL® Advanced™ CHO Fed-batch Medium (Merk, NO. Cat. 14366C) estéril, el cual fue alicuotado en tubos de centrifuga de 50 mL. Cada alícuota se suplementó 8 mM de L-Glutamina estéril (Biowest No. Cat. X0550-100).

**Transfección:** Se empleó el medio de cultivo CD FortiCHO™ Medium (ThermoFisher, NO. Cat. A1148301) estéril, el cual fue alicuotado en tubos de centrifuga de 50 mL. Cada alícuota se suplementó 8 mM de L-Glutamina estéril (Biowest No. Cat. X0550-100).

**Selección:** Se empleó el medio de cultivo EX-CELL® Advanced™ CHO Fed-batch Medium (Merk NO. Cat. 14366C) estéril, el cual fue alicuotado en tubos de centrifuga de 50 mL.

Cada alícuota se suplementó 8 mM de L-Glutamina estéril (Biowest No. Cat. X0550-100) y 400 µg/mL de antibiótico Geneticin® (G-418 Sulfate) (ThermoFisher, No. Cat. 10131035).

### **7.3.3. Descongelamiento, mantenimiento y criopreservación celular.**

#### **7.3.3.1. Descongelamiento celular.**

Para iniciar el cultivo celular, se descongeló la línea CHO-S a partir de un criovial preservado a -196 °C en nitrógeno líquido. Empleando el medio de cultivo para mantenimiento mencionado en la sección anterior, se realizó el siguiente protocolo:

El criovial se descongeló a 37°C y se descontaminó con etanol al 70%. Se resuspendió 1 mL de células descongeladas en 10 mL de medio libre de SFB y se centrifugó durante 5 min a 800 rpm. Se retiró el sobrenadante, se adicionaron 4 mL medio de mantenimiento (ver sección 7.3.2) y se colocó la suspensión celular en una caja T (Corning® Flask) 25 cm<sup>2</sup> de cultivo. Se incubó la caja a 37 °C, a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **7.3.3.2. Subcultivo celular:**

Una vez que la confluencia celular alcanzó del 80 al 90%, se subcultivaron las células de acuerdo con el siguiente protocolo:

El contenido celular de las cajas T25 se colocó en un tubo estéril de centrifuga de 15 mL, (NOTA: ya que las células se encontraban en suspensión no fue necesario tripsinizar) se centrifugó 5 min a 900 rpm y se retiró el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1 mL de medio de mantenimiento, del cual se tomó 0.5 mL y se colocaron en una caja T25 completando un volumen de 5 mL con medio de cultivo y se incubó a 37°C, 100 rpm y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **7.3.3.3. Congelamiento celular.**

Para preservar las líneas celulares, una vez alcanzada una confluencia del 90 % se realizó un banco celular de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Se subcultivaron las células como se indica en la sección anterior, pero al final del procedimiento se hizo la siguiente excepción: después de centrifugar se descartó el sobrenadante y se adicionaron 3.6 mL de medio frío por la pared del tubo evitando resuspender el pellet. Se agregaron 0.4 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, No.

Cat. D2650) para tener una concentración final del 10 % de DMSO y se resuspendió suavemente. Se depositó 1 mL de la suspensión celular en crioviales previamente atemperados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Se congelaron los crioviales a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y al final se almacenaron en nitrógeno líquido ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

#### **7.4. Caracterización de la línea celular CHO-S.**

##### **7.4.1. Cinética de crecimiento.**

Se montó una cinética de crecimiento en una placa de 12 pozos con un volumen de medio de 1 mL por pozo bajo las siguientes condiciones: Se utilizó medio EX-CELL® Advanced™ CHO Fed-batch Medium suplementado con 8 mM de L-Glutamina estéril, partiendo de un inóculo inicial de 100,000 CV/mL. Esta se realizó por triplicado durante 10 días, manteniéndose en condiciones de crecimiento ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 100 rpm). Cada 24 h se recogió un pozo, cada mL obtenido de la muestra de cultivo, se centrifugó por 5 min a 1200 rpm. Se separó el sobrenadante en un tubo eppendorf estéril y se guardó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Se determinó la concentración celular viable y total para obtener los parámetros cinéticos: Tiempo de duplicación ( $T_d$ ) y velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) mediante exclusión del colorante azul de tripano.

##### **7.4.2. Conteo y viabilidad celular.**

Para el conteo celular se empleó el método de tinción de exclusión del colorante azul de tripano, cuyo principio se basa en la integridad de la membrana celular para distinguir células muertas de células viables. Las células vivas con la membrana celular intacta no se colorean debido a que la membrana celular es selectiva respecto a qué compuestos pueden atravesarla; mientras que las células muertas, incorporan al AT en el citoplasma debido a la pérdida de selectividad de la membrana plasmática (Strober 2015). Por lo tanto, el número de células viables y no viables se obtiene por microscopía óptica empleando una cámara de Neubauer.

Con base en lo anterior se procedió a realizar el siguiente protocolo:

Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular y se realizó una dilución con azul de tripano (Gibco, Invitrogen No. Cat 15250-061) al 1 % en PBS 1X según fuera requerido (1:2, 1:4,

1:8, 1;10) en un volumen final de 200  $\mu$ L. Se tomaron 20  $\mu$ L de la dilución y se distribuyeron en una cámara de Neubauer para su conteo.

NOTA: Si la cantidad de células sobrepasaba las 200 células se utilizaban diluciones mayores.

El conteo se realizó con ayuda de un microscopio óptico Zeiss-Axiostar y se utilizaron las siguientes ecuaciones para conocer concentración de células totales (CT/mL), células viables (CV/ mL) y el porcentaje de viabilidad celular:

$$\frac{CT}{mL} = \left( \frac{\text{No. células contadas}}{\text{No. cuadrantes}} * 1X10^4 \right) * \text{Factor de dilución}$$

$$\frac{CV}{mL} = \left( \frac{\text{No. células viables}}{\text{No. cuadrantes}} * 1X10^4 \right) * \text{Factor de dilución}$$

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{No. células viables/mL}}{\text{No. células totales/mL}} * 100$$

Para cada muestra, la cuenta se realizó por triplicado (con preparaciones diferentes) a un volumen final de 200  $\mu$ L y los datos se expresaron como los valores de la media y la desviación estándar de la media.

#### **7.4.3. Análisis de nutrientes y metabolitos celulares de la línea celular CHO-S.**

Con el objetivo de monitorear el metabolismo celular normal y post-transfección; se cuantificó la concentración de los nutrimentos (glucosa y glutamina) y desechos metabólicos (lactato y glutamato) en un analizador bioquímico YSI-2950 Life Sciences, por medio de biosensores capaces de reconocer un analito mediante reacciones enzimáticas.

Cada enzima es inmovilizada sobre membranas de policarbonato y acetato de celulosa a través de la cual difunde el sustrato. Cada analito es rápidamente oxidado a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) el cual es electroquímicamente oxidado de manera específica en un ánodo de platino, generando así un flujo de electrones que es proporcional a su concentración y la concentración del sustrato (YSI 2014).

Las reacciones que se llevan a cabo para cada analito son las siguientes:

**D-Glucosa:** La enzima glucosa oxidasa se inmoviliza en la membrana enzimática.





**L-Lactato:** La enzima L-Lactato oxidasa se inmoviliza en la membrana enzimática.



**L-Glutamina:** Dos enzimas son co-inmovilizadas en la membrana enzimática: Glutaminasa y glutamato oxidasa.



**L-Glutamato:** La enzima L-Glutamato Oxidasa se inmoviliza en la membrana enzimática.



Con base en lo anteriormente descrito, para la medición de metabolitos se tomaron en cuenta los siguientes pasos:

Se verificó que el equipo contaba con los estándares de Glucosa/Lactato y Glutamina/Glutamato y que los módulos del equipo YSI estuvieran calibrados. Se descongelaron las muestras (ver sección 7.3.3.1) a temperatura ambiente y se centrifugaron por 5 minutos a 5,000 rpm para que las células aún presentes en él se sedimentaran en el fondo del tubo. Bajo condiciones de esterilidad, se colocó una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  de cada muestra en tubos eppendorf nuevos debidamente identificados (de acuerdo con los tiempos de recolección) y se introdujeron en la placa de 24 pozos del equipo YSI. El equipo se calibró y se programó para leer los analitos de las muestras.

NOTA: En cada ensayo se realizaron tres mediciones para cada analito y los resultados se presentan como la media de la concentración y la desviación estándar de la media.

#### 7.4.4. Curva de sensibilidad al antibiótico G418 de la línea celular CHO-S.

El antibiótico Geneticin (G418) es un aminoglucósido de estructura similar a la gentamicina B1, es un análogo del sulfato de neomicina y tiene un mecanismo similar al de la neomicina (Biotech 2014). Bloquea la síntesis de polipéptidos mediante la inhibición de la etapa de elongación en células procariontas y eucariotas. El G418 se usa comúnmente en la investigación de laboratorio para seleccionar células genéticamente modificadas (Toku-e 2000). Asegura una selección positiva efectiva para células que expresan el gen de

resistencia a la neomicina (neo). La resistencia a G418 es conferida por el gen neo de Tn5 que codifica una aminoglucósido 3'-fosfotransferasa, APT 3'II (Thermo Fisher Scientific Inc. 2015).

Para determinar la concentración de antibiótico G418 que asegurara la muerte de la línea celular CHO-S se realizó el siguiente protocolo:

Se montó una placa de 24 pozos en un volumen de 500  $\mu$ L por pozo bajo las siguientes condiciones: Se utilizó medio EX-CELL® Advanced™ CHO Fed-batch Medium suplementado con 8 mM de L-Glutamina estéril, partiendo de un inóculo inicial de 50,000 CV/mL. Ésta se realizó por triplicado manteniéndose a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 rpm. Pasadas 48 h con una confluencia >80 % de las células, se agregaron cantidades crecientes de G418 en cada pozo por triplicado, utilizando 0, 100, 200, 400, 800 y 1000  $\mu$ g/mL y se mantuvieron por 10 días reemplazando el medio con antibiótico G418 cada 2 días.

Después de los 10 días se obtuvo la viabilidad celular mediante conteo con cámara de Neubauer y la técnica de azul de tripano (Ver sección 7.4.2) para obtener la concentración óptima de antibiótico a la cual todas las células están muertas después de 10 días de selección con G418.

## **7.5. Generación del sistema estable CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$ .**

### **7.5.1. Transfección de las células CHO-S con el plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ y selección policlonal.**

La transfección consistió en introducir el ADN plasmídico (pcDNA3/IFN- $\gamma$ ) a la célula hospedera (CHO-S), mediante la formación de lipocomplejos. En este caso se siguió el método de lipofectamina 2000 (lipofectamina™ 2000 Invitrogen, No. Cat. 11668019) que forma una cubierta lipídica alrededor del ADN para facilitar la entrada a la célula sin provocar alteraciones mayores en ella.

De acuerdo con la literatura y el protocolo del plásmido utilizado en la construcción, para obtener células transfectantes estables el plásmido debe linealizarse antes de ser introducido a la línea celular. Por lo que se utilizó la enzima MfeI (MunI) para linealizar al plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ , la cual realiza un solo corte en el sitio del promotor de CMV. Las condiciones empleadas se muestran en la **Tabla 13**. Una vez colocados todos los

componentes de la reacción, Ésta se incubó a 37 °C durante 5 h para finalmente verificar el tamaño de los fragmentos resultantes mediante electroforesis en gel de agarosa.

**Tabla 13. Condiciones de digestión enzimática para la transfección.**

Componente	[Final]	Volumen
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	hasta 20 µL	16 µL
Buffer G 10x	1X	2 µL
ADN (0.5- 1 µg/µL)	1µg	1 µL
Enzima MnlI	0.5 U	2 µL

Días antes de la transfección se mantuvo una caja T25 con células CHO-S con una confluencia mayor al 85%, el día de la transfección se subcultivó (ver sección 7.3.3.2), se realizó un conteo celular mediante el método de tinción por exclusión de azul de tripano (ver sección 7.4.2) y se montó una placa de 6 pozos, con una densidad de  $0.5 \times 10^6$  células por pozo en 1 mL de medio de transfección; CD FortiCHO™ Medium suplementado con 8 mM de L-Glutamina estéril. Se prepararon los siguientes complejos:

- A.** Se diluyeron 8 µg el ADN plasmídico lineal en 500 µL del medio de transfección y se mezclaron cuidadosamente.
- B.** Se mezclaron 20 µL de Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen, No. Cat 11668-019), con 480 µL de medio de transfección.

Se incubaron ambos complejos por 5 minutos a temperatura ambiente. Se combinó el ADN diluido con la Lipofectamina diluida (volumen final: 1000 µL). Se mezcló suavemente y se incubó por 25 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron gota a gota 500 µL del complejo final a cada pozo, distribuyendo el volumen por la periferia del pozo. Después, se incubó la placa durante 24 h a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100 rpm. Pasadas las 24 h post-transfección se cambió el medio de transfección por medio fresco, 72 h post-transfección se retiró el medio de transfección y se colocó medio de selección; EX-CELL® Advanced™ CHO Fed-batch Medium suplementado con 8 mM de L-Glutamina estéril y 400 µg/mL de antibiótico Geneticin®.

El medio de selección (ver sección 7.3.2) se cambió a periodos regulares de 72-96 horas según como lo indica el protocolo de selección del plásmido pcDNA3 (+) para la creación de líneas celulares estables, dando 6 pases de selección. Durante este periodo de selección

se monitoreo la viabilidad utilizando el método de exclusión del colorante azul de tripano (ver sección 7.4.2).

### **7.5.2. Análisis de la expresión génica y proteica de interferón gamma.**

Posterior a la selección policlonal, se evaluó la capacidad de transgénesis del plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$  en la línea celular CHO-S así como la expresión de la proteína IFN- $\gamma$  realizando los siguientes análisis: RT-PCR para evaluar la transcripción de los genes mediante el análisis de los ARNm; Western blot para identificar la proteína y ELISA para cuantificar la cantidad expresada.

### **7.5.3. Análisis del ARNm de IFN- $\gamma$ mediante RT-PCR.**

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, del inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), proporciona la posibilidad de evaluar la transcripción de genes en células o tejidos, mediante la identificación y amplificación de ARNm (Santos et al. 2004).

Para este proceso se lleva a cabo primeramente la extracción del ARN total de las células en estudio, se copia la secuencia específica de ARNm a una secuencia complementaria llamada ADN complementario (cADN) empleando una enzima transcriptasa reversa (TR), y finalmente se aplica la técnica de PCR para su amplificación y identificación. Siguiendo este principio se verificó que la línea celular CHO-S fue capaz de internalizar el plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$  y generar los transcritos de ARNm realizando la extracción del ARN total de las clonas transfectadas y el control negativo pasado un mes post-transfección y de selección con antibiótico. Para lo cual se emplearon las siguientes etapas:

#### **Etapas 1: Extracción de ARN total.**

Se utilizó el método de purificación con trizol. Las muestras que se utilizaron fueron de pellet obtenidos células de dos clonas de CHO-S transfectadas con pcDNA3/IFN- $\gamma$  y una clona sin transfectar (Control negativo). Se lavaron los pellets dos veces con 200  $\mu$ L de PBS 1X estéril y frío (4 °C) y se centrifugaron a 1,200 rpm durante 2 min. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 1000  $\mu$ L TRI Reagent® (ZYMO Research No. Cat. R2050-1-50) a cada muestra, se incubaron a 4 °C por 5 min. Se añadieron 200  $\mu$ L de cloroformo (IBI Scientific No Cat IB05040) y se resuspendieron suavemente. Se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 4 °C por 15 min a 12,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804-R, Rotor F-34-6-38). Se recuperó la fase acuosa (fase superior) en un tubo

ependorf libre de RNAsas, se agregó 1  $\mu\text{L}$  de glicógeno (20 mg/mL), 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  10 M y 400  $\mu\text{L}$  de isopropanol a cada tubo y se resuspendió suavemente. Las muestras se incubaron a 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 4  $^\circ\text{C}$  por 10 min a 12,000 rpm. Con ayuda de una lámpara se observó la formación del pellet de ARN y se retiró el sobrenadante de cada muestra con precaución. Se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 75 %, se resuspendió cada pellet cuidadosamente y se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min a 4  $^\circ\text{C}$ . Se retiró sobrenadante y se dejaron secar los pellets de 3-5 min. Finalmente, cada pellet se resuspendió con 40  $\mu\text{L}$  de agua DEPC.

### **Etapa 2. Remoción del ADN genómico de la extracción de ARN.**

Para evitar que la reacción de síntesis de cADN se inactive, el ARN debe estar libre de sales, iones metálicos, etanol y fenol. Es por ello, que en la siguiente etapa se removió el ADN remanente después de la extracción de ARN. Para ello, se utilizó la enzima DNaseI, RNase-free (Fermentas, No. Cat EN0521). La **Tabla 14** presenta las condiciones empleadas para la reacción.

**Tabla 14. Condiciones para remover ADN genómico de extracciones de ARN.**

<b>Componente</b>	<b>[Final]</b>	<b>Volumen</b>
ARN	1.0 $\mu\text{g}$	0.4 $\mu\text{L}$
10x Buffer de reacción con $\text{MgCl}_2$	1.0 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
Enzima DNase I, RNase-free 1U/ $\mu\text{L}$	1 U	1 $\mu\text{L}$
Agua DEPC	Hasta 10 $\mu\text{L}$	Hasta 10 $\mu\text{L}$

La reacción se incubó a 37  $^\circ\text{C}$  durante 30 min. Al término se añadió 1  $\mu\text{L}$  de EDTA 50 mM y se incubó a 65  $^\circ\text{C}$  por 10 min. Finalmente, el ARN se usó como template para la reacción de RT-PCR o en su caso la muestra se guardó a -70  $^\circ\text{C}$  para su posterior uso.

### **Etapa 3. Síntesis de la primera cadena de cADN.**

Se Utilizó el kit RevertAid™ H Minus First Strand cADN Synthesis (Fermentas, No. Cat K1631), el cual, Se trabajó en hielo. Para esta etapa se adicionaron los reactivos como se indica en la **Tabla 15**.

**Tabla 15. Condiciones para la síntesis de cADN.**

<b>Componente</b>	<b>[Final]</b>	<b>Volumen</b>
Oligo (dT)18 primer 100 $\mu$ M	5 $\mu$ M	1 $\mu$ L
5Rx Buffer	1X	4 $\mu$ L
RiboLock™ Rnase Inhibitor 20 U/ $\mu$ L	1 U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
dNTP Mix 10 mM	1 mM	2 $\mu$ L
RevertAid™ H Minus M-MuIV Reverse	10 U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Transcriptase 200 U/ $\mu$ L		
H2O libre de nucleasas	Hasta 10 $\mu$ L	Hasta 20 $\mu$ L
ARN	5.0 ng/ $\mu$ L	6 $\mu$ L

Los que se mezclaron suavemente y se centrifugó la reacción. Se incubó la mezcla a 37 °C durante 1 hora. Finalmente, se incubó la reacción a 70 °C por 5 min para ser inactivada. Los productos de transcripción reversa se usaron directamente para el PCR y el restante se almacenó a -70 °C.

#### **Etapas 4. Amplificación del segmento de interés por PCR.**

En esta etapa se realizó la amplificación del cADN de las clonas transfectadas y el control negativo, adicionalmente se realizó una amplificación de un control negativo de la reacción colocando en ella los reactivos de reacción excepto ADN, conjuntamente se metieron dos controles positivos de reacción:

**Control positivo 1.** Se empleó el templado de ARN y los oligos específicos suplementados en el kit: el ARN del gen GAPDH, como gen de referencia, diseñado para generar un producto de 496 pb por RT-PCR y los oligos:

Oligo sentido (5´ - CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3´).

Oligo antisentido (5´-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3´).

**Control positivo 2.** Se utilizó el plásmido pVAX1/IFN- $\gamma$  como control positivo para amplificar el gen IFN- $\gamma$  y así poder corroborar la amplificación de las clonas transfectadas.

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la secuencia de interés fueron los diseñados para la construcción del plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$  los cuales amplifican el gen completo; 520 pb (ver sección 7.3.1).

Para la reacción de PCR se preparó una mezcla como se muestra en la sección 7.2.8, utilizando el mix de DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, No. Cat. K1071). Las condiciones de PCR empleadas se muestran en la **Tabla 12**.

#### **7.5.4. Cuantificación de IFN- $\gamma$ por la técnica de ELISA.**

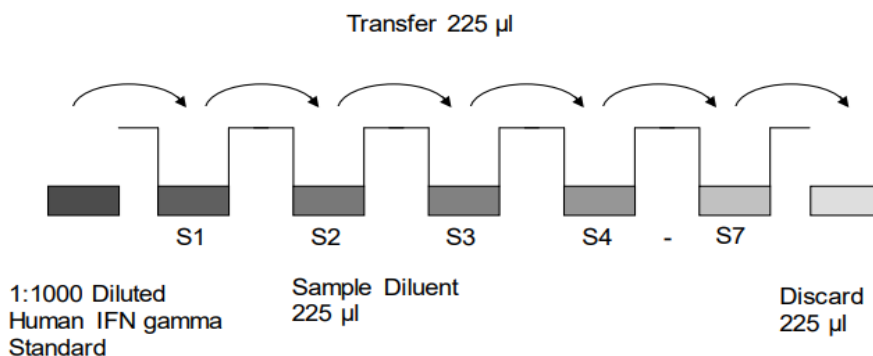
El ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA, por sus siglas en inglés) es una técnica de inmunoensayo que ha sido utilizada ampliamente como herramienta analítica en la investigación biomédica para la identificación y cuantificación de antígenos o anticuerpos específicos en una muestra dada. El fundamento de esta técnica está basado en el concepto de inmunología básica de un antígeno que se une a su anticuerpo específico; lo cual permite la identificación cuantitativa o cualitativa de anticuerpos o antígenos tales como proteínas, péptidos, hormonas o anticuerpos en cantidades muy pequeñas. Este ensayo puede ser de tipo directo o no competitivo, indirecto o competitivo y el de tipo Sándwich; el cual éste último es el que se utilizará.

El kit utilizado fue el Human IFN-gamma Platinum (Referencia: BMS228, Lote: 133280088 eBioscience®) el cual tiene una sensibilidad de 0.99 pg/mL y un rango de la curva: 1.6 a 100 pg/mL.

Para la cuantificación del IFN- $\gamma$ , se obtuvieron SN de 168 h de cultivo de células CHO-S pcDNA/IFN- $\gamma$ , a los cuales se les agregó inhibidor de proteasas para evitar la degradación de la proteína de interés.

