



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA- UNAM

CUERNAVACA, MORELOS.

Sobreexpresión de transportadores mitocondriales en células de insecto

Informe Técnico de Residencia Profesional

Ingeniería Bioquímica

PRESENTA

Diana Marisol Vázquez Enciso

Asesor interno: Dr. Víctor M. Ruíz Valdiviezo

Asesor externo: Dra. Laura A. Palomares Aguilera

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	3
II. JUSTIFICACIÓN	4
III. OBJETIVOS	5
3.1 Objetivo general	5
3.2 Objetivos específicos	5
IV. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DONDE SE DESARROLLÓ LA RESIDENCIA PROFESIONAL	5
V. PROBLEMAS A RESOLVER	6
VI. ALCANCES Y LIMITACIONES	6
VII. FUNDAMENTO TEÓRICO	7
7.1 Generalidades de las proteínas recombinantes.	7
7.2 El Sistema Células de Insecto-Baculovirus (SCI-B).	8
7.3 Generalidades del transportador mitocondrial de piruvato	13
VIII. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS	15
8.1 Capacitación y revisión bibliográfica.	15
8.2 Cinética de células de insecto sin infectar e infectadas con el Bac roGFP2-citoplasma.	15
8.3 Determinación de la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo.	17
8.4 Medición de unidades arbitrarias de fluorescencia.	17
8.5 Determinación de piruvato extracelular e intracelular de células Sf+ por HPLC.	18
8.6 Identificación de la proteína de transporte mitocondrial Mpc1 nativa en células Sf+	19
8.7 Diseño y construcción del vector pFastBacDual	22
IX. RESULTADOS Y DISCUSIONES.	26
9.1 Cinética de células de insecto sin infectar e infectadas con el Bac roGFP2-citoplasma	26
9.2 Medición de unidades arbitrarias de fluorescencia.	27
9.3 Determinación de piruvato extracelular e intracelular de células Sf+ por HPLC	28
9.4 Identificación de la proteína nativa de transporte mitocondrial Mpc1 en células Sf+	29
9.5 Diseño y construcción del vector pFastBacDual	32
X. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	37
XI. COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS	38
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES	39
XIII. ANEXOS	42

I. Introducción

Las proteínas representan las estructuras que constituyen toda forma de vida y permiten el desarrollo y función de cualquier organismo. Debido a sus múltiples aplicaciones, diferentes industrias se han enfocado en producirlas comercialmente en una amplia gama de células huésped, por medio del uso de la ingeniería genética y la ingeniería de proteínas, dando así origen a las proteínas recombinantes (proteínas-r). Los sectores que han resultado más beneficiados con estos avances son la industria biofarmacéutica, la enzimática y agrícola y sus productos tienden a apoyar principalmente los campos de la medicina, la veterinaria y la alimentación (1).

Las proteínas recombinantes se producen a través de diferentes sistemas con la finalidad de obtenerlas en grandes cantidades, lograr modificar su secuencia genética y eventualmente fabricar productos comerciales (1). A lo largo de los últimos años, se han destinado para usos terapéuticos, ya que son capaces de desempeñar funciones altamente específicas y complejas que no pueden ser imitadas por compuestos químicos simples. Además, presentan inmunotolerancia, lo que las convierte en perfectas candidatas para fines terapéuticos (2). Con esta finalidad, se han establecido diferentes líneas de células animales para su producción, debido a que la actividad *in vivo* de muchas proteínas-r depende de modificaciones postraduccionales complejas que sólo pueden ser realizadas por eucariotas superiores (3).

Dentro de los diferentes sistemas de expresión de proteínas, el sistema de células de insecto-baculovirus (SCI-B) surge como una prometedora alternativa. Las características del baculovirus y su ciclo de infección *in vitro* resultan ser muy adecuados para la producción de proteínas recombinantes, ya que al compararlo con otros sistemas presenta importantes ventajas, incluyendo rapidez, simplicidad, confiabilidad, versatilidad, alto nivel de expresión, capacidad para el procesamiento postraducciona l de la proteína, entre otras características convenientes para un bioproceso. Esto ha incrementado su confiabilidad en los últimos años, observándose un incremento en el número de productos expresados, artículos publicados y patentes registradas en relación a este sistema (4).

Por otro lado, el SCI-B también presenta ciertas limitantes, siendo una de las principales los cambios metabólicos que experimentan las células como consecuencia de la infección por baculovirus. Esto ocasiona que