#### **Etapas 1. Preparación de la curva estándar.**

El IFN- $\gamma$  estándar fue reconstituido en 180  $\mu$ L con agua destilada estéril durante 10- 30 minutos, teniendo una concentración de 200 ng/mL. Se realizaron una serie de diluciones del estándar para la curva de calibración en tubos Eppendorf agregando inicialmente 225  $\mu$ L del diluyente de la muestra. Se realizó una dilución 1:10 a una concentración de 20 ng/mL, una segunda dilución a 1:1000 (200 pg/mL). Finalmente, se resuspendió la mezcla del tubo 1 y se traspasaron 225  $\mu$ L y se procedió a realizar las siguientes diluciones como se describe en la figura siguiente.



**Figura 9. Diluciones seriadas, estándar de IFN- $\gamma$ .** Dilución inicial 1:1000 a una concentración de 200 pg/mL.

Una vez realizadas las diluciones para la curva estándar, se lavó la placa con 400  $\mu$ L de Buffer de lavado 1X de 10 a 15 segundos dos veces. Se colocaron 100  $\mu$ L de las diluciones por duplicado en los pozos iniciando con la concentración más baja (1.6 pg/mL hasta 100 pg/mL). Se añadieron 100  $\mu$ L del reactivo diluyente de la muestra por duplicado a los pozos designados “blancos” (H: 1 y 2) y 50  $\mu$ L a los pozos correspondientes a las muestras a analizar. La **Tabla 16** muestra un ejemplo de la disposición de blancos, estándares y muestras en las tiras de pozos.

Se preparó la biotina conjugada, realizando una dilución 1:100 de la solución de biotina-conjugada concentrada con Buffer de ensayo 1X. Una vez preparada la biotina se le añadieron 50  $\mu$ L de ésta a todos los pozos de la placa para cubrirla con papel adherible y dejar incubar por 2 h a 400 rpm a Tamb (18° a 25°C).

Se preparó la estreptavidina-HRP (Peroxidasa de rábano picante) a una dilución 1:100 de la solución de estreptavidina-HRP concentrada con Buffer de ensayo 1X en un tubo de plástico limpio.

Se retiró la película adhesiva y vertió a los pozos, Se lavaron las tiras de los pozos tres veces con 400  $\mu$ L de Buffer de lavado 1X y se añadieron 100  $\mu$ L de la estreptavidina preparada anteriormente. Se cubrió nuevamente la placa y se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente a 400 rpm. Se vació la estreptavidina-HRP y se lavó la placa de nuevo 3 veces con 400  $\mu$ L de Buffer de lavado 1X. Se le añadieron 100  $\mu$ L de reactivo solución de sustrato TMB a todos los pozos, incubando la placa durante 10 minutos evitando



la luz intensa. Se leyó la absorbancia de las muestras a 450 nm. Finalmente, para detener la reacción se le añadieron 100 µL de solución de paro a todos los pozos de la placa. (Ver anexo C para la interpretación de resultados).

**Tabla 16. Disposición de las muestras en las tiras de la placa de ELISA.**

	1	2	3	4
<b>A</b>	Standard 1 (100.0 pg/ml)	Standard 1 (100.0 pg/ml)	Sample 1	Sample 1
<b>B</b>	Standard 2 (50.0 pg/ml)	Standard 2 (50.0 pg/ml)	Sample 2	Sample 2
<b>C</b>	Standard 3 (25.0 pg/ml)	Standard 3 (25.0 pg/ml)	Sample 3	Sample 3
<b>D</b>	Standard 4 (12.5 pg/ml)	Standard 4 (12.5 pg/ml)	Sample 4	Sample 4
<b>E</b>	Standard 5 (6.3 pg/ml)	Standard 5 (6.3 pg/ml)	Sample 5	Sample 5
<b>F</b>	Standard 6 (3.1 pg/ml)	Standard 6 (3.1 pg/ml)	Sample 6	Sample 6
<b>G</b>	Standard 7 (1.6 pg/ml)	Standard 7 (1.6 pg/ml)	Sample 7	Sample 7
<b>H</b>	Blank	Blank	Sample 8	Sample 8

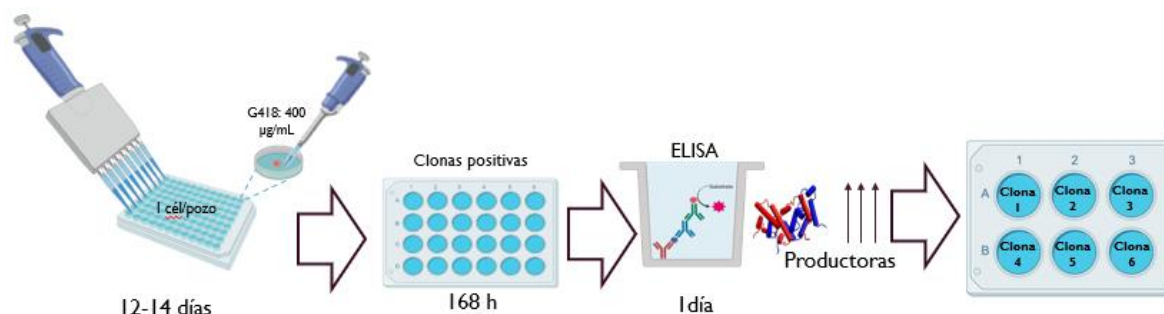
### 7.5.5. Selección clonal.

Una vez que la expresión de la proteína IFN- $\gamma$  de la población policlonal de CHO-S pcDNA/IFN- $\gamma$  fue verificada por RT-PCR y ELISA se procedió a realizar la selección clonal empleando dos metodologías, las cuales se describen a continuación.

#### Método 1. Clonación unicelular.

Se montó una placa de 96 pozos colocando 10-15 células transfectadas/mL por duplicado. Para limitar la dilución a 100 µl/pozo se sembraron estadísticamente 1-1,5 células por pocillo. Se mantuvo en condiciones de cultivo (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100 rpm) con medio de cultivo de mantenimiento (Ver sección 7.3.2). dejando estabilizar de 1-3 días. Se agregó medio de selección (Ver sección 7.3.2) para obtener aquellas clonas que integraron de manera eficiente el plásmido a su genoma y se encuentre expresando los transgenes de

interés. Se dejó el cultivo de 8-10 días cambiando el medio de selección periódicamente. Las clonas positivas se seleccionaron, se pasaron a placa de 24 pozos y se subcultivaron hasta tener una confluencia por arriba del 80 %. Pasadas 168 h se obtuvieron los sobrenadantes de los cultivos y se realizó un ELISA para seleccionar las clonas súperproductoras. El procedimiento se resume en el siguiente diagrama:



**Figura 10. Diagrama para la selección clonal mediante clonación unicelular.**

## **Método 2. Dilución limitada suplementada con medio metabolizado.**

Se utilizó medio metabolizado para suplir la carencia de factores de crecimiento de la propia línea celular en el medio de cultivo para la selección clonal y así inducir la proliferación celular. El medio metabolizado se obtuvo de la siguiente manera:

Se montó una cinética de las células CHO-S sin transfectar de acuerdo con la sección 7.4.1 en un matraz de 50 mL con una densidad inicial de 100,000 células/mL y se monitoreó hasta llegar a la parte media de la fase exponencial, se paró y se separó el medio de las células, se filtró con un filtro de 0.22 µm y se alicuotó y almacenó a -20°C hasta su uso.

- **Evaluación del porcentaje de suplemento con medio metabolizado en la selección clonal.**

Se realizó una evaluación del porcentaje adecuado a utilizar del medio metabolizado o “suplemento” en la selección clonal siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

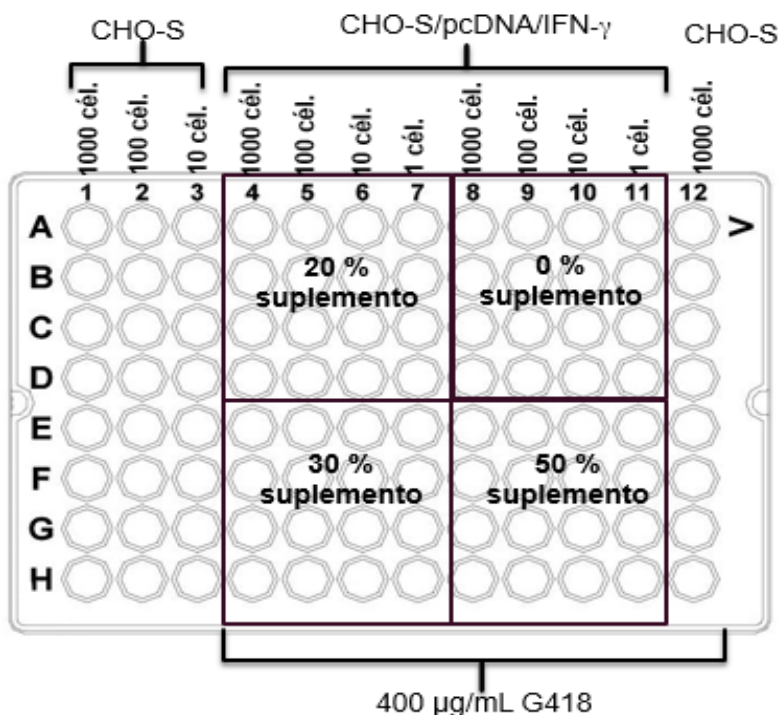
En placas de 12 pozos se montó una cinética de crecimiento bajo las siguientes condiciones: Se utilizó medio EX-CELL® Advanced™ CHO Fed-batch Medium suplementado con 8 mM de L-Glutamina estéril, 400 µg/mL de antibiótico G418. Se utilizaron 4 condiciones diferentes del medio metabolizado (0% (control negativo), 20 %, 30 % y 50 %) y un control de muerte colocando células CHO-S sin transfectar y sin medio

metabolizado. Se colocó una densidad inicial de 10,000 células por pozos en un volumen final de 1 mL. Se mantuvo en condiciones de cultivo (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100 rpm). Ésta se realizó por triplicado durante 10 días. Cada 24 h se tomó una muestra y se determinó la concentración celular viable y total para obtener los parámetros cinéticos: Tiempo de duplicación (Td) y velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) mediante exclusión del colorante azul de tripano (Ver sección 7.4.2).

- **Selección clonal por dilución limitada.**

Se montó una placa de 96 pozos colocando 4 condiciones diferentes del medio metabolizado (0% (control negativo), 20 %, 30 % y 50 %) con cuatro concentraciones celulares diferentes; 1000, 100, 10 y 1 células/pozo de los Minipools obtenidos en la selección policlonal en un volumen final de 100  $\mu$ L. Se colocaron células sin transfectar a las concentraciones de 1000, 100 y 10 células por pozo con y sin antibiótico como controles, quedando la placa como se muestra a continuación. Se mantuvo en condiciones de cultivo (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100 rpm) utilizando medio EX-CELL® Advanced™ CHO Fed-batch Medium suplementado con 8 mM de L-Glutamina estéril, se dejó estabilizar durante 1-3 días, se cambió el medio de cultivo por medio de selección (Ver sección 7.3.2) para seleccionar aquellas clonas que integraron de manera eficiente el plásmido a su genoma, se dejó el cultivo de 10-12 días cambiando el medio de selección periódicamente.

Posteriormente se seleccionaron las clonas con mayor proliferación y se transfirieron en placas de 24 pozos manteniéndolos en cultivo (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100 rpm, medio EX-CELL® Advanced™ CHO Fed-batch Medium suplementado con 8 mM de L-Glutamina estéril) bajo presión selectiva (400  $\mu$ g/mL G418) durante 168 h. Se evaluó la producción de la proteína IFN- $\gamma$  mediante ELISA (ver sección 7.5.5) y las clonas más productoras se transfirieron en placas de 6 pozos y finalmente ser caracterizadas.



- **Segunda selección clonal.**

Una vez obtenidas las clonas productoras durante la primera selección clonal, estas se sometieron a una segunda selección con la finalidad de obtener únicamente las células súperproductoras y aumentar la producción de proteína.

En una placa de 96 pozos se colocaron las clonas de CHO-S/pcDNA/IFN- $\gamma$  súperproductoras a una densidad inicial de 100 células por pozo. Se mantuvo en condiciones de cultivo (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100 rpm) utilizando medio EX-CELL® Advanced™ CHO Fed-batch Medium suplementado con 8 mM de L-Glutamina estéril, se dejó estabilizar durante 1-3 días, se cambió el medio de cultivo por medio de selección (Ver sección 7.3.2), se dejó el cultivo de 10-12 días cambiando el medio de selección periódicamente.

Se seleccionaron las clonas más confluentes y se transfirieron a placas de 24 pozos, se mantuvieron en cultivo (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100 rpm, medio EX-CELL® Advanced™ CHO Fed-batch Medium suplementado con 8 mM de L-Glutamina estéril) bajo presión selectiva (400  $\mu$ g/mL G418) durante 168 h. Se evaluó la producción de la proteína IFN- $\gamma$  mediante ELISA (ver sección 7.5.5) para así obtener las clonas súperproductoras, ser colocadas en placas de 6 pozos y finalmente ser caracterizadas y criopreservadas (ver sección 7.3.3.3).

## **7.6. Caracterización del sistema estable CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$ .**

Se seleccionaron las dos clonas más productoras de IFN- $\gamma$  para su caracterización realizando cinéticas de crecimiento, la identificación y cuantificación de la proteína y sus transcritos mediante RT-PCR y ELISA.

### **7.6.1. Cinética de crecimiento.**

Se montó una cinética de crecimiento en matraz de 125 mL con un volumen final de 50 mL bajo las siguientes condiciones: Medio EX-CELL® Advanced™ CHO Fed-batch Medium suplementado con 8 mM de L-Glutamina estéril, partiendo de un inóculo inicial de 100,000 CV/mL, manteniéndose en condiciones de crecimiento (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 rpm). Se monitoreo durante 12 días, cada 24 h se tomó una alícuota de 2 mL, se centrifugó por 5 min a 1200 rpm. Se separó el sobrenadante en un tubo eppendorf estéril se agregó inhibidor de proteasas y se guardó a -80 °C hasta su análisis.

Se determinó la concentración celular viable y total para obtener los parámetros cinéticos: Tiempo de duplicación (Td) y velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) mediante exclusión del colorante azul de tripano (ver sección 7.4.2).

### **7.6.2. Análisis de la expresión génica y proteica de interferón gamma.**

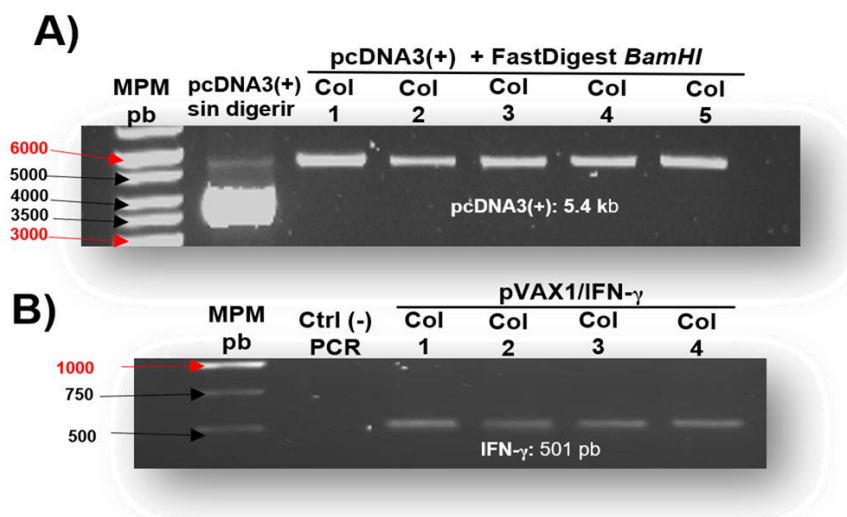
Se determinó expresión de la proteína IFN- $\gamma$  de las dos clonas súperproductoras realizando los siguientes análisis: RT-PCR para evaluar la transcripción de los genes mediante el análisis de los ARNm (ver sección 7.5.3) y ELISA para cuantificar la cantidad expresada (ver sección 7.5.4).

## VIII. RESULTADOS.

### 8.1. Amplificación de plásmidos y análisis de restricción.

Con la finalidad de tener suficiente cantidad de los plásmidos pcDNA3 (+) y pVAX1/IFN- $\gamma$  para los experimentos subsecuentes se amplificaron y purificaron a partir de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante el kit de Miniprep (Thermo Fisher Scientific, No. Cat. K0503). El ADNp se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop 2000. Para comprobar el tamaño del plásmido pcDNA3 (+) se hizo un análisis de restricción utilizando la enzima FastDigest *Bam*HI para linearizar, esperando un tamaño de 5.4 Kb. Por otro lado, para corroborar que el gen se encontraba insertado en el plásmido pVAX1/IFN- $\gamma$  se realizó un PCR para amplificar una sección de 501 pb correspondientes al gen de interés.

Los productos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. Los resultados de la digestión con la enzima FastDigest *Bam*HI se muestran en la **Figura 11 A**, pcDNA3 (+) digerido con la enzima FastDigest *Bam*HI observándose una única banda correspondiente al tamaño del plásmido (5.4 Kb). La amplificación se muestra en la **Figura 11 B**, se obtuvo una banda por arriba de los 500 pb correspondientes al gen IFN- $\gamma$  corroborando así la presencia de este en el plásmido pVAX1.



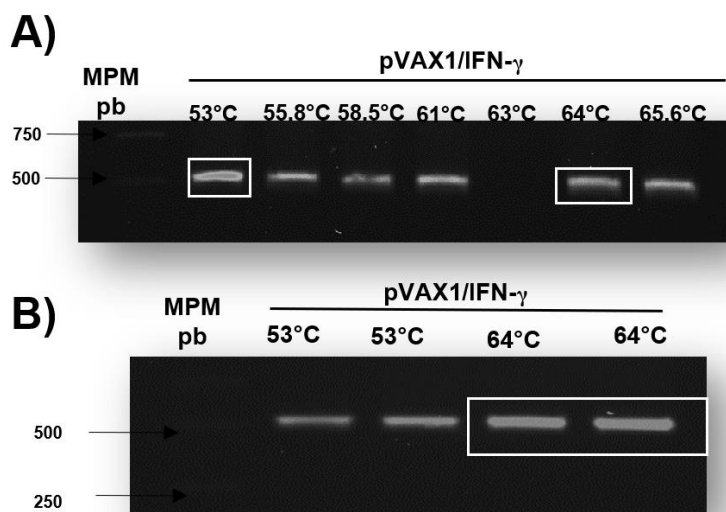
**Figura 11. Análisis de restricción del plásmido pcDNA3 (+) y amplificación del gen IFN- $\gamma$ . A) Digestión del plásmido pcDNA3 (+) utilizando la enzima FastDigest *Bam*HI. De la colonia 1 a la 5 se tiene una banda con tamaño de 5.4 kb. B) Amplificación del gen IFN- $\gamma$  a partir del plásmido pVAX/IFN- $\gamma$  mediante PCR. De la colonia 1 a la 3 Se observa una única banda con un peso molecular de 501pb. Gel de agarosa 1 %, 80 V por 1 h.**

## 8.2. Construcción molecular del vector de expresión pcDNA3/IFN- $\gamma$ .

### 8.2.1. Amplificación del gen IFN- $\gamma$ mediante PCR a partir del plásmido pVAX1/IFN- $\gamma$ .

Se diseñaron y mandaron a sintetizar oligonucleótidos (cebadores) específicos (descritos en la sección 7.2.1) que permitieran la liberación y amplificación del cADN de IFN- $\gamma$  con un tamaño de 520 pb a partir del plásmido pVAX1/IFN- $\gamma$ . Posteriormente se realizó un PCR gradiente punto final para obtener la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) óptima.

Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y teñidos con bromuro de etidio. Los resultados que se muestran en la **Figura 12 A** indican que la  $T_m$  óptima de amplificación del gen IFN- $\gamma$  se encontraba entre 53 °C y 64 °C, teniendo aquí bandas más definidas, por lo que se realizó un segundo PCR utilizando estas dos temperaturas de amplificación y así determinar cuál era la mejor. En la **Figura 12 B** muestra una banda más definida una  $T_m$  de 64 °C siendo esta la  $T_m$  óptima.



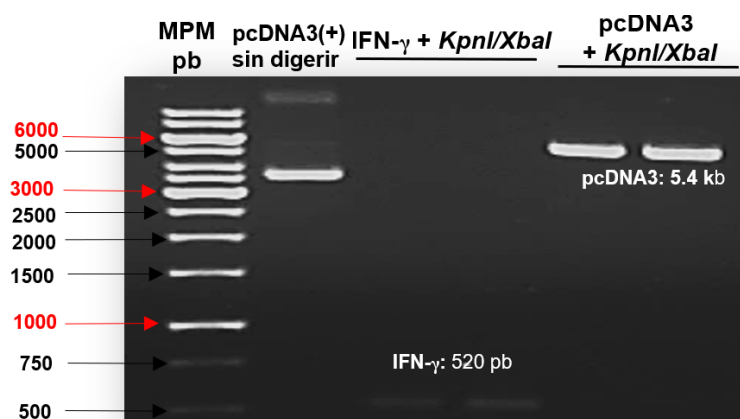
**Figura 12. PCR gradiente para determinar la  $T_m$  óptima para amplificar el gen IFN- $\gamma$ . A) PCR gradiente. B) PCR punto final. En la temperatura de 64°C se observan bandas más definidas del gen amplificado por lo que se determinó que esta sería la  $T_m$  óptima. Geles de agarosa 1 %, 80 V por 1 h.**

### 8.2.2. Reacción de doble digestión del plásmido pcDNA3 (+) y del fragmento IFN- $\gamma$ .

Previo a la reacción de digestión se amplificó el fragmento IFN- $\gamma$  mediante PCR a partir del plásmido pVAX1/IFN- $\gamma$  utilizando los oligonucleótidos descritos en la sección 7.2.1 y se purificaron los fragmentos de interés a partir del gel de agarosa.

Para poder realizar la construcción mediante la unión del plásmido pcDNA3 (+) con el fragmento IFN- $\gamma$  se hizo una doble digestión enzimática tanto del plásmido como del gen amplificado antes de llevar a cabo la reacción de ligación utilizando las enzimas *KpnI* y *XbaI*. Los productos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio.

Los resultados de la doble digestión se muestran en la **Figura 13** en la cual se presentan fragmentos de 520 pb correspondiente a la doble digestión del gen IFN- $\gamma$ , por otra parte también se muestran fragmentos de 5.4 kb correspondientes a la doble digestión del vector pcDNA3 (+).



**Figura 13.** Doble digestión del plásmido pcDNA3 (+) y del fragmento IFN- $\gamma$  con las enzimas *KpnI* y *XbaI*. Gel de agarosa 1 %, 80 V por 1 h.

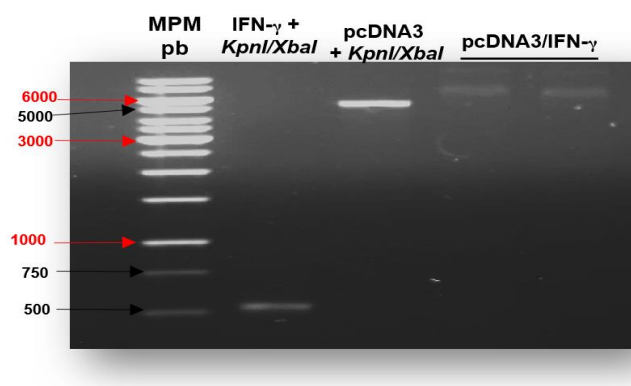
### 8.2.3. Reacción de ligación.

Una vez digeridos tanto el plásmido pcDNA3 (+) como el gen IFN- $\gamma$  se llevó a cabo la purificación de ambos mediante extracción fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (sección 7.2.2), con la finalidad de que la reacción de ligación no se viera afectada por sales o enzimas de la digestión. Después se llevó a cabo la ligación entre ambos tal y como se



describe en la Sección 7.2.3. Los productos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio.

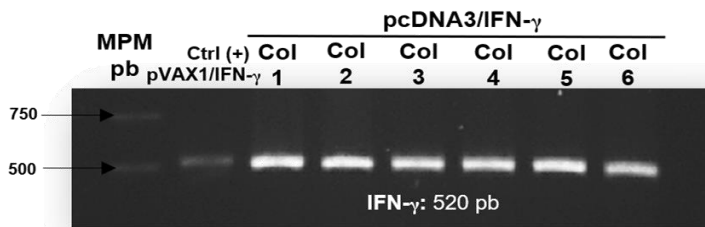
Los resultados de la ligación se muestran en la **Figura 14**, donde se tiene el fragmento de IFN- $\gamma$  (520 pb) digerido con las enzimas *KpnI* y *XbaI*, corresponde a, el vector pcDNA 3(+) (5400 pb) digerido las mismas enzimas con y en los últimos dos carriles se tiene una única banda (~5920 pb) por arriba del vector vacío, esto nos indica que se llevó a cabo correctamente la reacción de ligación.



**Figura 14. Reacción de ligación.** En los últimos dos carriles se observa una banda de aproximadamente 5920 pb por lo que la ligación se llevó a cabo correctamente. Gel de agarosa 1 %, 80 V por 1 h.

#### 8.2.4. Transformación bacteriana y PCR de colonias.

Se llevó a cabo la transformación bacteriana con el producto de la reacción de ligación utilizando bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes y se sembraron en placas de agar LB con antibiótico. 6 colonias y se analizaron mediante PCR. En la **Figura 15**, se muestra 1 banda de 520 pb, el cual corresponde a la amplificación del IFN- $\gamma$ . Esto indica que posiblemente se llevó a cabo la transformación de manera correcta y que las bacterias amplificaron el plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ . Para poder confirmar este resultado, se llevó a cabo un ensayo de restricción y un PCR para la amplificación del inserto, tal como se muestra a continuación.

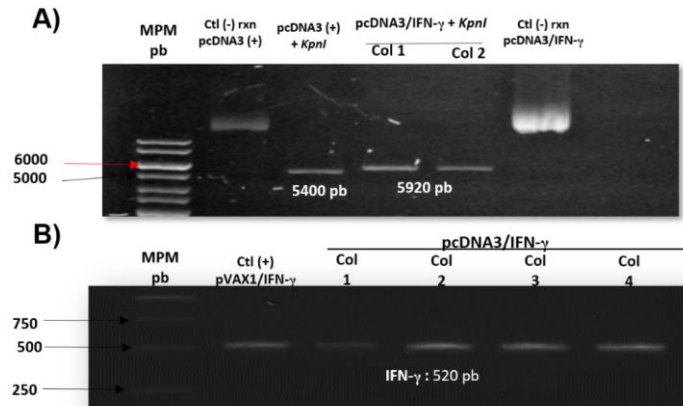


**Figura 15. PCR de colonias positivas.** Se muestra el PCR de colonias positivas observándose una banda de amplificación de 520 pb correspondiente al gen de interés. Gel de agarosa 1 %, 80 V por 1 h.

### 8.2.5. Ensayo de restricción y PCR.

Una vez determinando la eficacia de la transformación, las colonias positivas se purificaron mediante el kit de Miniprep. Se cuantificó el ADNp mediante espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop 2000. Para comprobar el tamaño de la construcción pcDNA3/IFN- $\gamma$  se realizó un análisis de restricción utilizando la enzima *KpnI* realizando un solo corte (para linearizar), esperando un tamaño de 5920 pb. Por otro lado, para corroborar que el gen se encontraba insertado se realizó un PCR para amplificar una sección de 520 pb correspondientes al gen de interés. Los productos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio.

En la **Figura 16 A** se muestran las digestiones con la enzima *KpnI*, observando bandas con un peso molecular de 5920 pb, lo cual indica que la construcción del plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$  se llevó a cabo de manera correcta, mientras que los resultados del PCR se muestran en la **Figura 16 B**, en las colonias 1-4 se observan bandas con un tamaño de 520 pb correspondientes al gen amplificado, corroborando que el gen si se encontraba insertado en el plásmido.

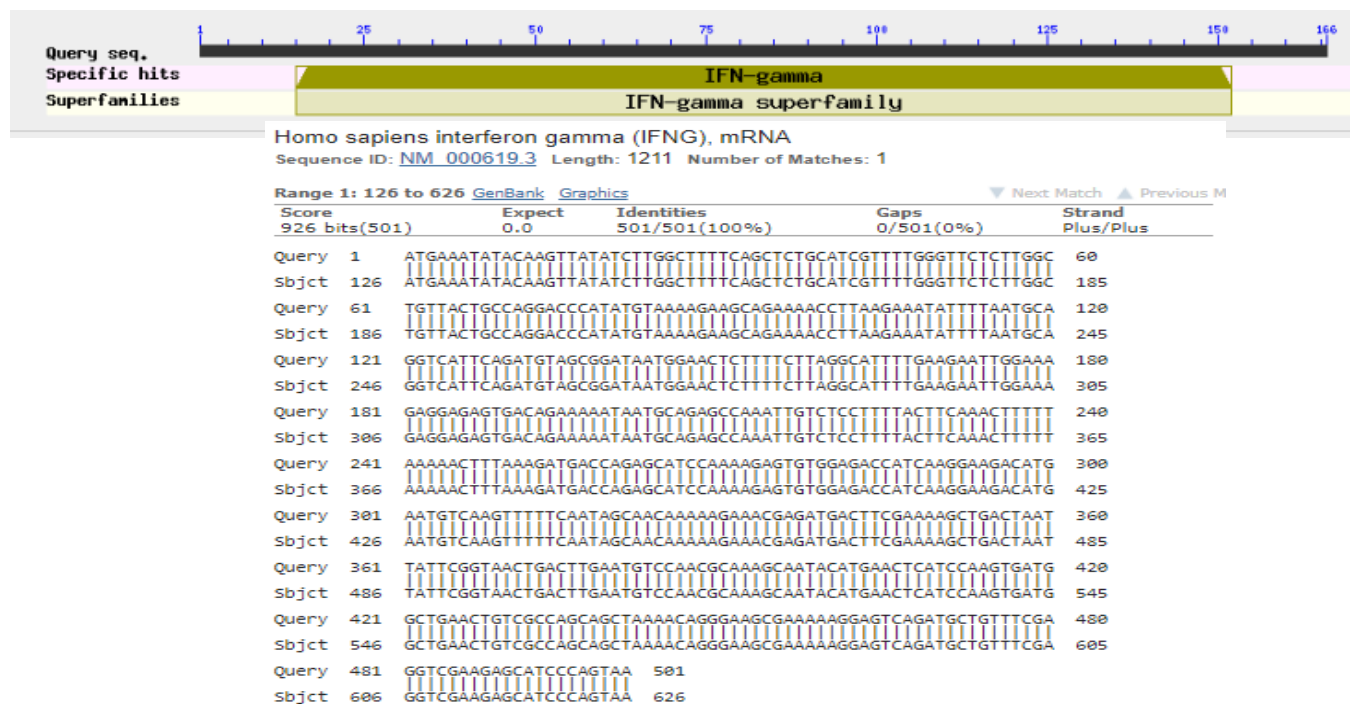


**Figura 16. Ensayo de restricción y PCR. A) Digestión del plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ . B) Amplificación del gen IFN- $\gamma$  a partir del plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ . Gel de agarosa 1 %, 80 V por 1 h.**

### 8.2.6. Análisis de secuenciación del plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ .

Una vez purificada la construcción del plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ , se preparó una mezcla ADN/Oligo para ser enviada a la USSDNA del IBT, UNAM para secuenciación.

Después de obtener la secuencia de nucleótidos, se utilizó la herramienta BLAST para su análisis, ya que éste es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema (también denominada en la literatura secuencia query) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos. El algoritmo encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema. Es capaz de calcular la significación de sus resultados, por lo que nos provee de un parámetro para juzgar los resultados que se obtienen. Una vez corrido el análisis BLAST en la **Figura 17** se observan los resultados donde se corroboró que la secuencia de nucleótidos pertenece a los ARNm que codifican a la proteína IFN- $\gamma$  humano siendo idéntica la secuencia. Con este análisis se corroboró que efectivamente se obtuvo la construcción molecular del plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ .



**Figura 17. Análisis Blast de la secuenciación de IFN- $\gamma$ .**

### 8.3. Caracterización de la línea celular CHO-S.

Las células CHO generalmente se utilizan en la expresión estable o constitutiva de glicoproteínas por lo que la selección de clonas, así como el trabajo molecular y su estabilidad son puntos críticos para obtener una línea celular altamente productora que genere glicoproteínas con patrones de glicosilación semejantes al humano (SELEXIS 2016). Con el objetivo de caracterizar dicha línea celular, se realizó la cinética de crecimiento en medio EX-CELL® Advanced™ CHO Fed-batch Medium suplementado con 8 mM de L-Glutamina estéril, determinando así sus parámetros cinéticos ( $\mu$  y Td). A la par se realizó la medición de metabolitos (glucosa, glutamina, lactato y glutamato), los cuales son factores importantes que influyen en el metabolismo celular y por lo tanto son importantes para supervivencia de la misma célula y la producción de biomoléculas activas.

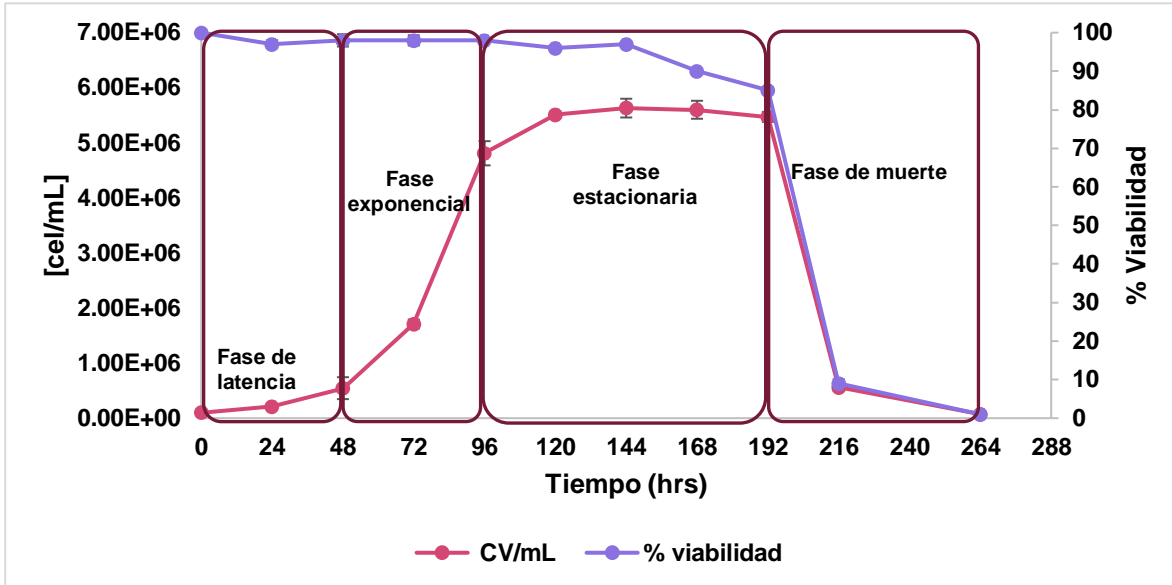
#### 8.3.1. Cinética de crecimiento.

Con la finalidad de observar y determinar la evolución de las células a lo largo del tiempo y así caracterizar a la línea celular CHO-S se montó una cinética de crecimiento en una placa

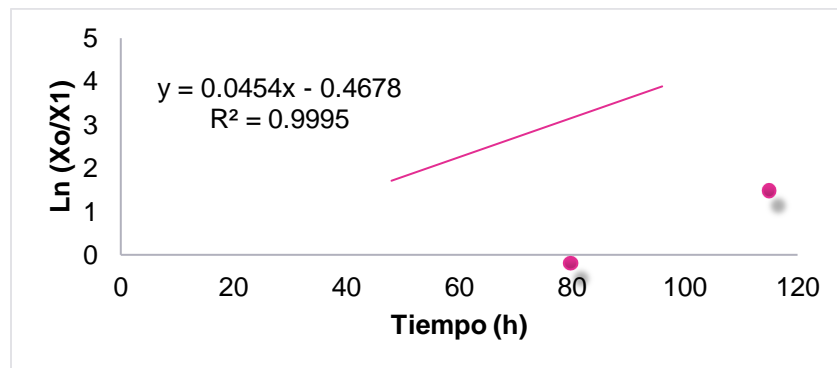
de 12 pozos con un volumen de medio de 1 mL por pozo partiendo de un inóculo inicial de 100,000 CV/mL, esto por triplicado. En la **Figura 18** se distinguen las cuatro etapas características del crecimiento celular; fase de latencia o de adaptación, Fase log o exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

Durante la fase de latencia no hay crecimiento celular significativo, ya que las células se están adaptando a las condiciones ambientales y nutricionales. A partir de este punto comienza la fase de crecimiento exponencial, en esta fase las células comienzan a duplicarse constantemente hasta alcanzar un límite en donde la concentración celular tiende a superar la capacidad del entorno, durante esta fase se realiza el mayor consumo de metabolitos, dicha fase duró 48 h. Se inicia la fase estacionaria donde existe un balance entre el crecimiento y la muerte celular, este balance se encuentra relacionado con la disminución de nutrientes esenciales o la generación de subproductos tóxicos; en esta etapa la velocidad de crecimiento fue nula. Hasta este punto la viabilidad celular se mantuvo dentro de un rango de 90-96 %. Finalmente, a partir de las 192 h se tiene la fase de muerte en la que la velocidad de crecimiento es menor a la velocidad de muerte. En este punto se observa que para las 216 horas el porcentaje de viabilidad bajó hasta 10 %, este fenómeno es característico de la línea celular CHO, ya que al haber falta de nutrimentos y acumulación de subproductos tóxicos las células entran en estado de apoptosis.

Una vez determinada la curva de crecimiento, se calculó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) mediante la ecuación de la línea recta en la etapa exponencial, como se muestra en la **Figura 19**, la pendiente de la ecuación es la velocidad específica de crecimiento para las células CHO-S bajo condiciones descritas anteriormente, la cual fue de 0.0454 hr<sup>-1</sup>. Se determinó el tiempo de duplicación, el cual corresponde a 15.27 h, siendo este menor al reportado en la literatura (16-22 h (Invitrogen 2016)), este fenómeno se atribuye al tipo de medio que se utilizó ya que es un medio químicamente definido y es utilizado para respaldar el crecimiento y la productividad de células CHO en cultivos alimentados por lotes.

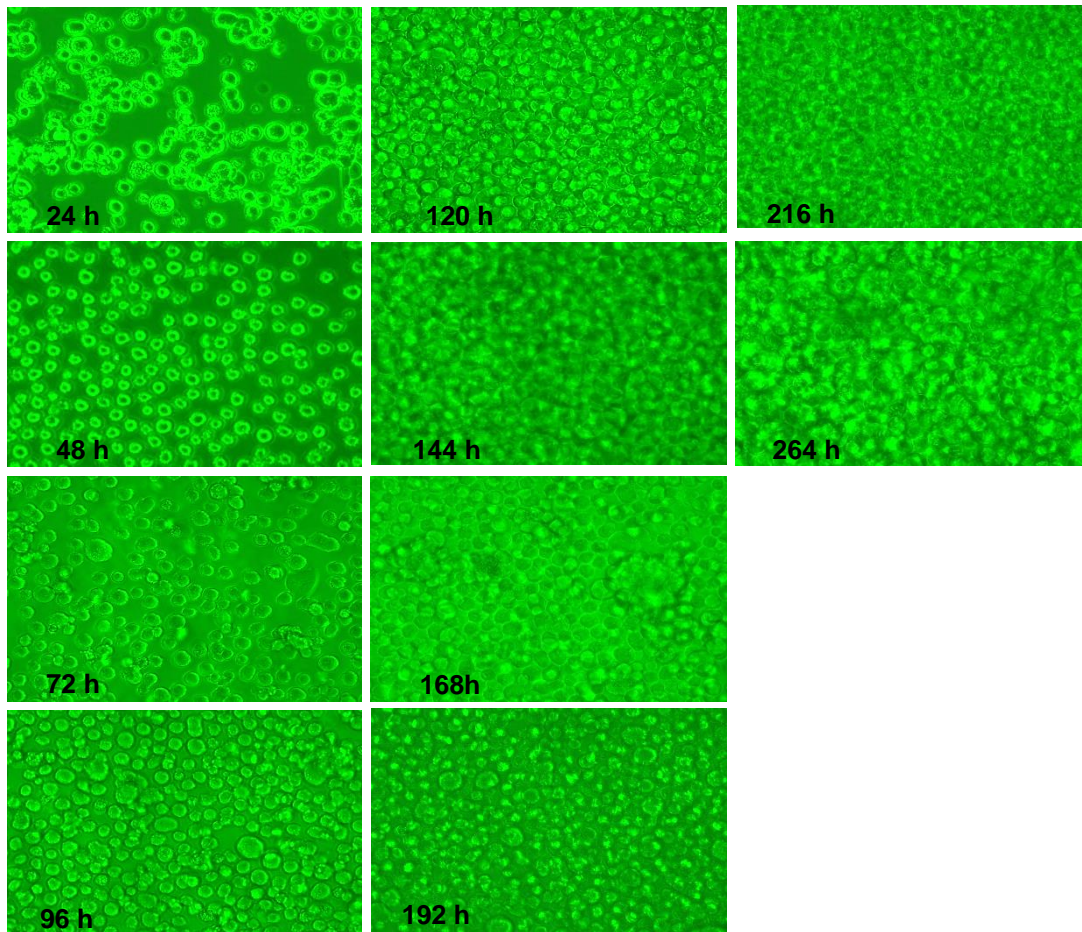


**Figura 18. Cinética de crecimiento de células CHO-S.** Realizada por triplicado en placas de 12 pozos, manteniéndose en condiciones de crecimiento (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 rpm), en medio Ex cell Advanced CHO medio, 8mM Glutamina, con una densidad inicial 100,000 cel/mL. Cada 24 h se recogió un pozo. Se observan las fases de la cinética de crecimiento, representados como fase latencia, fase exponencial y fase estacionaria.



**Figura 19. Fase exponencial en la cinética de crecimiento de la línea celular CHO-S sin transfectar.** Representación de la fase exponencial entre  $\ln [x/x_0]$  & tiempo de cultivo (horas), para la obtención de la ecuación de la línea recta.

La morfología del cultivo de la cinética de crecimiento de células CHO-S se presenta en la **Figura 20**, donde cada 24 horas se tomó una fotografía con el objetivo 20X en un Microscopio Confocal Zeiss Axioskop del cultivo.



**Figura 20. Morfología del cultivo de la cinética de crecimiento de células CHO-S.** Realizada en placas de 12 pozos, manteniéndose en condiciones de crecimiento (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 rpm), en medio Ex cell Advanced CHO medio, 8mM Glutamina, con una densidad inicial 100,000 cel/mL. Fotografías tomadas a 20X, Microscopio Confocal Zeiss Axioskop.

### 8.3.2. Análisis de metabolitos celulares de la línea celular CHO-S sin transfectar.

Con el objetivo de monitorear el metabolismo celular bajo condiciones estándar de cultivo se cuantificó la concentración de los nutrientes y desechos metabólicos en un analizador bioquímico YSI-2950 Life Sciences, por medio de biosensores capaces de reconocer un analito mediante reacciones enzimáticas.

Los dos nutrientes principales que favorecen la supervivencia y la biosíntesis celular en cultivo son la glucosa y la glutamina, ya que a partir de estos nutrientes se genera energía suficiente para el crecimiento celular. La glucosa funciona como fuente de carbono para la

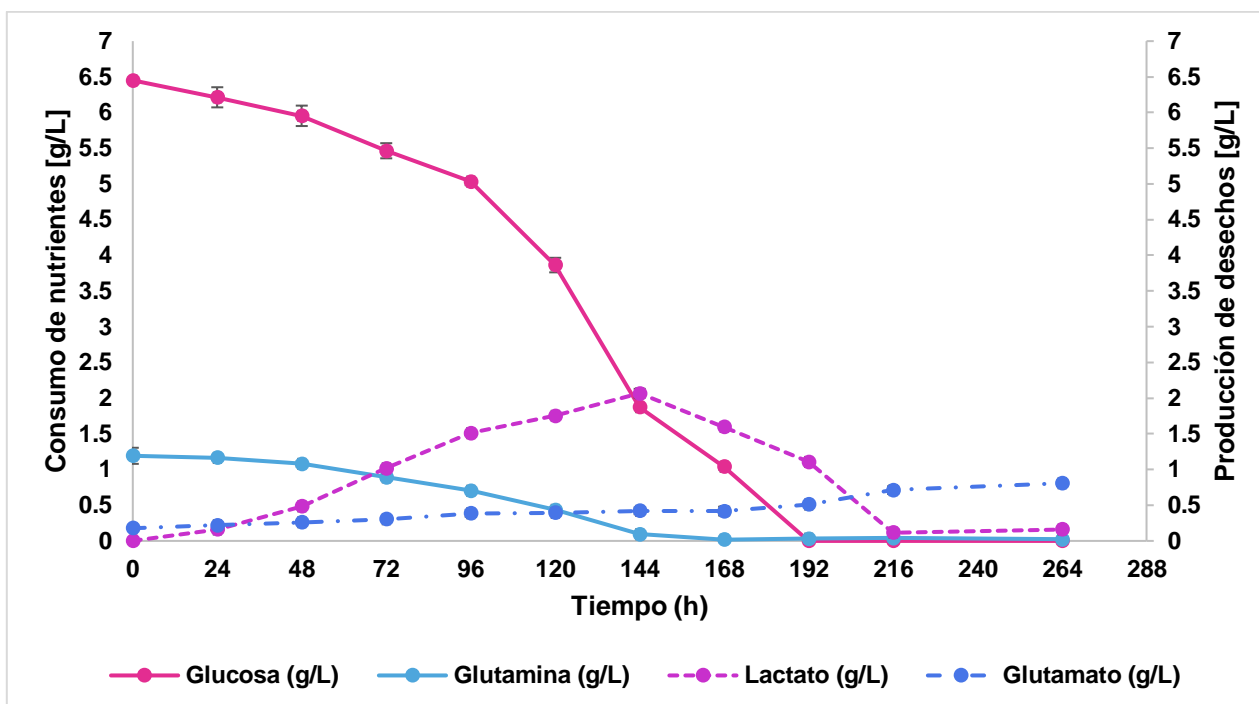
producción de energía en forma de ATP, a través de la vía glucólisis aeróbica o anaeróbica teniendo al final del ciclo un rendimiento neto de 2 moléculas de ATP y 2 moléculas de piruvato (glucólisis aeróbica), esto ocurre en el citosol (Mulukutla et al. 2010). El piruvato es convertido a Acetil CoA por la enzima piruvato deshidrogenasa y entra al ciclo del ácido cítrico en las mitocondrias para la generación de más energía (ATP) o ser reducido por el NADH a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa incluso si hay suficiente oxígeno disponible; un fenómeno conocido como 'efecto Warburg' o glicólisis aeróbica. Una de las características de las células de crecimiento rápido, como lo son las CHO-S, es el consumo rápido de glutamina, la cual aporta fuentes adicionales de carbono y nitrógeno para el crecimiento celular, producción de proteínas, esqueletos amino para generar otros aminoácidos a través de la transaminación útiles en la replicación de ADN. La principal vía de su degradación es la glutaminólisis, vía por la cual es convertida a glutamato por la enzima glutaminasa. Sin embargo, esto podría implicar un ciclo truncado con oxidación de la glutamina al ácido málico intermedio, que luego se convierte en piruvato, y finalmente en lactato, en el citosol (Zagari et al. 2013).

Con base en lo anterior, en la **Figura 21** se muestra el perfil metabólico de dichos nutrientes, así como la de sus respectivos subproductos: lactato y glutamato. Bajo las condiciones experimentales expuestas en la sección 8.3, la concentración de glucosa disminuyó de 6.45 g/L hasta agotarse completamente a las 192 h, de igual manera la concentración de glutamina fue disminuyendo de 1.19 g/L hasta agotarse por completo a las 168 h.

Por otro lado, el glutamato se produjo de manera exponencial llegando a tener una concentración final de 0.80 g/L a las 264 h, mientras que a producción de lactato aumentó paulatinamente hasta las 144 h, para las 168 h hubo una disminución en la producción de dicho metabolito, esto es característico de las líneas celulares de células de crecimiento rápido como lo son las CHO-S, ya que al agotarse la glutamina debido al metabolismo mitocondrial de la célula inicia el consumo de lactato, esto lo hacen como una vía de supervivencia al existir baja concentración del nutrimento principal (glutamina). El consumo de lactato intenta compensar la baja entrada de glutamina al ciclo del ácido tricarboxílico (Zagari et al. 2013). Típicamente, el lactato se produce con fuerza durante la fase de crecimiento exponencial, mientras que su valor neto se tiene con frecuencia cuando las células entran en la fase estacionaria. El consumo de este metabolito se observa hasta las 216 h, tiempo en el cual si es comparado con la cinética de crecimiento se tiene una



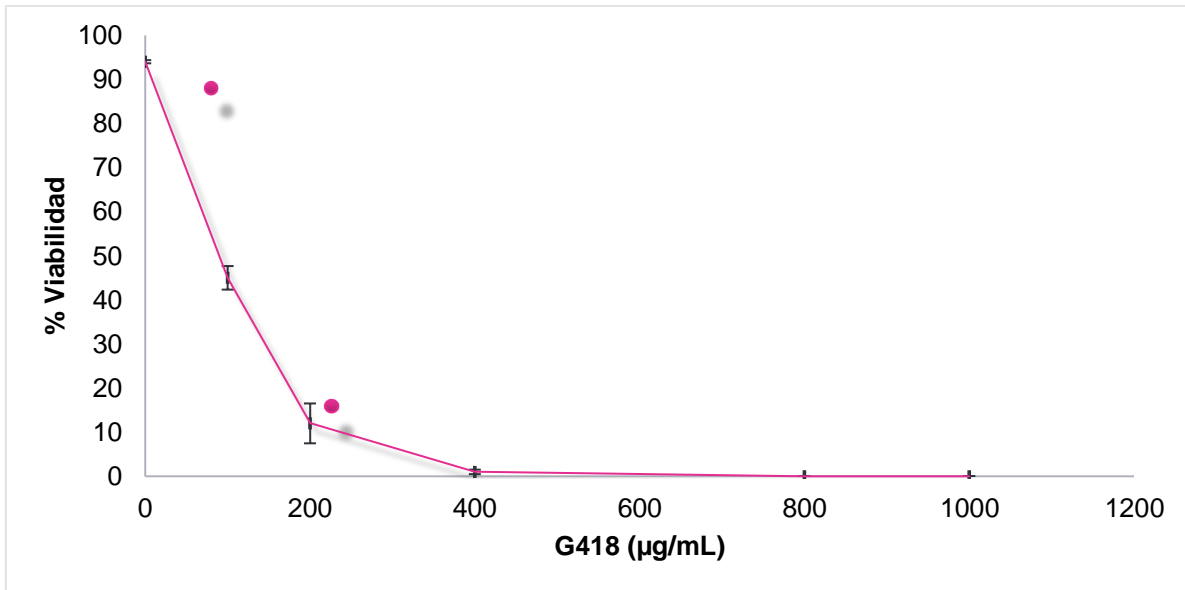
disminución de la viabilidad celular, ya que en este punto los nutrientes se han agotado por completo.



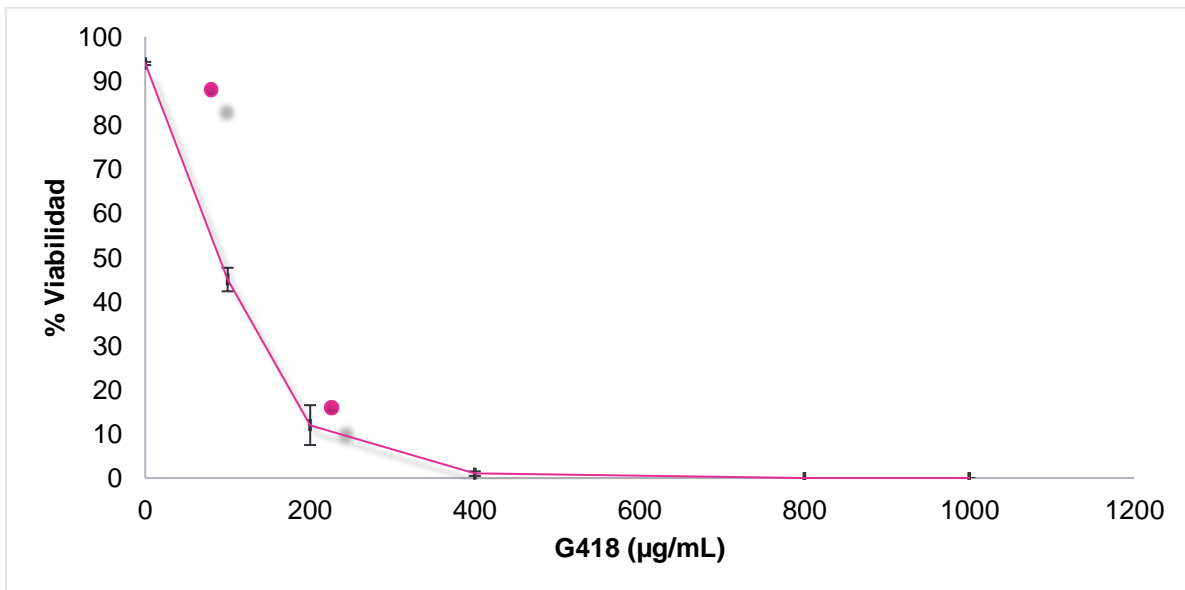
**Figura 21. Análisis de metabolitos celulares de la línea celular CHO-S sin transfectar.** Consumo de nutrientes: glucosa-glutamina y producción de desechos metabólicos: lactato-glutamato obtenidos de la cinética de crecimiento de células CHO-S en medio Ex cell Advanced CHO medio, 8mM Glutamina, con una densidad celular inicial de 100,000 cel/mL.

### 8.3.3. Curva de sensibilidad al antibiótico G418 de la línea celular CHO-S.

Se realizó una curva de muerte celular para determinar la concentración mínima de antibiótico G418 que asegurara la muerte de la línea celular CHO-S en un periodo de 10 días. Para ello se montó una placa de 24 pozos en un volumen de 500  $\mu$ L por pozo partiendo de un inoculo inicial de 50,000 CV/mL con una viabilidad por arriba del 90 %. Se agregaron cantidades crecientes de G418 en cada pozo por triplicado, utilizando 0, 100, 200, 400, 800 y 1000  $\mu$ g/mL y se mantuvieron por 10 días bajo las condiciones descritas en la sección 7.4.4. Finalmente, se obtuvo la viabilidad celular mediante conteo con cámara de Neubauer y la técnica de azul de tripano. La curva de muerte se muestran en la **Figura 22**

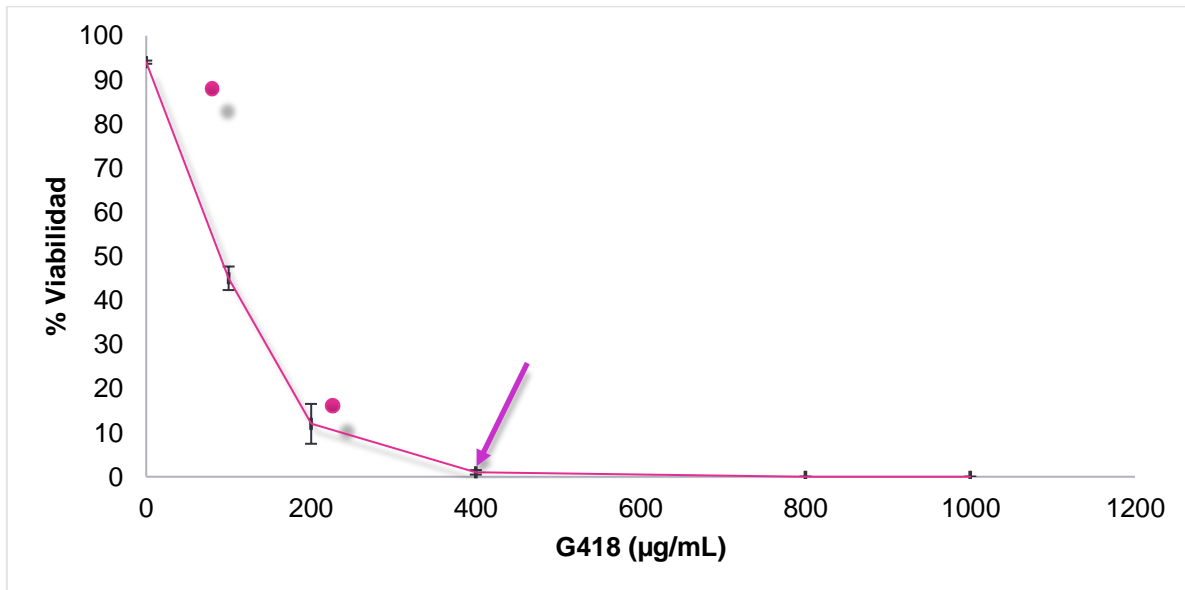


, a la concentración de 400 µg/mL elimina al 99% de las células, lo cual indica que esta es la concentración ideal para utilizarse durante la selección policlonal.

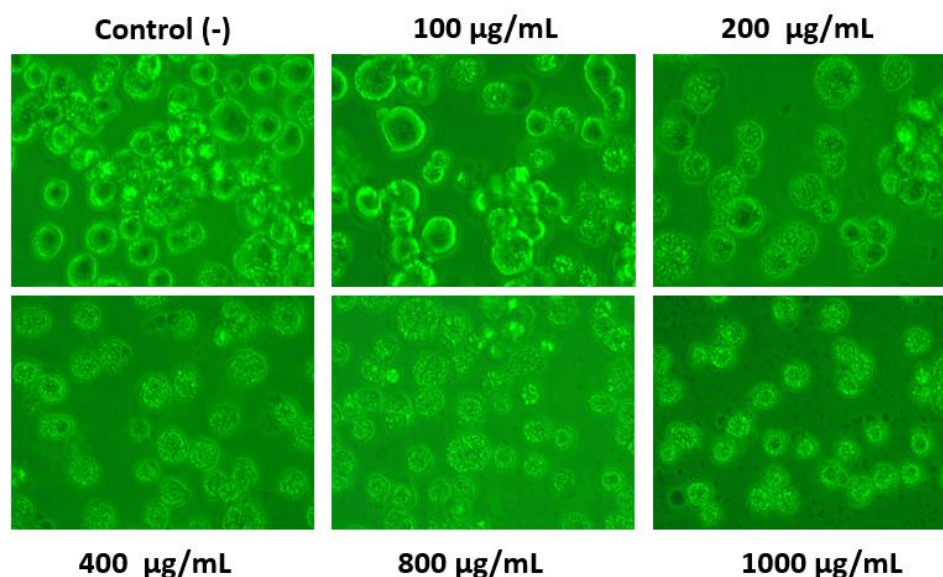


En la **Figura 23** se observa la morfología de la curva de sensibilidad al antibiótico después de 10 días con tratamiento a diferentes concentraciones de G418. Las fotografías fueron tomadas con un Microscopio Confocal Zeiss Axioskop a 20X, se observó que el cultivo presentó una morfología celular típica de muerte celular siendo directamente proporcional a la concentración de antibiótico utilizado.

De estos resultados, se determinó la concentración letal 50 (CL50) para mantener a las células bajo presión selectiva evitando que estas se volvieran resistentes siendo esta de 100 µg/mL.



**Figura 22. Curva de sensibilidad al antibiótico G418 de la línea celular CHO-S.** Realizada en placas de 12 pozos, manteniéndose en condiciones de crecimiento (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 rpm), en medio Ex cell Advanced CHO medio, 8mM Glutamina y tratadas con antibiótico G418 por 10 días. Densidad inicial 50,000 cel/mL. Donde se observa que la concentración ideal para la selección clonal es de 400 µg/mL.



**Figura 23. Morfología de las células CHO-S de la curva de sensibilidad al antibiótico G418.** Realizada en placas de 12 pozos, bajo condiciones de crecimiento (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 50 rpm), en medio Ex cell Advanced CHO medio, 8mM Glutamina y tratadas con antibiótico G418 por 10 días. Densidad inicial 50,000 cel/mL. Fotografías tomadas después de 10 días de tratamiento a 20X en Microscopio Confocal Zeiss Axioskop.

#### 8.4. Generación del sistema estable CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$ .

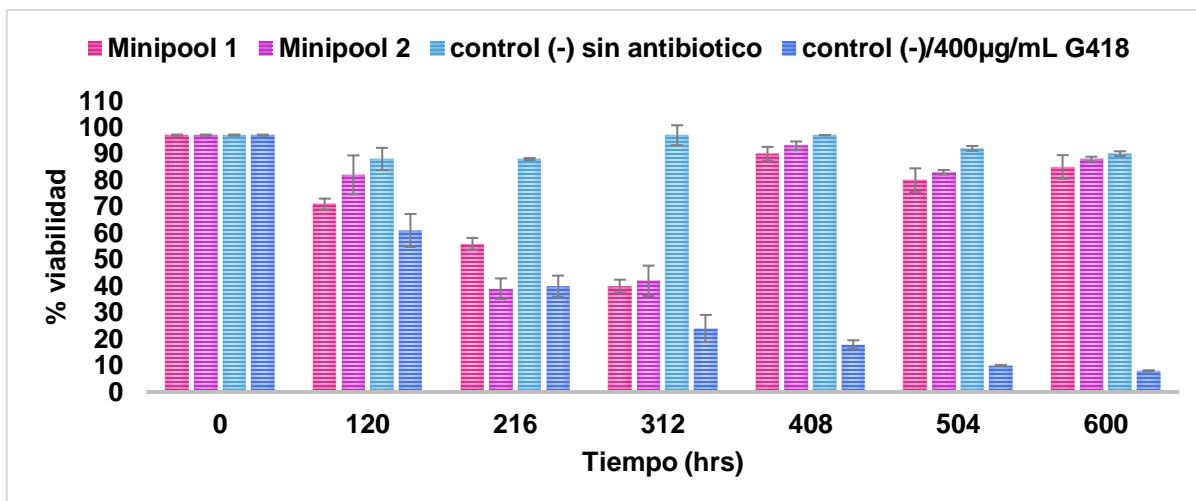
##### 8.4.1. Transfección de las células CHO-S con el plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ y selección policlonal.

La transfección consistió en introducir el plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$  a la célula hospedera (CHO-S), mediante la formación de lipocomplejos empleando el método de lipofectamina 2000, la cual forma una cubierta lipídica alrededor del ADN para facilitar la entrada a la célula sin provocar alteraciones mayores en ella. Para ello primeramente se linealizó el plásmido con la enzima MfeI (MunI) realizando un corte en el sitio del promotor de CMV. Una vez teniendo el plásmido lineal se realizó la transfección de dos Minipools de la línea celular CHO-S como se indica en la sección 7.5.1. 72 h post-transfección se agregó el medio de selección (ver sección 7.3.2) cambiándose periódicamente durante la selección. En este

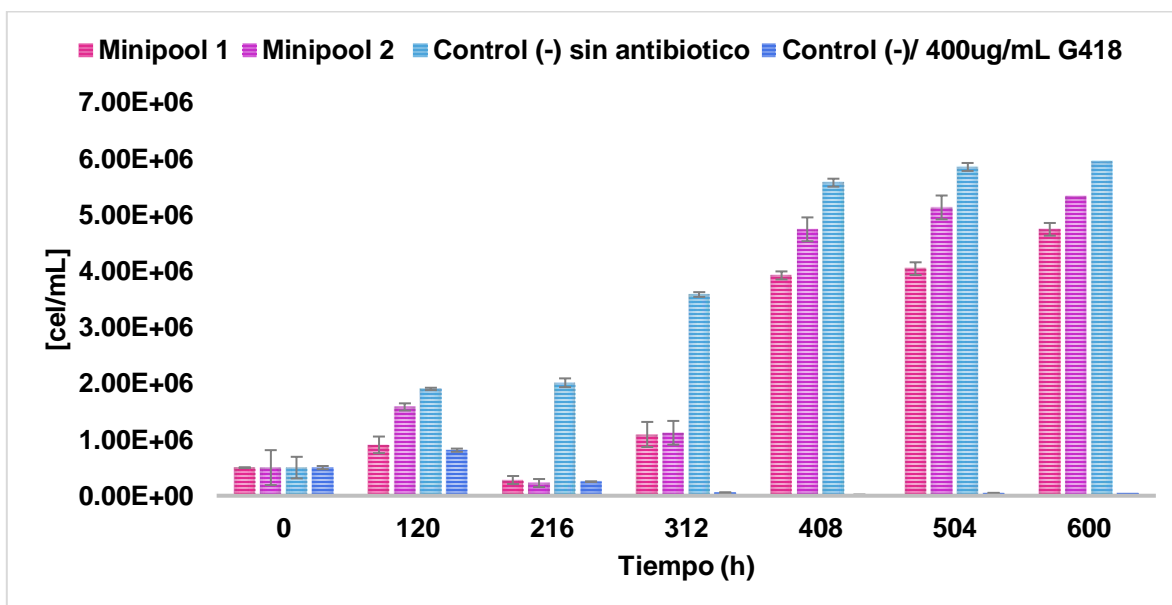
periodo se monitoreo la viabilidad utilizando el método de tinción por exclusión de azul de tripano.

La selección policlonal se muestra en las **Figura 24 y Figura 25**, al tiempo 0 h la viabilidad es del 97 % y una concentración inicial de 500,000 cel/mL. Pasado el tiempo post-transfección se observa como la viabilidad de las células transfectadas como del control negativo de transfección (células CHO-S sin transfectar) con antibiótico comienza a disminuir hasta las 216 h, esto se debe que las células que no tuvieron la capacidad de adquirir el plásmido se están muriendo debido a la presencia de antibiótico en el medio de cultivo. Para las 312 h aumenta la viabilidad, así como la concentración celular de las células transfectadas hasta llegar a una viabilidad por arriba del 80 % a las 600 h y una concentración de alrededor de los 4 millones de cel/mL. Esto indica que las células que adquirieron el plásmido están generando resistencia al antibiótico debido al gen de selección del plásmido, obteniendo aquí los dos Minipools de la selección policlonal.

No así para el control negativo de transfección con antibiótico, ya que aquí se muestra una clara tendencia a la disminución de la viabilidad, indicando que éstas están muriendo, con esto se comprueba que las células no generaron resistencia al antibiótico por sí solas y que la transfección fue eficiente. Por otra parte, en el control negativo (células CHO-S sin transfectar) sin antibiótico la viabilidad se mantiene entre un 80 y un 90 % y se alcanza una concentración de  $5.8 \times 10^6$  cél/mL indicando de igual manera que el control negativo de transfección con antibiótico no disminuye su viabilidad debido a la falta de nutrimentos o debido a las condiciones de cultivo (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100 rpm).

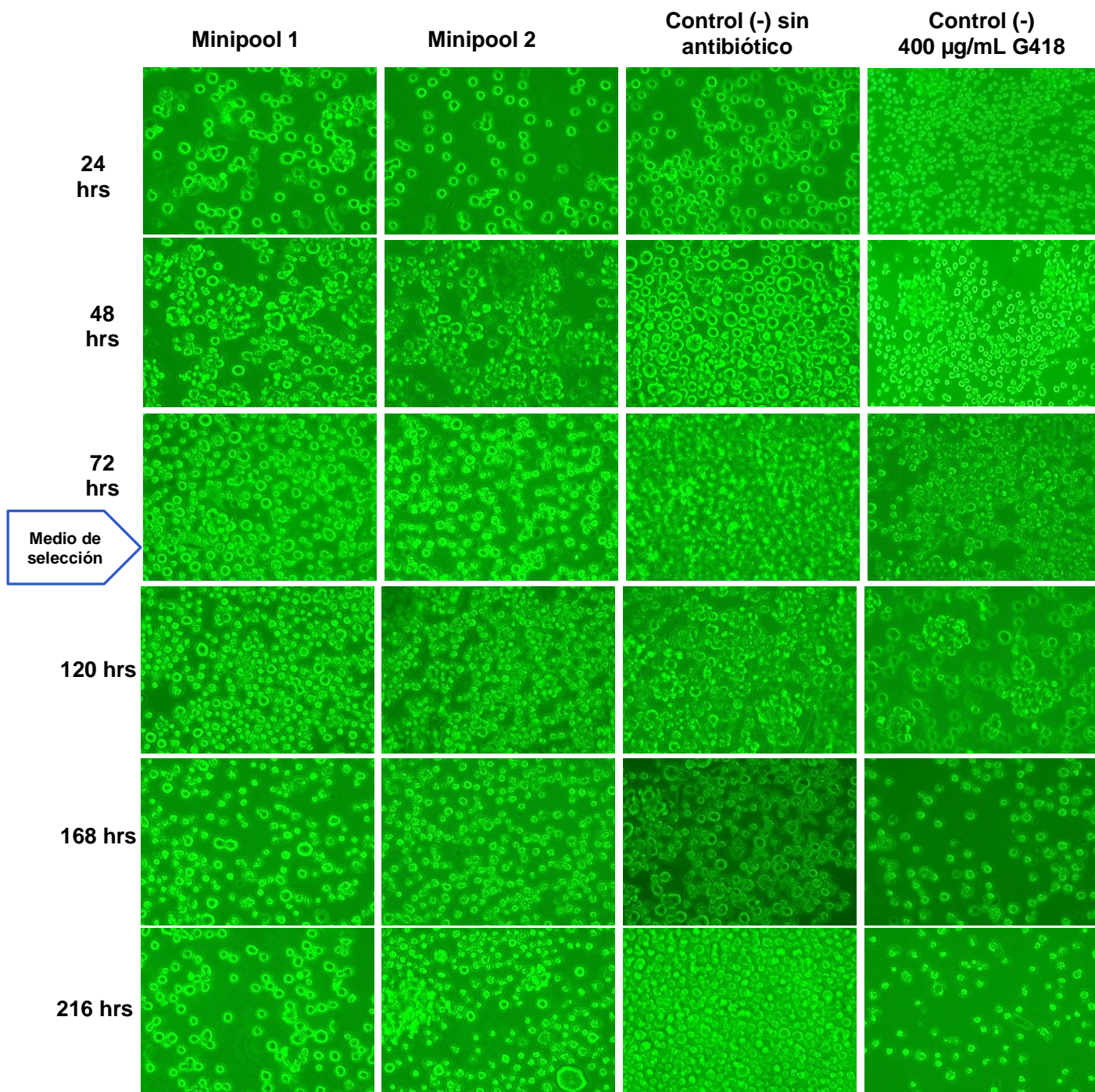


**Figura 24. Viabilidad de las células CHO-S transfectadas con el plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$  mediante lipofección durante la selección policlonal.** Medio de selección utilizado: Excell Advanced CHO medio, 8mM Glutamina, 400  $\mu$ g/mL de antibiótico G418. Realizada en placas de 6 pozos, manteniéndose en condiciones de crecimiento (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 rpm). Con una densidad celular inicial de 500,000 cel/mL, con seis pases.

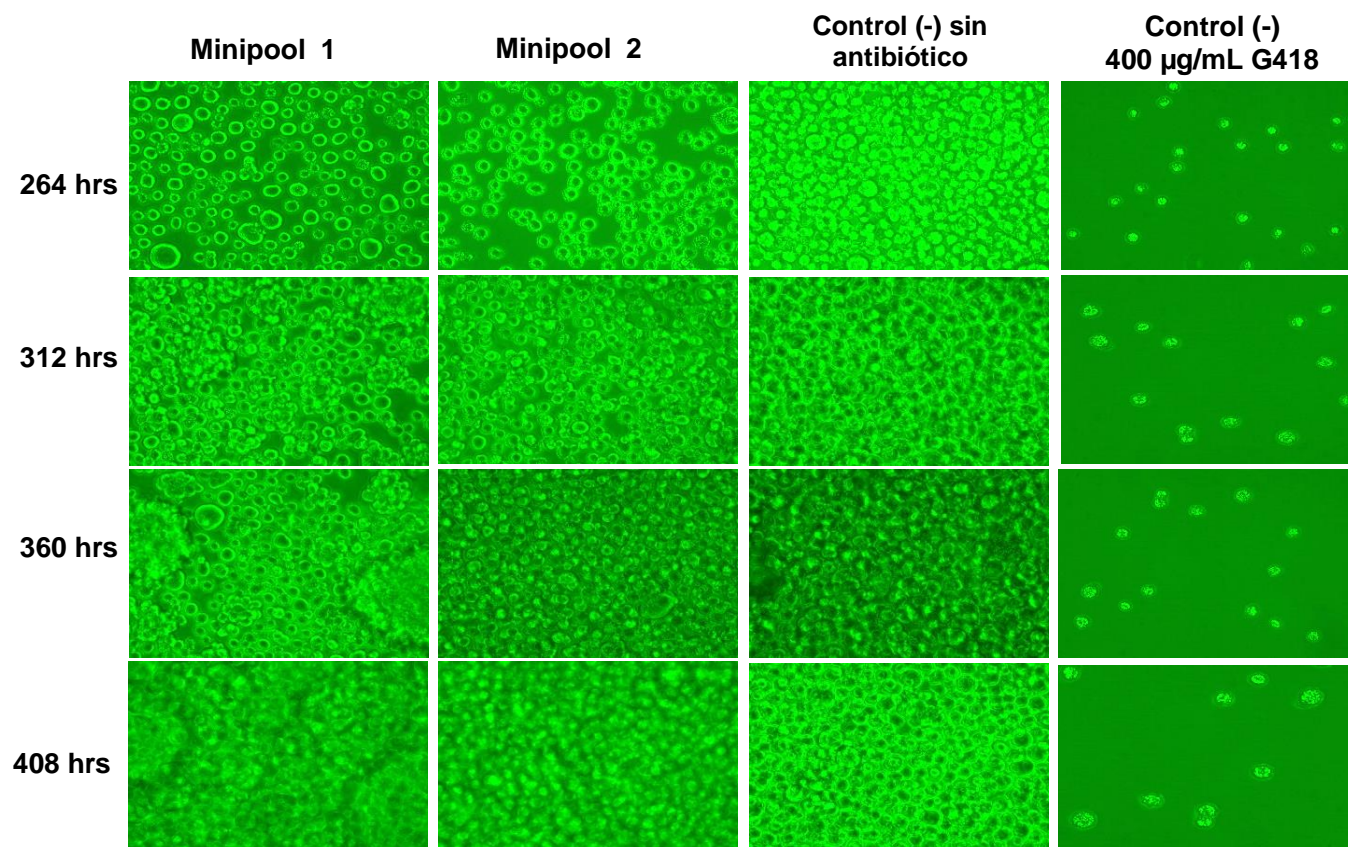


**Figura 25. Conteo de las células CHO-S transfectadas con el plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$  mediante lipofección durante la selección policlonal (CV/mL).** Medio de selección utilizado: Excell Advanced CHO medio, 8mM Glutamina, 400  $\mu$ g/mL de antibiótico G418. Realizada en placas de 6 pozos, manteniéndose en condiciones de crecimiento (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 rpm). Con una densidad celular inicial de 500,000 cel/mL, con seis pases.

La morfología de las clonas transfectadas, así como de los controles de transfección de las células CHO-S se muestran en la **Figura 26**, se tomaron fotos de forma periódica a partir de las 24 h post-transfección con el objetivo 20X en un Microscopio Confocal Zeiss Axioskop del cultivo. Se observó que tanto el número de células por campo de las clonas transfectadas como del control negativo de transfección (células CHO-S sin transfectar) con antibiótico comienza a disminuir hasta las 216 h siendo mayor el efecto visual en el control negativo de transfección con antibiótico, por otra parte, en el control negativo de transfección sin antibiótico el número de células comienza a aumentar después de las 24 h post-transfección. Para las 120 h se tiene una disminución en la cantidad de células debido al efecto mencionado anteriormente y después de las 212 h se observa un aumento en la cantidad de células, lo cual correlaciona perfectamente con los datos obtenidos durante el control de viabilidad.







**Figura 26. Morfología del cultivo de la transfección y selección policlonal de la línea celular CHO-S con el plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ .** Fotografías tomadas a 20X, Microscopio Confocal Zeiss Axioskop a partir de las 24 h post-transfección. La transfección fue realizada en placas de 6 pozos con un volumen de 2 mL por pozo, manteniéndose en condiciones de crecimiento (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 rpm). Medio de selección utilizado: Excell Advanced CHO medio, 8mM Glutamina, 400 µg/mL de antibiótico G418. Con una densidad celular inicial de 500,000 cel/mL, con seis pases.

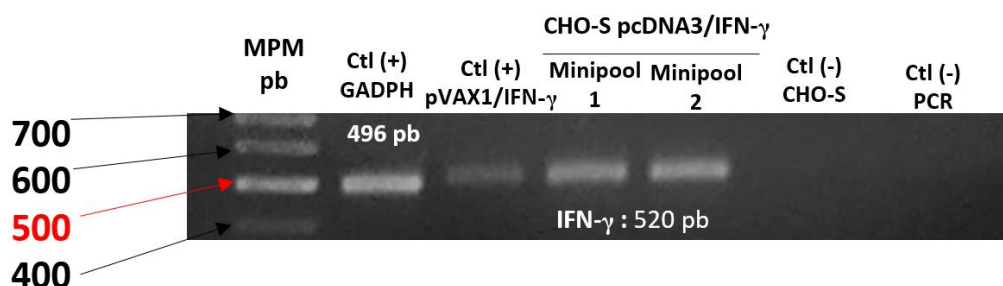
#### 8.4.2. Análisis de la expresión génica y proteica de interferón gamma.

Posterior a la selección policlonal se evaluó la capacidad de transgénesis del plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$  en la línea celular CHO-S así como la expresión de la proteína IFN- $\gamma$  realizando los siguientes análisis: RT-PCR para evaluar la transcripción de los genes mediante el análisis de los ARNm y ELISA para cuantificar la cantidad expresada.

#### 8.4.2.1. Análisis del ARNm de IFN- $\gamma$ en células transfectadas, mediante RT-PCR.

Se verificó que la línea celular CHO-S internalizara el vector pcDNA3/IFN- $\gamma$  y fuera capaz de generar los transcritos de ARNm. Para ello, se realizó la extracción del ARN total de los Minipools transfectados y de un control negativo (células CHO-S sin transfectar y sin antibiótico) pasado un mes de selección con antibiótico.

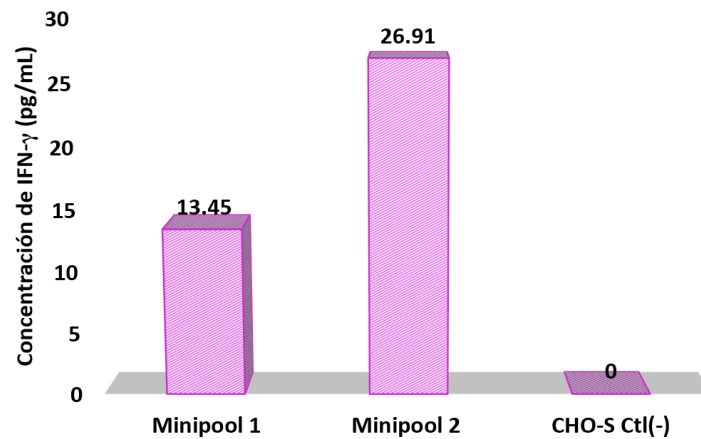
En la **Figura 27** se reporta el RT-PCR de la amplificación del gen completo de IFN- $\gamma$  con un tamaño de 520 pb a partir de las clonas transfectadas, lo cual demuestra que el transgén fue transfectado a las células blanco de manera eficiente. Además, la línea celular CHO-S es capaz de producir los transcritos de ARNm de IFN- $\gamma$ .



**Figura 27. Análisis del ARNm para IFN- $\gamma$  por RT-PCR en cultivos de CHO-S transfectados con el plásmido pcDNA3/IFN- $\gamma$ .** Los carriles 4 y 5 muestran la amplificación de los transcritos de IFN- $\gamma$  en 520 pb demostrando que el transgen fue transferido a las células blanco de manera eficiente. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (80 v, 150 mA, 1h).

#### 8.4.2.2. Cuantificación de IFN- $\gamma$ por la técnica de ELISA.

Con la finalidad de comprobar si la línea celular CHO-S es capaz de expresar y secretar IFN- $\gamma$  al medio de cultivo, se llevó a cabo la cuantificación de dicha proteína mediante la técnica de ELISA. De los Minipools obtenidos en la selección policlonal se recolectaron sobrenadantes de 168 h de cultivo. De la curva de calibración obtenida en las diluciones seriadas (estándar de interferón gamma) para la interpolación de las densidades ópticas y la consecuente determinación de la concentración se obtuvo la ecuación de la línea recta;  $y = 0.0197x + 0.2271$ , se despejó y se determinó la concentración de interferón gamma producido la cual se muestra en la **Figura 28**. Con base a estos resultados se corrobora que la línea celular es capaz de producir y secretar la proteína al medio de cultivo.



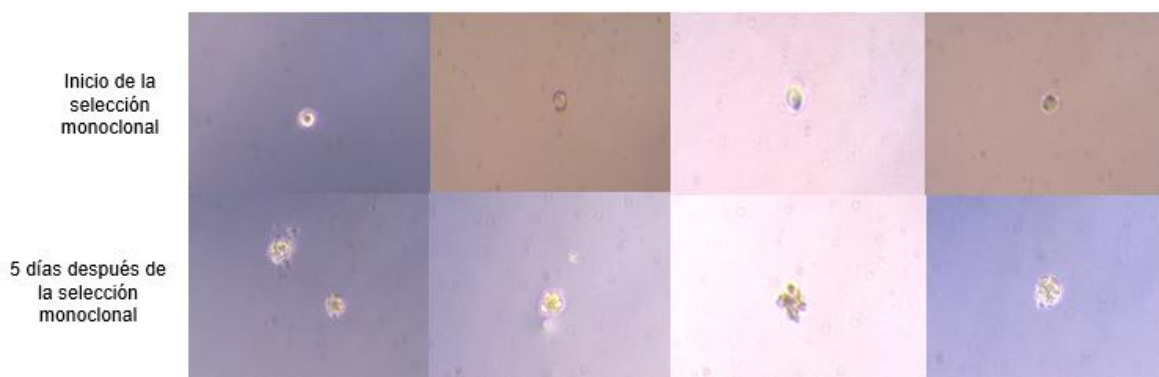
**Figura 28. Cuantificación de IFN-γ producido a partir de los Minipools 1 y 2 mediante ELISA.**

### 8.4.3. Selección clonal.

Una vez que la expresión de la población policlonal fue verificada por RT-PCR, Western Blot y ELISA se procedió a realizar la selección clonal empleando dos metodologías; clonación unicelular y dilución limitada suplementada con medio metabolizado. Los resultados de ambas metodologías se muestran a continuación.

#### 8.4.3.1. Clonación unicelular.

Al realizar la selección clonal mediante la clonación unicelular se montó una placa de 96 pozos colocando 10-15 células transfectadas/mL. Para limitar la dilución a 100 µl/pozo se sembraron estadísticamente 1-1,5 células por pocillo y se dejaron estabilizar durante 1-5 días. En la **Figura 29** se observa que después de un periodo de 5 días hay una morfología típica de muerte celular, es decir que debido a que se encontraba una única célula no tuvo la capacidad de proliferar.

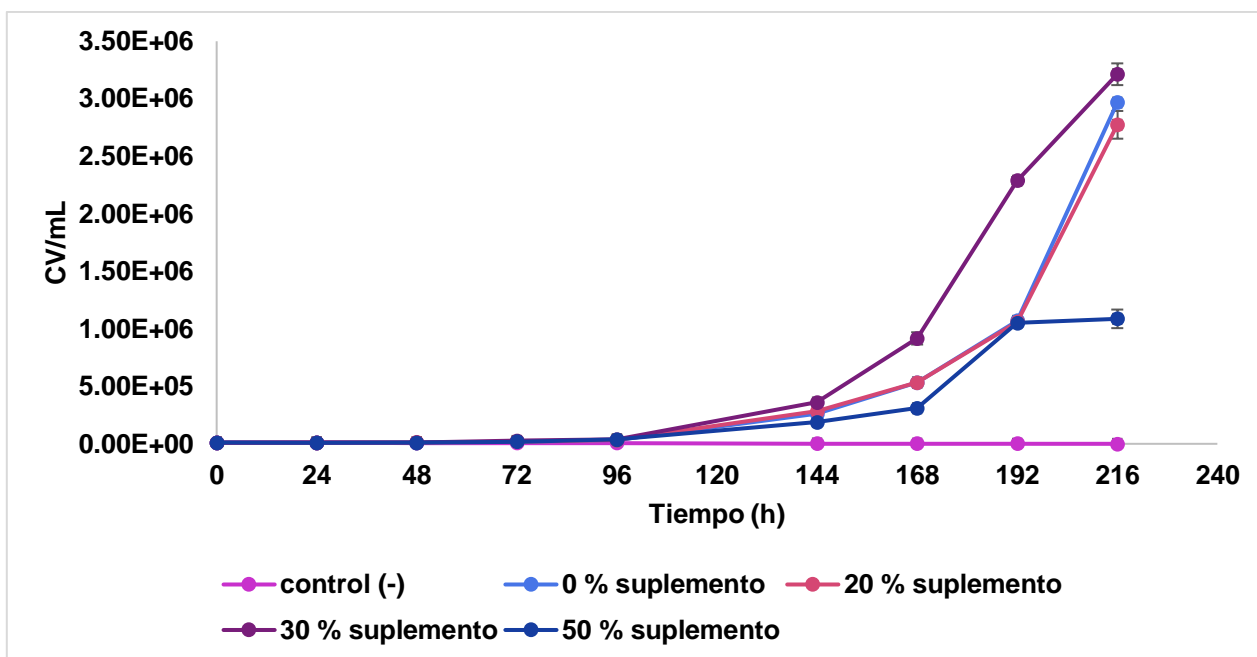


**Figura 29. Morfología de la selección clonal utilizando el método de clonación unicelular.** Fotografías tomadas a 20X, Microscopio Confocal Zeiss Axioskop. La selección clonal fue realizada en placas de 96 pozos con un volumen de 100  $\mu$ L por pozo, manteniéndose en condiciones de crecimiento (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 rpm). Medio de mantenimiento utilizado: Excell Advanced CHO medio, 8mM Glutamina. Colocando de 1-1.5 cél/pozo.

#### **8.4.3.2. Dilución limitada suplementada con medio metabolizado.**

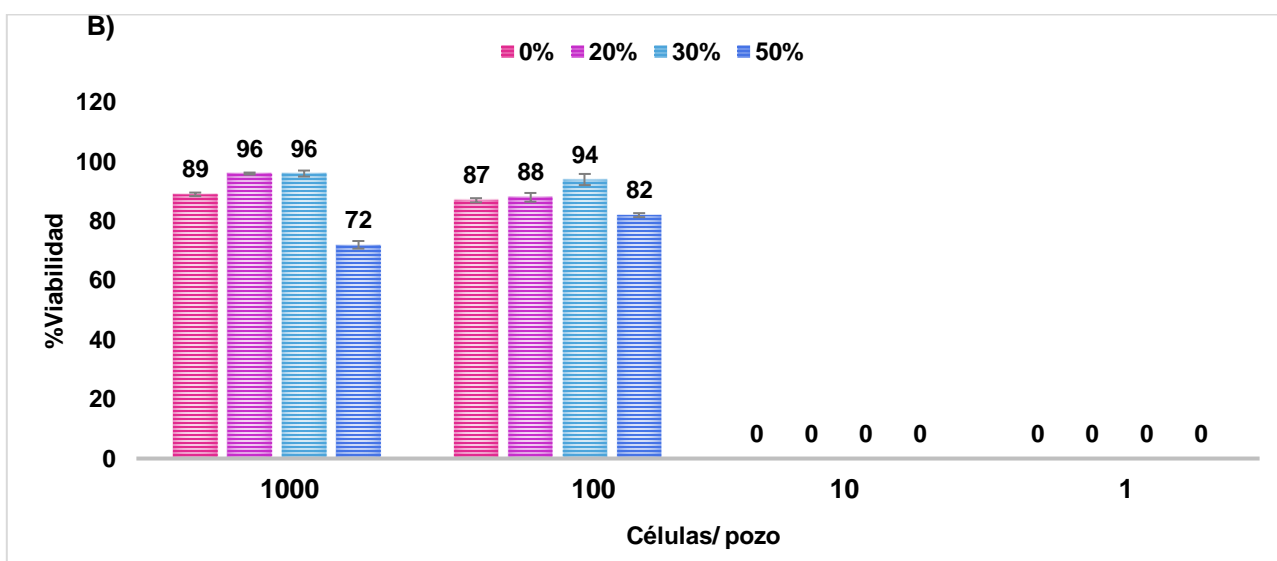
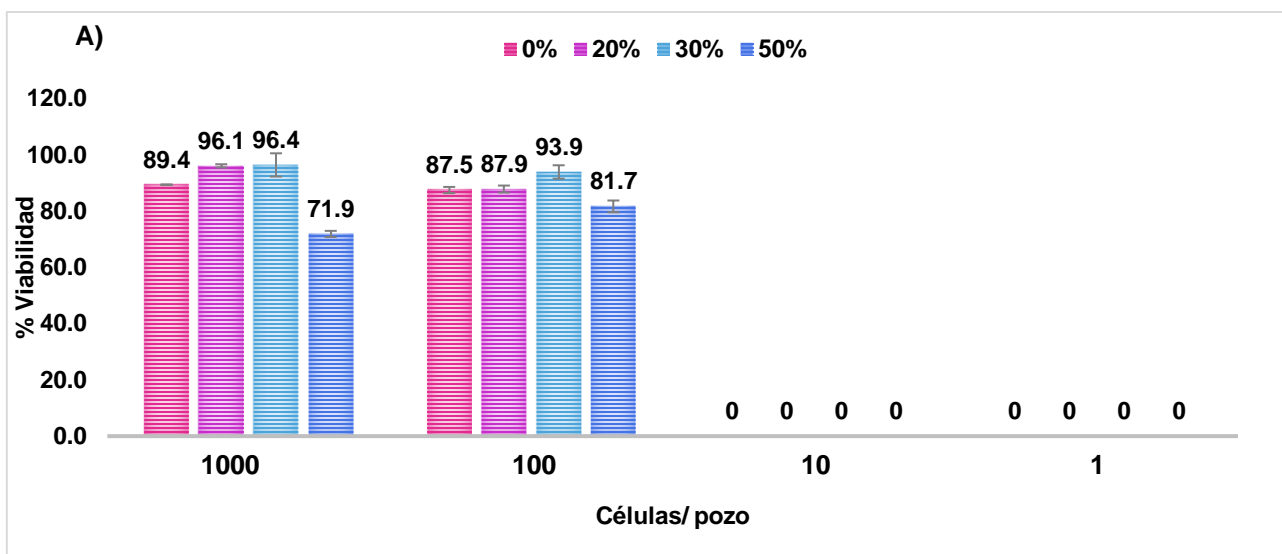
Una vez que se determinó que la metodología de selección por clonación unicelular no fue efectiva se optó por emplear una segunda metodología que incluyera los factores de crecimiento faltantes en el medio de cultivo. Se utilizó medio metabolizado para suplir la carencia de factores de crecimiento en el medio de cultivo para la selección clonal y así inducir la proliferación celular.

Se llevó a cabo una evaluación del porcentaje adecuado a utilizar del medio metabolizado mediante una cinética de crecimiento celular colocando una densidad inicial de 10,000 cél/pozo en placas de 12 pozos con diferentes porcentajes (0 %, 20 %, 30 % y 50 %) del medio metabolizado y se monitoreó durante 216 h cuantificando cada 24 h la viabilidad celular. Los resultados se muestran en la **Figura 30**, la mejor condición de medio metabolizado a utilizar es la del 30 %, ya que aquí es donde se obtiene un mayor número de células por mL.



**Figura 30. Evaluación del porcentaje de suplemento con medio metabolizado en la selección clonal del sistema CHO-S/pcDNA/IFN- $\gamma$ .** Realizada por duplicado en placas de 12 pozos, manteniéndose en condiciones de crecimiento (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 rpm), en medio Ex cell Advanced CHO, 8mM Glutamina, con una densidad inicial 10,000 cél/mL. Cada 24 h se recogió un pozo.

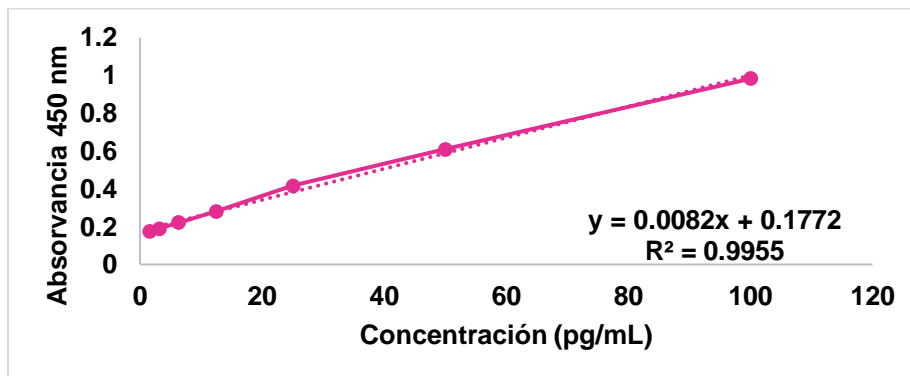
Independientemente de los resultados obtenidos en la evaluación del porcentaje de medio metabolizado se montó una placa de 96 pozos con un volumen final de 100  $\mu$ L, con los dos Minipools obtenidos en la selección policlonal para la selección clonal utilizando los diferentes porcentajes de medio metabolizado (0 %, 20 %, 30 % y 50 %), se colocaron 1, 10, 100 y 1000 cél/pozo y se dejó proliferar por 12 días. Se contó la viabilidad en cada condición para poder seleccionar las clonas con mayor porcentaje de viabilidad. La **Figura 31**, indica que no hubo proliferación en las clonas de 1 y 10 cél/pozo ni con el porcentaje más alto de medio metabolizado, por otra parte, en las clonas de 100 y 1000 células por pozo hubo un aumento en la proliferación celular siendo la mejor condición de selección con 30 % de medio metabolizado corroborando así los resultados obtenidos en la evaluación del porcentaje de medio.



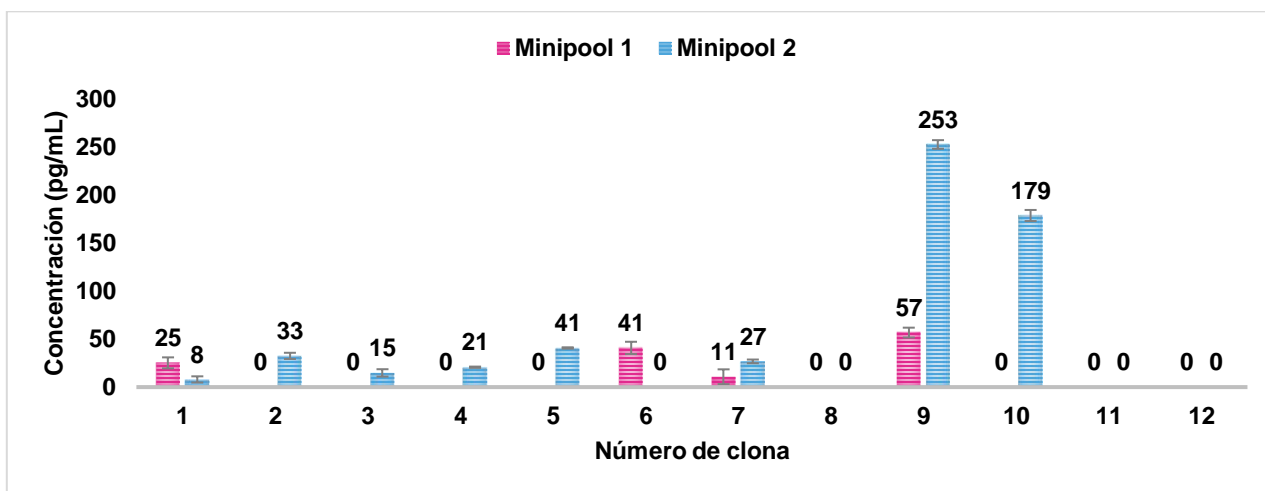
**Figura 31. Viabilidades obtenidas de la selección clonal. A) Minipool 1. B) Minipool 2.** Realizada en placa de 96 pozos, manteniéndose en condiciones de crecimiento (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 rpm), en medio Ex cell Advanced CHO, 8mM Glutamina, con diferentes concentraciones celulares (1, 10, 100 y 1000 cél/pozo) y porcentajes de medio metabolizado (0 %, 20 %, 30 % y 50 %).

A partir de la placa de 96 pozos se tomaron las clonas con mayor confluencia, se pasaron a placa de 24 pozos y se dejaron crecer durante 168 h, se tomó el sobrenadante y se cuantificó la producción de la proteína IFN- $\gamma$  mediante un ELISA y de esta manera se seleccionaron las clonas súperproductoras. Se obtuvo la ecuación de la recta a partir de la curva estándar de IFN- $\gamma$  (**Figura 32**) con una R<sup>2</sup> de 0.995 para interpolar las absorbancias obtenidas y así realizar la cuantificación de la proteína producida por cada clona.

En la **Figura 33** se obtiene la cuantificación de proteína, las clonas más productoras fueron obtenidas del Minipool 2; clona 9 produciendo 258.2 pg/mL, clona 10 produciendo 178.8 pg/mL y a partir de ahí se obtuvieron clonas con producción por debajo de 57 pg/mL.



**Figura 32. Curva estándar de IFN-γ.** Se muestra curva estándar de IFN-γ obtenida por la técnica de ELISA, así como la ecuación de la recta con la cual se determinó la concentración de IFN-γ mediante la interpolación de la densidad óptica obtenida en cada ensayo.

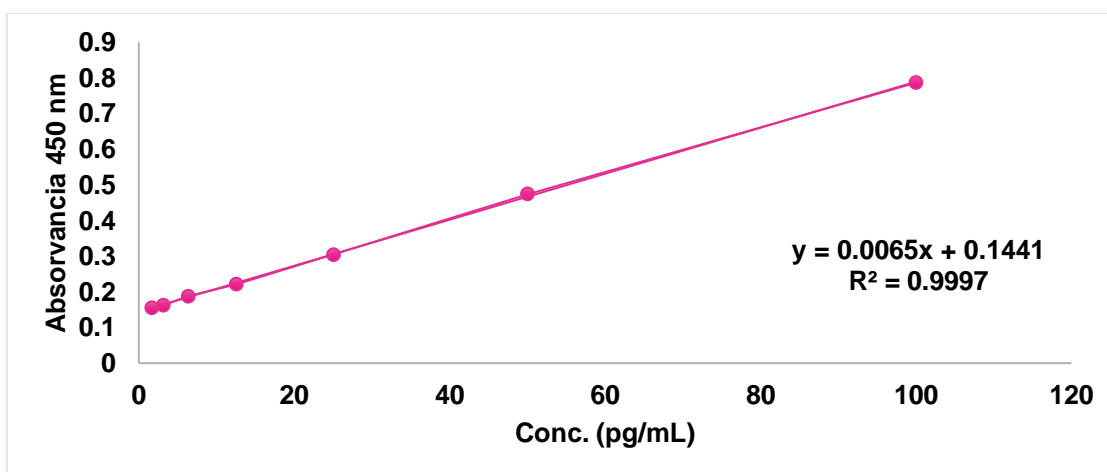


**Figura 33. Producción de la proteína IFN-γ 168 h post selección clonal.** Se realizó en placa de 24 pozos y se mantuvo en cultivo durante 168 h, manteniéndose en condiciones de crecimiento (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 rpm), en medio Ex cell Advanced CHO, 8mM Glutamina, 400 µg/mL de G418. Se obtuvieron dos clonas súperproductoras de la proteína.

Las clonas súperproductoras 9 y 10 del Minipool 2 se sometieron a una segunda selección clonal para aumentar la producción de interferón gamma y tener clonas homogéneas. En placa de 96 pozos se colocaron 100 cél/ pozo y se dejaron proliferar por 12 días, las clonas con mayor confluencia se pasaron a una placa de 24 pozos y se dejaron en cultivo durante

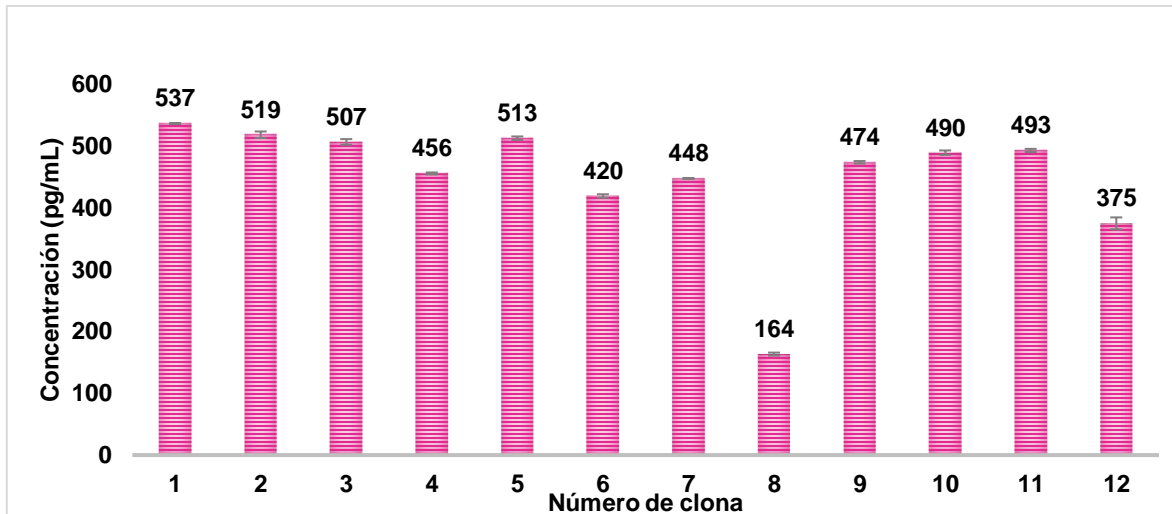
168 h. Se tomó el sobrenadante de las 12 clonas más confluentes y se cuantificó la producción de la proteína IFN- $\gamma$  mediante un ELISA y de esta forma obtener las clonas súperproductoras.

De la curva estándar de IFN- $\gamma$  realizada se obtuvo la ecuación de la recta  $y = 0.0065x + 0.1441$  (**Figura 34**) con una  $R^2$  de 0.9997. En la **Figura 35** se muestran los resultados de la cuantificación de proteína de los SN de las clonas, logrando obtener 4 clonas que producen más de 500 pg/mL, con estas modificaciones se aumentó la producción de la proteína a más del doble y con mayor homogeneidad.



**Figura 34. Curva estándar de IFN- $\gamma$ .** Se muestra curva estándar de IFN- $\gamma$  obtenida por la técnica de ELISA, así como la ecuación de la recta con la cual se determinó la concentración de IFN- $\gamma$  mediante la interpolación de la densidad óptica obtenida en cada ensayo.





**Figura 35. Producción de la proteína IFN- $\gamma$  168h post selección clonal.** Se realizó en placa de 24 pozos y se mantuvo en cultivo durante 168 h, manteniéndose en condiciones de crecimiento (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 rpm), en medio Ex cell Advanced CHO, 8mM Glutamina.

## 8.5. Caracterización del sistema estable CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$ .

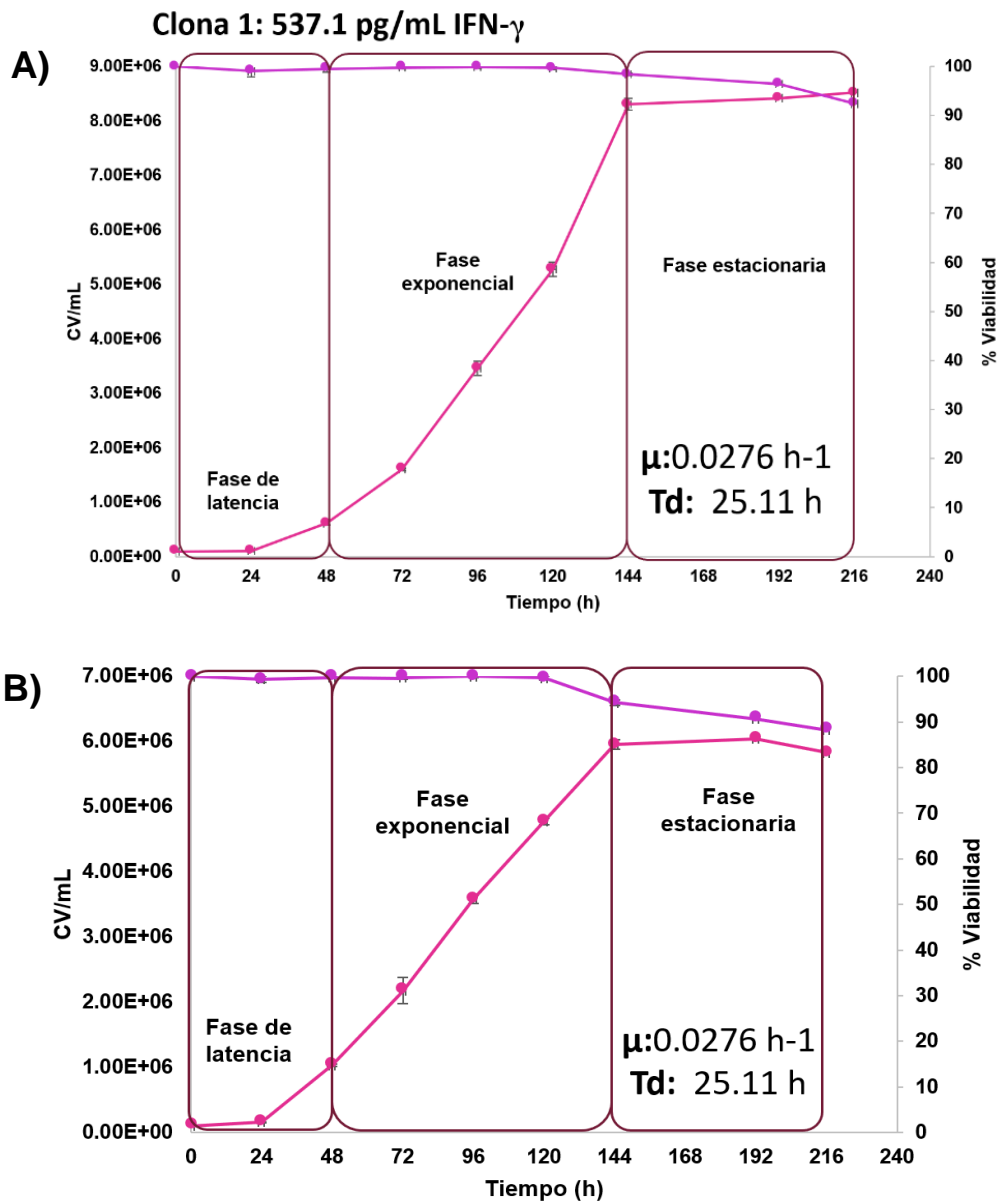
Se seleccionaron las dos clonas sobreproductoras de IFN- $\gamma$  para su caracterización mediante cinéticas de crecimiento, la identificación y cuantificación de la proteína y sus transcritos mediante RT-PCR y ELISA.

### 8.5.1. Cinética de crecimiento.

De las dos clonas súperproductoras de IFN- $\gamma$  obtenidas se inició su amplificación en cajas T de 75 cm<sup>2</sup> y su posterior caracterización con cinéticas de crecimiento en matraces de 125 mL, esto por triplicado. En la **Figura 36** se distinguen tres de las cuatro etapas características del crecimiento celular; fase de latencia o de adaptación, Fase log o exponencial y fase estacionaria.

Una vez determinada la curva de crecimiento, se calculó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) utilizando la ecuación de la línea recta ( $y = 0.0276x + 0.579$ ) obtenida en la etapa exponencial. La  $\mu$  es la misma para ambas clonas con un valor de 0.0276 h<sup>-1</sup>. De este valor se determinó el tiempo de duplicación, el cual corresponde a 25.11 h para ambas clonas. Si se compara con las clonas no productoras (ver sección 8.3.1) se tiene un aumento en el tiempo de duplicación por diez horas, esto podría deberse a un cambio metabólico en las células, ya que no solo produce sus propias proteínas celulares, sino que

también la proteína de interés (IFN- $\gamma$ ) y a la adaptación a la presión selectiva que se le está ejerciendo con medio de selección.

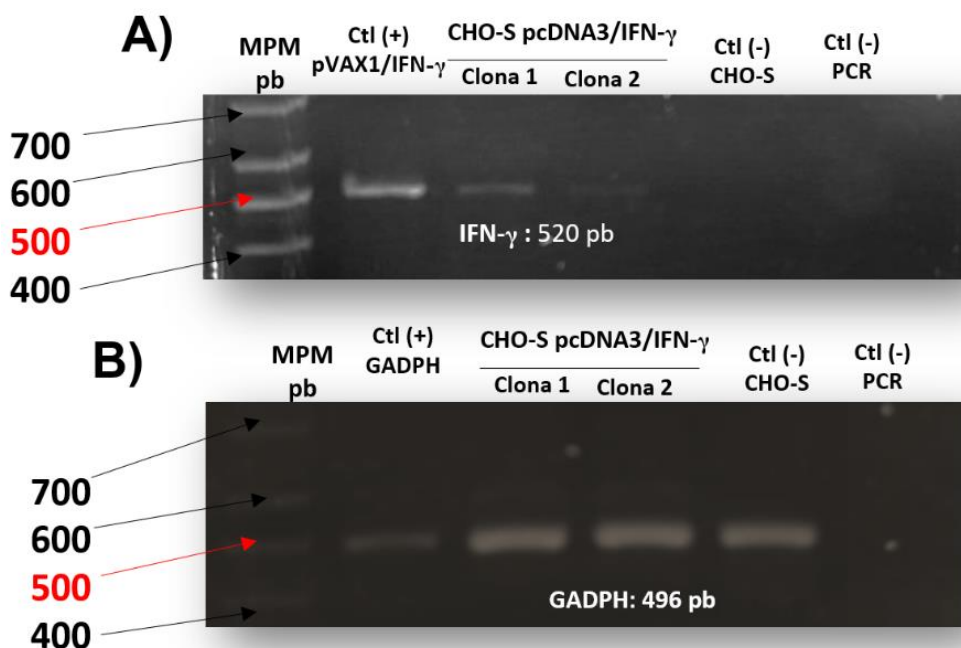


**Figura 36. Cinética de crecimiento del sistema CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$ .** Realizada en matraces de 125 mL, manteniéndose en condiciones de crecimiento (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 rpm), en medio Ex cell Advanced CHO medio, 8mM Glutamina, con una densidad inicial 100,000 cel/mL. Cada 24 h se recogió una muestra. **A) Clona 1**, con una producción de 537.1 pg/mL de IFN- $\gamma$ . **B) Clona 2**, con una producción de 518.8 pg/mL de IFN- $\gamma$ .

### 8.5.2. Análisis de la expresión génica y proteica de interferón gamma.

Para asegurar que las clonas súperproductoras de IFN- $\gamma$  aún se encontraban produciendo dicha proteína se evaluó la capacidad la expresión de la proteína realizando los siguientes análisis.

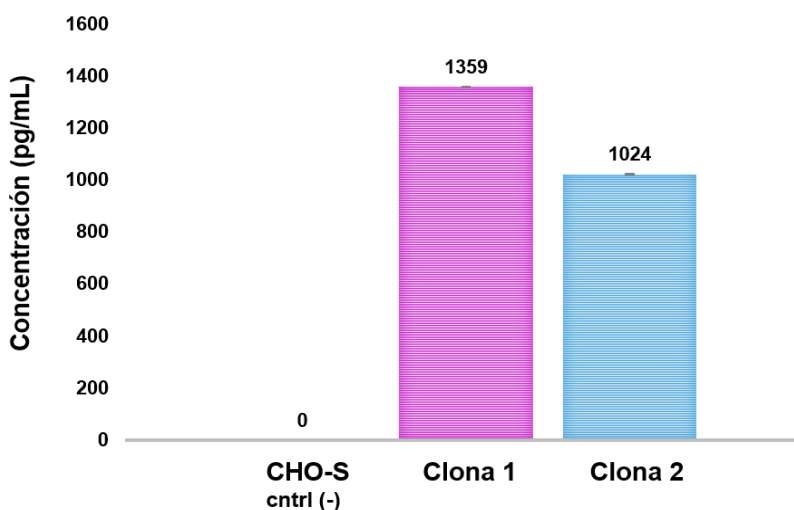
Se utilizó RT-PCR para evaluar la transcripción de los genes mediante el análisis de los ARNm extrayendo ARN total de las células. Los resultados se muestran en la **Figura 37**, donde ambas clonas aún se encuentran produciendo transcritos del gen de interés.



**Figura 37. Análisis del ARNm para IFN- $\gamma$  por RT-PCR del sistema CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$ . A) amplificación de IFN- $\gamma$ , se muestran baandas con un peso de 520 pb correspondientes al transgen de interés. B) amplificación de GADPH, un gen constitutivo control con un tamaño de 496 pb. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (80 v, 150 mA, 1h).**

Se realizó la cuantificación de IFN- $\gamma$  mediante ELISA posterior a 10 generaciones de selección clonal de ambas clonas para determinar si la producción de la proteína permanecía constante. Se analizó el sobrenadante obtenido de un cultivo en caja T 75 cm<sup>2</sup> posterior a 168 h de un cultivo células CHO-S sin transfectar (control negativo), las clonas 1 y 2, con una densidad celular de 1.6X10<sup>6</sup> cél/mL para la clona 1 y 1.16X10<sup>6</sup> cél/mL para clona 2. De la curva estándar de IFN- $\gamma$  se obtuvo la ecuación de la recta para interpolar las absorbancias obtenidas y realizar la cuantificación de la proteína producida por cada clona.

En la **Figura 38** se muestra la cuantificación de proteína con una producción mayor a 1 ng/mL, siendo mayor a la cantidad que se obtuvo en el análisis anterior, esto puede deberse al tamaño de cultivo utilizado y por lo tanto la densidad celular presente, factores que influyeron en la obtención de una mayor concentración de IFN- $\gamma$



**Figura 38. Producción de la proteína IFN- $\gamma$  posterior a 168h de cultivo.** Se realizó en placa T 75 cm<sup>2</sup> manteniéndose en condiciones de crecimiento (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 rpm), en medio Ex cell Advanced CHO, 8mM Glutamina,

Se determinó la productividad específica por célula de ambas clonas tomando en cuenta la densidad celular al finalizar cultivo (168 h). En la **Tabla 17** se observa que de acuerdo con los datos obtenidos la productividad aumento relativamente en un 5 %. La relevancia de este análisis radicó en comprobar que las clonas seleccionadas permanecen produciendo la proteína de interés a través de varias generaciones sin perder la capacidad de expresión.

**Tabla 17. Producción específica de proteína del sistema CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$ .**

	<b>Condición</b>	<b>concentración de IFN-<math>\gamma</math> producido pg/mL</b>	<b>Concentración celular a 168 h CV/mL</b>	<b>Producción específica (pg/mL/cél.)</b>
	Durante selección clonal	537.1	9.52X10 <sup>5</sup>	5.64 x10 <sup>-4</sup>
	10 generaciones			
<b>Clona 1</b>	post-selección	1359.29	1.60 x10 <sup>6</sup>	8.50 x10 <sup>-4</sup>
	Durante selección clonal	518.8	7.12 x10 <sup>5</sup>	7.29 x10 <sup>-4</sup>
	10 generaciones			
<b>Clona 2</b>	post-selección	1024.31	1.16 x10 <sup>6</sup>	8.83 x10 <sup>-4</sup>

## IX. DISCUSIÓN.

Los IFN tipo II debido a su actividad inmunomoduladora y antitumoral los convierten en moléculas terapéuticas de éxito para el uso clínico. Hasta la fecha, el sistema de expresión más utilizado y eficiente para la producción de IFN- $\gamma$  recombinante es el *E. coli* debido a la facilidad de las técnicas de recombinación y la alta productividad, sin embargo, los sistemas de expresión bacteriana tienen muchas desventajas (Catriona H.T. Miller, Stephen G. Maher 2017). Una de las mayores desventajas es que este sistema no tiene la capacidad de glicosilar por consecuencia tiene una vida media corta cual limita su eficacia, la solubilidad, la resistencia a proteasas y la producción es costosa debido a la formación de cuerpos de inclusión y a la contaminación por endotoxinas (Curling et al. 1990).

Para superar las insuficiencias de los sistemas de expresión bacteriano, la proteína IFN- $\gamma$  también se han expresado en otros sistemas (**Tabla 1**). Sólo algunos de estos sistemas de expresión dieron resultados satisfactorios en cuanto a rendimiento, estabilidad fisicoquímica y actividad biológica (Razaghi, Owens, and Heimann 2016).

Al día de hoy se ha demostrado que el uso de líneas celulares de mamífero como CHO y HEK293 son los hospederos de elección para la producción de glicoproteínas como el IFN- $\gamma$ , dada a sus propiedades de generar modificaciones postraduccionales complejas, plegamiento correcto de la proteína y tener la capacidad de excretar el producto al medio de cultivo para su posterior purificación (Bandaranayake and Almo 2014; Lalonde and Durocher 2017). Empresas como AcroBiosystem y SinoBiological producen de manera comercial el IFN- $\gamma$  expresado en HEK293 y CHO consecutivamente (de manera estable) con patrones de glicosilación similares al humano (19-26 KDa), sin embargo, únicamente son utilizadas como estándares de referencia (AcroBiosystems 2019; Sino Biological 2007).

Bajo este tenor dentro del grupo de biotecnología farmacéutica del laboratorio 7 de la Facultad de farmacia, se ha tenido gran interés en producir la proteína interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) dirigiéndola a el uso como proteína terapéutica. Desarrollando sistemas transitorios de producción en células de mamífero como hospederos para obtener proteínas con glicosilaciones similares a la proteína nativa. Se ha observado que el uso de sistemas transitorios utilizando el adenovirus pAd5/IFN- $\gamma$  han demostrado bajos rendimientos en la producción de dicha proteína a pesar de utilizar células de mamíferos, produciendo 19.2

pg/mL como mayor concentración (Sosa-García 2018). Uno de los inconvenientes de este enfoque es la necesidad de grandes cantidades de ADN recombinante, es decir que al ser un sistema transitorio este tiene un periodo corto de producción y se requiere transfección constante de las células HEK293, además de tener bajas producciones de la proteína (Bandaranayake and Almo 2014).

Se sabe que el caballito de batalla de la producción de proteínas de mamíferos (especialmente a escala industrial) es la línea celular CHO, produciendo hoy en día al rededor del 70% de la proteínas complejas que se encuentran en el mercado (Walsh 2018). Esto se debe a su inigualable adaptabilidad, permitiendo el crecimiento de estas células a altas densidades en cultivos de suspensión y facilita la adaptación a las condiciones libres de suero, teniendo una producción de proteínas recombinantes más segura, al haber menos riesgo de contaminación viral y priónica por el suero bovino (Kuo et al. 2018; Sathyamurthy et al. 2015). Por ello en el presente estudio se buscó generar un sistema estable de producción la proteína IFN- $\gamma$  con la finalidad de obtener concentraciones mayores a los sistemas transitorios empleando el sistema CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$ .

Para lograr el objetivo de este estudio se dividió en cuatro partes principales; 1) construcción molecular del vector de expresión pcDNA3/IFN- $\gamma$ . 2) Caracterización de la línea celular CHO-S. 3) La generación del sistema estable CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$  mediante inserción aleatoria del vector en el genoma celular inducido por presión selectiva con antibiótico G418. 4) La caracterización del sistema productor.

Para la construcción molecular del vector de expresión pcDNA3/IFN- $\gamma$  se utilizó a pVAX1/IFN- $\gamma$  (construido por Romero-Martínez, 2014) como plásmido base para la obtención del transgen codificante para la proteína de interés. La construcción se llevó a cabo mediante el uso de las enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI*. Se obtuvo un vector un tamaño de 5920 pb el cual contiene la secuencia de nucleótidos codificantes para la proteína IFN- $\gamma$  humano. Corroborando con un análisis BLAST que la secuencia de nucleótidos pertenece a los ARNm que codifican a la proteína IFN- $\gamma$  humano siendo idéntica la secuencia.

Las células CHO-S generalmente se utilizan en la expresión estable o constitutiva de glicoproteínas por lo que la selección de clones, así como el trabajo molecular y su

estabilidad son puntos críticos para obtener una línea celular altamente productora (SELEXIS 2016) que genere glicoproteínas con patrones de glicosilación semejantes al humano (Michael Butler and Spearman 2014). Por ello fue importante realizar una caracterización mediante cinéticas de crecimiento con finalidad de obtener el tiempo de duplicación, la velocidad específica de crecimiento y un análisis del perfil metabólico. Los resultados obtenidos muestran las fases típicas en una curva crecimiento celular; fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte celular. Teniendo una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de 0.0454 hr<sup>-1</sup> y un tiempo de duplicación de 15.27 h, siendo este menor al reportado en por el proveedor (16-22 h (Invitrogen 2016)), este fenómeno se atribuye al tipo de medio que se utilizó (Excell Avanced CHO media) ya que es un medio químicamente definido y es utilizado para respaldar el crecimiento y la productividad de células CHO en cultivos alimentados por lotes (Millipore sigma 2015).

Para la evaluación del perfil metabólico de la línea celular se realizó un análisis en un analizador bioquímico YSI-2950 Life Sciences, por medio de biosensores capaces de reconocer un analito mediante reacciones enzimáticas. Una de las características de las células de crecimiento rápido como lo son las CHO-S, es el consumo rápido de glutamina, la cual aporta fuentes adicionales de carbono y nitrógeno para el crecimiento celular, producción de proteínas, esqueletos amino para generar otros aminoácidos a través de la transaminación útiles en la replicación de ADN (Zhou et al. 2010). Bajo las condiciones experimentales expuestas, la concentración de glucosa disminuyó de 6.45 g/L hasta agotarse completamente a las 192 h. de igual manera la concentración de glutamina fue disminuyendo de 1.19 g/L hasta agotarse por completo a las 168 h.

Por otro lado, el glutamato se produjo manera exponencial llegando a tener una concentración final de 0.80 g/L a las 264 h. mientras que la producción de lactato aumentó paulatinamente hasta las 144 h, para las 168 h se observó una disminución en la producción de dicho metabolito, esto es característico de las líneas celulares de células de crecimiento rápido como lo son las CHO-S, ya que al agotarse la glutamina debido al metabolismo mitocondrial de la célula inicia el consumo de lactato, esto lo hacen como una vía de supervivencia al existir baja concentración del nutrimento principal (glutamina) (Fischer, Handrick, and Otte 2015). El consumo de lactato intenta compensar la baja entrada de glutamina al ciclo del ácido tricarboxílico (Zagari et al. 2013). Es importante conocer el metabolismo celular del sistema productor, se sabe que las condiciones de cultivo, el estrés



celular y las altas concentraciones del producto recombinante pueden conducir a la agregación de proteínas, uno de los problemas más comunes asociados con la estabilidad de las proteínas (Rodriguez et al. 2005).

Los métodos tradicionales de integración durante la generación de sistemas de expresión estables requieren de marcadores de selección que permitirán obtener las células sobreproductoras (Lalonde and Durocher 2017), por lo que para generar el sistema CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$  se utilizó el antibiótico Geneticin (G418) como marcador de selección. El vector pcDNA3 (+) cuenta con un gen de selección con antibiótico Geneticin® (G-418) en eucariotes lo cual permite inducir la inserción al genoma celular de nuestro hospedero de manera aleatoria (Brödel, Sonnabend, and Kubick 2014). Los resultados de la curva de muerte muestran que la concentración de 400  $\mu\text{g/mL}$  elimina al 99% de las células, lo cual indica que esta es la concentración ideal para utilizarse durante la selección policlonal. G418 como marcador ha sido ampliamente utilizado para el desarrollo de sistemas estables, principalmente en células CHO (Hoffmann et al. 2004; Bi, Shuttleworth, and Al-Rubeai 2004; Thermo Fisher Scientific Inc. 2015).

Para la generación del sistema estable CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$  inicialmente se realizó la selección policlonal con el antibiótico G418, obteniendo dos Minipools con 80 % de viabilidad. Esto indica que las células que adquirieron el plásmido de manera eficiente generaron resistencia al antibiótico debido al gen de selección y tienen la capacidad de proliferar bajo presión selectiva (Durocher and Butler 2009). Se demostró que ambos Minipools producían la proteína de interés mediante RT-PCR para evaluar la transcripción de los genes y un ELISA obteniendo una concentración máxima de 26.91  $\mu\text{g/mL}$  de IFN- $\gamma$ .

Una vez que la expresión estable de la población policlonal fue analizada se procedió a realizar la selección clonal empleando dos metodologías; Clonación unicelular siguiendo el protocolo de Zitzmann et al. descrito en 2018, el cual consistía en colocar 1-5 célula por pozo en una placa de 96 pozos para así a partir de una única clona se obtuvieran células súperproductoras. Los resultados de este método muestran que no hubo proliferación celular, esto podría deberse a que al encontrarse una única algunas líneas celulares tienden a no crecer bien en cultivos dispersos/individuales debido a la falta de factores de crecimiento secretados, por lo que no todos los tipos de células podrán crecer en las condiciones descritas en este protocolo (Sathyamurthy et al. 2015; Freshney 2005), siendo

este el caso de la línea celular empleada, es por ello que las células no tuvieron la capacidad de proliferar. Por ello se empleó otro protocolo realizado por Voronina et al. en 2016 para la generación de una línea celular CHO productora estable de anti-TNF $\alpha$ , donde en lugar de colocar directamente de 1-5 células por pozo en una placa de 96 pozos se realizó una serie de diluciones para determinar la concentración mínima de células que permitiera generar su propio microambiente y así inducir la proliferación de las mismas, para favorecer esta proliferación celular se agregó medio metabolizado de un cultivo de células CHO-S, ya que además de tener los metabolitos producidos también cuenta con factores de crecimiento requeridos para su proliferación (Freshney 2005).

Se llevó a cabo la primera selección clonal bajo las condiciones descritas anteriormente obteniendo así dos clonas con producción de 258.2 pg/mL y 178.8 pg/mL de IFN- $\gamma$ , de estas dos clonas se realizó una segunda selección clonal para obtener mayor homogeneidad e incrementar la productividad la proteína. En esta segunda selección se logró aumentar la producción proteína, logrando obtener 4 clonas que producen más de 500 pg/mL, incrementándose a más del doble comparadas con la primera selección clonal.

Finalmente, se realizó la caracterización del sistema productor mediante cinéticas de crecimiento celular y el análisis de la expresión génica y proteica de IFN- $\gamma$  de las dos clonas más productoras, en la cinética de crecimiento se obtuvo un tiempo de duplicación de 25.11 h para ambas clonas aumentando 10 horas con respecto a la línea celular CHO-S sin transfectar, esto podría deberse a un cambio metabólico celular, ya que además de producir sus propias proteínas celulares, se encuentra produciendo nuestra proteína de interés (IFN- $\gamma$ ) y a la adaptación a la presión selectiva que se le está ejerciendo con medio de selección. De acuerdo investigaciones realizadas por Fischer, Handrick y Otte en 2015 acerca del metabolismo celular de CHO pueden verse modificadas diferentes vías metabólicas al inducir la producción de proteínas externas a la propia célula.

Se realizó un análisis de los transcritos de la proteína mediante RT-PCR obteniendo bandas correspondientes al transgen de interés indicando que aún se lleva a cabo de manera eficiente la transcripción del gen, la cuantificación de la proteína mediante ELISA después de 10 generaciones, se obtuvo que en ambas clonas la producción específica aumentó en un 3-5 % con respecto a la realizada en la selección clonal, lo cual indica que las clonas

permanecen produciendo IFN- $\gamma$  a través de generaciones sin perder la capacidad de expresión.

A pesar de aumentarla productividad de IFN- $\gamma$  con respecto a los sistemas transitorios utilizados, continúan siendo un reto el obtener cantidades adecuadas para el uso humano. Por lo que se han realizado diversas estrategias para aumentar la productividad de proteína recombinante producida sin modificar el sistema de expresión como la descrita por Farges et al. 2008 al producir IFN- $\gamma$  utilizando la misma línea celular. Durante la producción utilizó hidrolizados de levadura (extractos de levadura y peptonas de levadura) para mejorar el crecimiento de células CHO aumentando el periodo de crecimiento y modificando el metabolismo de la propia célula.

## **X. CONCLUSIÓN.**

Se generó el sistema CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$  obteniendo dos clonas súperproductoras que expresan establemente la proteína interferón gamma humana a través de más de 200 generaciones desde que fueron transfectadas. Se evaluaron los transcritos del gen de interés determinado que aún se encuentran expresando dicha proteína. Por otro lado, las producciones obtenidas de ambas clonas se encuentran por arriba de 1000 pg/mL a las 168 h siendo considerablemente mayores comparadas con el sistema el transitorio HEK293/AD5-IFN- $\gamma$  el cual produce 19.22 pg/mL con lo cual se corrobora la hipótesis planteada en este proyecto.

### **○ CONCLUSIONES PARTICULARES.**

- Se realizó la construcción y amplificación molecular del vector pcDNA3/IFN- $\gamma$ , el cual es un vector de expresión que fue utilizado para la creación de la línea celular estable productora de IFN- $\gamma$ . Durante el análisis de la secuenciación de la construcción del plásmido se corroboró que el transgén insertado corresponde con la proteína de interés (IFN- $\gamma$ ).
- Las células CHO-S poseen una  $\mu$  de 0.0454 hr<sup>-1</sup> y un Td de 15.27 h bajo las condiciones experimentales empleadas, siendo menor a lo reportado en la literatura (Td: 10-22 h).
- Se realizó la selección policlonal de la línea celular CHO-S utilizando antibiótico (G418) obteniendo dos Minipools y durante el análisis de la expresión de la proteína interferón gamma se identificaron los transcritos de la proteína mediante RT-PCR y se obtuvo una concentración de 26.91 pg/mL en cuantificación mediante ELISA.
- Se realizó la selección clonal utilizando la técnica de dilución mínima suplementando con medio metabolizado para inducir la proliferación celular obteniendo clonas con productividades por arriba de 1000 pg/mL.

## **XI. PERSPECTIVAS.**

Ya que el presente estudio forma parte de un gran proyecto dentro del grupo de trabajo donde CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$  será utilizado como sistema productor de referencia contra la producción de IFN- $\gamma$  en células HEK293, únicamente queda como perspectiva realizar el análisis del patrón de glicosilación de la proteína producida mediante western Blot y perfil de N-glicanos por HPLC para asegurar que se produce el homodímero glicosilado.

Por otra parte, si se desea utilizar el sistema CHO-S pcDNA3/IFN- $\gamma$  para producción a gran escala de la proteína queda como perspectiva buscar estrategias para aumentar la productividad a través de la optimización del metabolismo celular.

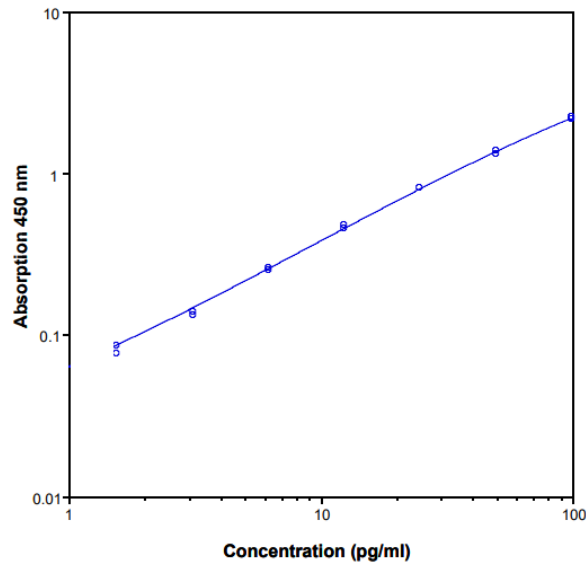
## **XII. ANEXOS.**

### **Anexo A. Interpretación de resultados en la cuantificación de IFN- $\gamma$ mediante ELISA.**

- A. Calcular los valores de absorbancia promedio para cada conjunto de duplicados de estándares y muestras. Los duplicados deben estar dentro del orden del 20% del valor medio.
- B. Crear una curva estándar trazando la absorbancia media para cada concentración estándar en el eje Y y concentración de IFN gamma humano en el eje X. Realice la curva que mejor se ajuste (se recomienda un ajuste de curva de 5 parámetros).
- C. Determinar la concentración de IFN gamma humano de cada muestra, primero con el valor medio de absorbancia en el eje Y y extender una línea horizontal a la curva estándar. En el punto de intersección, extienda una línea vertical hasta el eje X y lea la correspondiente concentración de IFN gamma humano,
- D. Si se han seguido las instrucciones de este protocolo, las muestras se han diluido 1:2 (50  $\mu$ L de muestra + 50  $\mu$ L de diluyente de muestra) por lo que la concentración leída de la curva estándar debe ser multiplicado por el factor de dilución (2x).
- E. El cálculo de muestras con una concentración mayor a la del estándar 1 pueden ser incorrectas. Las muestras requieren mayor dilución externa de acuerdo con los valores esperados de IFN gamma humano con diluyente de muestra para cuantificar con precisión el nivel de IFN gamma humano real.
- F. Se sugiere que cada prueba se realice con una muestra control de IFN gamma humano conocido y ejecute cada ensayo con este control adicional. Si los valores obtenidos no están dentro del rango esperado del control, los resultados del ensayo pueden ser inválidos.

G. Una curva estándar representativa se muestra en la figura 8. Esta curva no se puede utilizar para obtener los resultados de las pruebas. Cada laboratorio debe preparar una curva estándar para cada placa ensayada.

Curva estándar representativa para el ELISA de IFN gamma humano. EL IFN gamma se diluyó en pasos seriados de 2 veces en diluyente de muestra. No utilice esta curva estándar para derivar los resultados de las pruebas. Una curva debe ser realiza por cada ensayo.



### Anexo C. Constancias de participación.



León, Guanajuato  
23 al 28 de junio  
**2019**

Otorga la presente

# CONSTANCIA

A:

**Mirna Rodríguez Aguilar, Yoanna García López, Carlos Alberto Tavera Montalván, Angélica Meneses Acosta**

Por ser acreedores al Primer Lugar de cartel del día Lunes 24 de junio de 2019 con el trabajo:  
**GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES PRODUCTORAS DE INTERFERÓN GAMMA  
POR MÉTODO DE SELECCIÓN CLONAL UTILIZANDO CHO-S/ PCDNA3/IFN- $\gamma$  COMO SISTEMA  
DE INTEGRACIÓN ALEATORIA.**

En el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,  
23 al 28 de junio de 2019 en León, Guanajuato, México.

**Dr. Adelfo Escalante Lozada**  
Presidente de la SMBB

**Dr. Jaime Ortega López**  
Presidente del Comité Organizador

**Dra. Sylvie LeBorgne**  
Presidenta del Comité Científico

**Dr. Alvaro Lara Rodríguez**  
Presidente de la Comisión de Premios de la SMBB



Sociedad Mexicana de  
Biotecnología y Bioingeniería



sartorius

Otorgan el

PREMIO SARTORIUS A LOS MEJORES TRABAJOS LIBRES EN  
CARTEL PRESENTADOS DURANTE EL XVIII  
CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA LEÓN 2019

**1er lugar**

Mirna Rodríguez Aguilar, Yoanna García López, Carlos Alberto Távira Montalván, Angélica Meneses Acosta

Por el trabajo:

**GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES PRODUCTORAS DE INTERFERÓN GAMMA  
POR MÉTODO DE SELECCIÓN CLONAL UTILIZANDO CHO-S**

León, Guanajuato 28 de junio 2019

**Dr. Alvaro Lara Rodríguez**

Presidente de la Comisión de  
Premios de la SMBB

**IQ.MBA Erick Sabido Ruiz**

Gerente Comercial Sartorius

**Dr. Adelfo Escalante Lozada**

Presidente de la SMBB







UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

# LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

A través de la Facultad de Farmacia

Otorga la presente:

# CONSTANCIA

a:

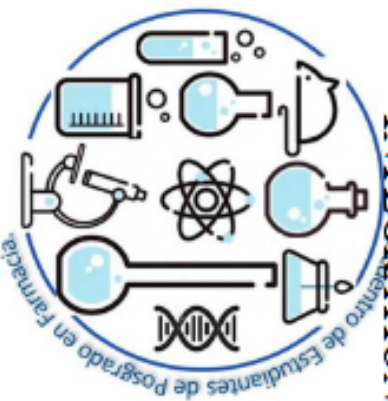
*Mona Rodríguez Aguilar, Yamna García-López, Carlos A. Taurica-Montalván,  
Angélica Meneses-Acosta y Uriel A. Sánchez-Pacheco.*

*Por su participación en la presentación del cartel titulado "GENERATION OF STABLE  
CELL LINES THAT PRODUCE RECOMBINANT GAMMA INTERFERON BY  
CLONAL SELECTION USING CHO-S/PCDNA3/IFN-gamma AS A RANDOM  
INTEGRATION SYSTEM" en el 13° Encuentro de Estudiantes de Posgrado en Farmacia.*

Cuernavaca, Morelos a 21 de noviembre del 2019.



*Dr. Efrén Hernández Baltazar*  
Director de la Facultad de Farmacia



### XIII. REFERENCIAS.

- AcroBiosystems. 2019. "ActiveMax® Human IFN-Gamma / IFNG Protein, Tag Free."
- Almo, Steven C., Scott J. Garforth, Brandan S. Hillerich, James D. Love, Ronald D. Seidel, and Stephen K. Burley. 2013. "Protein Production from the Structural Genomics Perspective: Achievements and Future Needs." *Current Opinion in Structural Biology* 23 (3): 335–44. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.02.014>.
- Arbabi, M, F Alasti, MH Sanati, S Hosseini, A Deldar, and N Maghsoudi. 2003. "Cloning and Expression of Human Gamma-Interferon CDNA in E. Coli." *Iranian Journal of Biotechnology* 1 (2): 87–94.
- Baeshen, Nabih A., Mohammed N. Baeshen, Abdullah Sheikh, Roop S. Bora, Mohamed Morsi M. Ahmed, Hassan A.I. Ramadan, Kulvinder Singh Saini, and Elrashdy M. Redwan. 2014. "Cell Factories for Insulin Production." *Microbial Cell Factories* 13 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0141-0>.
- Baldi, Lucia, David L. Hacker, Myriam Adam, and Florian M. Wurm. 2007. "Recombinant Protein Production by Large-Scale Transient Gene Expression in Mammalian Cells: State of the Art and Future Perspectives." *Biotechnology Letters* 29 (5): 677–84. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9297-y>.
- Bandaranayake, Ashok D., and Steven C. Almo. 2014. "Recent Advances in Mammalian Protein Production." *FEBS Letters* 588 (2): 253–60. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.11.035>.
- Bi, Jing Xiu, John Shuttleworth, and Mohamed Al-Rubeai. 2004. "Uncoupling of Cell Growth and Proliferation Results in Enhancement of Productivity in P21CIP1-Arrested CHO Cells." *Biotechnology and Bioengineering* 85 (7): 741–49. <https://doi.org/10.1002/bit.20025>.
- Billiau, Alfons, and Patrick Matthys. 2009. "Interferon- $\gamma$ : A Historical Perspective." *Cytokine and Growth Factor Reviews* 20 (2): 97–113. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.02.004>.
- Biotech, Shinegene Molecular. 2014. "G418 Sulfate."
- Brödel, Andreas K., Andrei Sonnabend, and Stefan Kubick. 2014. "Cell-Free Protein

- Expression Based on Extracts from CHO Cells.” *Biotechnology and Bioengineering* 111 (1): 25–36. <https://doi.org/10.1002/bit.25013>.
- Bürkle, A. 2001. “Posttranslational Modification.” In *Encyclopedia of Genetics*, 1533. <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.1022>.
- Butler, M., and A. Meneses-Acosta. 2012. “Recent Advances in Technology Supporting Biopharmaceutical Production from Mammalian Cells.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 96 (4): 885–94. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4451-z>.
- Butler, Michael, and Maureen Spearman. 2014. “The Choice of Mammalian Cell Host and Possibilities for Glycosylation Engineering.” *Current Opinion in Biotechnology* 30: 107–12. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.010>.
- Catriona H.T. Miller, Stephen G. Maher, and Howard A. Younga. 2017. “Clinical Use of Interferon- $\gamma$  Catriona.” *Physiology and Behavior* 176 (3): 139–48. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>.
- Curling, E. M.A., P. M. Hayter, A. J. Baines, A. T. Bull, K. Gull, P. G. Strange, and N. Jenkins. 1990. “Recombinant Human Interferon- $\gamma$ . Differences in Glycosylation and Proteolytic Processing Lead to Heterogeneity in Batch Culture.” *Biochemical Journal* 272 (2): 333–37. <https://doi.org/10.1042/bj2720333>.
- Davoudi, Noushin, Azam Hemmati, Zahra Khodayari, Ahmad Adeli, and Mahdi Hemayatkar. 2011. “Cloning and Expression of Human IFN- $\gamma$  in *Leishmania Tarentolae*.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (8): 1893–99. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0648-4>.
- Demain, A., and P. Vaishnav. 2009. “Production of Recombinant Proteins by Microbes and Higher Organisms.” *Biotechnology Advances* 27 (3): 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>.
- Drago, María Elisa, and Teresisa del R. Sainz. 2006. “Sistemas de Expresión Para Proteínas Terapéuticas Recombinantes.” *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37: 38–44. <https://doi.org/10.5565/rev/athenea.1697>.
- Durocher, Yves, and Michael Butler. 2009. “Expression Systems for Therapeutic Glycoprotein Production.” *Current Opinion in Biotechnology* 20 (6): 700–707.

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.10.008>.

Farges, B., S. Chenu, A. Marc, and J. L. Goergen. 2008. "Kinetics of IFN- $\gamma$  Producing CHO Cells and Other Industrially Relevant Cell Lines in Rapeseed-Supplemented Batch Cultures." *Process Biochemistry* 43 (9): 945–53.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.04.025>.

Fischer, Simon, René Handrick, and Kerstin Otte. 2015. "The Art of CHO Cell Engineering: A Comprehensive Retrospect and Future Perspectives." *Biotechnology Advances* 33 (8): 1878–96. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.015>.

Freshney, R. Ian. 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Edited by John Wiley & Sons. 5th ed.

Gamboa, Ramsés, and Mauricio Trujillo-Roldán. 2009. "Un Acercamiento a La Producción de Proteínas Recombinantes Terapéuticas de Uso Humano." *El Residente IV* (3): 87–91.

García-López, Yoanna. 2017. "Evaluación En Células A549 de La Transgénesis Del Vector Ad5/Ifn- $\gamma$  Como Potencial Biofármaco Para Terapia Génica."

García, José, Zeila Santana, Lourdes Zumalacárregui, Marisel Quintana, Diamilé González, Gustavo Furrázola, and Oscar Cruz. 2013. "Estrategias de Obtención de Proteínas Recombinantes En Escherichia Coli." *VacciMonitor* 22 (2): 30–39.

Guevara-Hernández, E, AA López-Zavala, LR Jiménez-Gutiérrez, and RR Sotelo-Mundo. 2013. "Perspectivas Actuales Del Uso De Proteínas Recombinantes Y Su Importancia En La Investigación Científica E Industrial." *BIOtecnia* 15 (3): 8. <https://doi.org/10.18633/bt.v15i3.152>.

Hacker, David L., and Sowmya Balasubramanian. 2016. "Recombinant Protein Production from Stable Mammalian Cell Lines and Pools." *Current Opinion in Structural Biology* 38: 129–36. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.06.005>.

Hoffmann, C., M. R. Leitz, S. Oberdorf-Maass, M. J. Lohse, and K. N. Klotz. 2004. "Comparative Pharmacology of Human  $\beta$ -Adrenergic Receptor Subtypes - Characterization of Stably Transfected Receptors in CHO Cells." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 369 (2): 151–59.

<https://doi.org/10.1007/s00210-003-0860-y>.

Invitrogen. 2016. "FreeStyle™ CHO-S Cells."

Kamińska, Teresa, Anna Dmoszyńska, Maria Cioch, Iwona Hus, Dariusz Jawniak, Agnieszka Szuster-Ciesielska, and Martyna Kandefer-Szerszeń. 1999. "Interferon  $\gamma$  as Immunomodulator in a Patient with Multiple Myeloma." *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 47 (2): 107–12.

Khan, Kishwar Hayat. 2013. "Gene Expression in Mammalian Cells and Its Applications." *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 3 (2): 257–63.  
<https://doi.org/10.5681/apb.2013.042>.

Kildegaard, Helene Faustrup, Deniz Baycin-hizal, Nathan E Lewis, and Michael J Betenbaugh. 2013. "The Emerging CHO Systems Biology Era : Harnessing the ‘ Omics Revolution for Biotechnology." *Current Opinion in Biotechnology* 24 (6): 1102–7. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.007>.

Kim, Tae Kyung, and James H. Eberwine. 2010. "Mammalian Cell Transfection: The Present and the Future." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (8): 3173–78.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>.

Kuo, Chih-chung, Austin W T Chiang, Isaac Shamie, Mojtaba Samoudi, Jahir M Gutierrez, and Nathan E Lewis. 2018. "The Emerging Role of Systems Biology for Engineering Protein Production in CHO Cells." *Science Direct* 51: 64–69.  
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.015>.

Lagutin, Oleg V., Vasily N. Dobrovolsky, Tatyana V. Vinogradova, Boris N. Kyndiakov, Yuri M. Khodarovich, Nigel Jenkins, David James, Nikola Markham, and Oleg A. Larionov. 1999. "Efficient Human IFN- $\gamma$  Expression in the Mammary Gland of Transgenic Mice." *Journal of Interferon and Cytokine Research* 19 (2): 137–44.  
<https://doi.org/10.1089/107999099314289>.

Lalonde, Marie-eve, and Yves Durocher. 2017. "Therapeutic Glycoprotein Production in Mammalian Cells." *Journal of Biotechnology* 251 (April): 128–40.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.028>.

Martínez, Vicente Díaz, and Mari Carmen Martos. 2011. "Sistemas de Expresión de

- Proteínas Recombinantes ( II ). Organismos Productores.” *BiotechSpain*, 1–6.
- Mata-Espinosa, Dulce A., and Rogelio Hernández-Pando. 2008. “Interferón Gamma: Aspectos Básicos, Importancia Clínica y Usos Terapéuticos.” *Revista de Investigación Clínica* 60 (5): 421–31.
- Mata-espinosa, Dulce A, and Rogelio Hernández-pando. 2008. “Interferón Gamma : Aspectos Básicos , Importancia Clínica y Usos Terapéuticos.” *Revista Investigación Clínica* 60: 421–31.
- Millipore sigma. 2015. “EX-CELL ® Advanced CHO Fed-Batch Medium.”
- Mulukutla, Bhanu Chandra, Salmaan Khan, Alex Lange, and Wei-shou Hu. 2010. “Glucose Metabolism in Mammalian Cell Culture : New Insights for Tweaking Vintage Pathways.” *Trends in Biotechnology* 28 (9): 476–84.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.06.005>.
- Noguera, Arnaldo, and Gustavo Fermín. 2013. “Plataformas de Expresión En Plantas de Péptidos Humanos Terapéuticos: Expresión Transitoria y Estable. (In Plant Expression Platforms of Therapeutic Human Peptides: Transient and Stable Expression).” *Avances En Biomedicina* 2 (3): 17.
- Palomares, Laura A., Sandino Estrada-Mondaca, and Octavio T. Ramírez. 2004. “Production of Recombinant Proteins: Challenges and Solutions.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 267: 15–52. <https://doi.org/10.1385/1-59259-774-2:015>.
- Razaghi, Ali, Leigh Owens, and Kirsten Heimann. 2016. “Review of the Recombinant Human Interferon Gamma as an Immunotherapeutic: Impacts of Production Platforms and Glycosylation.” *Journal of Biotechnology* 240: 48–60.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.022>.
- Razaghi, Ali, Carina Villacrés, Vincent Jung, Narges Mashkour, Michael Butler, Leigh Owens, and Kirsten Heimann. 2017. “Improved Therapeutic Efficacy of Mammalian Expressed-Recombinant Interferon Gamma against Ovarian Cancer Cells.” *Experimental Cell Research* 359 (1): 20–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.08.014>.

- Rodriguez, J., M. Spearman, N. Huzel, and M. Butler. 2005. "Enhanced Production of Monomeric Interferon- $\beta$  by CHO Cells through the Control of Culture Conditions." *Biotechnology Progress* 21 (1): 22–30. <https://doi.org/10.1021/bp049807b>.
- Rojas Contreras, Juan A., Mario Pedraza-Reyes, Leandro G. Ordoñez, Norma Urtiz Estrada, Ana P. Barba de la Rosa, and Antonio De León-Rodríguez. 2010. "Replicative and Integrative Plasmids for Production of Human Interferon Gamma in *Bacillus Subtilis*." *Plasmid* 64 (3): 170–76. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2010.07.003>.
- Román, R., M. Farràs, M. Camps, I. Martínez-Monge, P. Comas, M. Martínez-Espelt, M. Lecina, A. Casablanca, and J. J. Cairó. 2018. "Effect of Continuous Feeding of CO<sub>2</sub> and PH in Cell Concentration and Product Titers in HIFN $\gamma$  Producing HEK293 Cells: Induced Metabolic Shift for Concomitant Consumption of Glucose and Lactate." *Journal of Biotechnology* 287 (February): 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.10.005>.
- Romero-Martínez, Nadia. 2014. "Construcción y Evaluación de Vectores Moleculares Que Expresen Interferón Gamma En Células Humanas Como Potencial Tratamiento Inmunoestimulador."
- Sánchez-Pacheco, Uriel Abdallah. 2017. "Determinación de La Eficacia En Células MCF7 de Vectores Adenovirales Que Expresen Biofármacos."
- Santos, Carlos Ferreira dos, Vivien Thiemy Sakay, Maria Aparecida de Machado, Daniela Nicole Schippers, and Andrew Seth Greene. 2004. "Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction: Principles and Applications in Dentistry." 12 (1): 1–11.
- Sareneva, T, J Pirhonen, K Cantell, and I Julkunen. 1995. "N-Glycosylation of Human Interferon- $\gamma$ : Glycans at Asn-25 Are Critical for Protease Resistance." *The Biochemical Journal* 308: 9–14. <https://doi.org/10.1042/bj3080009>.
- Sareneva, Timo, Ejvind Mørtz, Hannele Tölö, Peter Roepstorff, and Ilkka Julkunen. 1996. "Biosynthesis and N-Glycosylation of Human Interferon- $\gamma$ . Asn25 and Asn97 Differ Markedly in How Efficiently They Are Glycosylated and in Their Oligosaccharide Composition." *European Journal of Biochemistry* 242 (2): 191–200. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0191r.x>.



- Sathyamurthy, Madhavi, Che Lin Kim, You Lim Bang, Young Sik Kim, Ju Woong Jang, and Gyun Min Lee. 2015. "Characterization and Expression of Proprotein Convertases in CHO Cells: Efficient Proteolytic Maturation of Human Bone Morphogenetic Protein-7." *Biotechnology and Bioengineering* 112 (3): 560–68. <https://doi.org/10.1002/bit.25458>.
- Sato, Tadatsugu, Carmine Selleri, Neal S. Young, and Jaroslaw P. Maciejewski. 2018. "Inhibition of Interferon Regulatory Factor-1 Expression Results in Predominance of Cell Growth Stimulatory Effects of Interferon-g Due to Phosphorylation of Stat1 and Stat3." *Blood* 69 (2): 381–87. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-625004>.
- SELEXIS. 2016. "Making the Right Choice : Transient vs . Stable Pool Expression in CHO Cells."
- Shtreichman, Ronit, and Charles E. Samuel. 2001. "The Role of Gamma Interferon in Antimicrobial Immunity." *Current Opinion in Microbiology* 4 (3): 251–59. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00199-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00199-5).
- Silva, Christian López. 2012. "México Retoma Un Liderazgo Regulatorio Sobre Medicamentos Biotecnológicos y Biocomparables." *Gaceta Médica de Mexico* 148 (1): 83–90.
- Sino Biological. 2007. "Human IFN- Gamma / IFNG /  $\gamma$  -IFN Protein."
- Solar, Gloria del, Rafael Giraldo, Maria Jesús Ruiz-Echevarría, Manuel Espinosa, and Ramón Díaz-Orejas. 1998. "Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 62 (2): 434–64. [https://doi.org/1092-2172/98/\\$04.0010](https://doi.org/1092-2172/98/$04.0010).
- Sosa-García, Concepción. 2018. "Optimización Del Sistema de Expresión Hek293/Ad5-Ifny Humano Mediante El Manejo de La Densidad Celular y La Multiplicidad de Infección."
- Strober, Warren. 2015. "Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability." *Current Protocols in Immunology*, no. November: 3–5. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>.
- Thermo Fisher Scientific Inc. 2015. "Manual: Geneticin (G-418 Sulfate)." [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Geneticin\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Geneticin_UG.pdf).

- Thiel, D J, M-h Du, R L Walter, A D Arcy, C Chène, M Fountoulakis, G Garotta, F K Winkler, and S E Ealick. 2000. "Observation of an Unexpected Third Receptor Molecule in the Crystal Structure of Human Interferon-  $\gamma$  Receptor Complex." *Elsevier Science Ltd* 8 (9): 927–36.
- Toku-e. 2000. "G418 Protocol and Selection Guide."
- Urlaub, Gail, and Lawrence A Chasin. 1980. "Isolation of Chinese Hamster Cell Mutants Deficient in Dihydrofolate Reductase Activity" 77 (7): 4216–20.
- Valdez-cruz, Norma Adriana, Octavio Tonatiuh Ram, Campus Cuernavaca, Mauricio Alberto Trujillo-rol, and Investigaciones Biom. 2018. "Proteínas Recombinantes Terapéuticas." *HYPATIA* 32: 30–32.
- Walsh, Gary. 2018. "Biopharmaceutical Benchmarks 2018." *Nature Publishing Group* 36 (12): 1136–45. <https://doi.org/10.1038/nbt.4305>.
- Wang, Yu Chieh, Suzanne E. Peterson, and Jeanne F. Loring. 2014. "Protein Post-Translational Modifications and Regulation of Pluripotency in Human Stem Cells." *Cell Research* 24 (2): 143–60. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.151>.
- YSI. 2014. "YSI 2900 Series Biochemistry Analyzers."
- Zagari, Francesca, Martin Jordan, Matthieu Stettler, and Florian M Wurm. 2013. "Lactate Metabolism Shift in CHO Cell Culture : The Role of Mitochondrial Oxidative Activity" 30 (2): 238–45. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.05.021>.
- Zhou, Hong, Zhi gang Liu, Zhi wei Sun, Ying Huang, and Wei yuan Yu. 2010. "Generation of Stable Cell Lines by Site-Specific Integration of Transgenes into Engineered Chinese Hamster Ovary Strains Using an FLP-FRT System." *Journal of Biotechnology* 147 (2): 122–29. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.03.020>.
- Zhu, Jianwei. 2012. "Mammalian Cell Protein Expression for Biopharmaceutical Production." *Biotechnology Advances* 30 (5): 1158–70. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.022>.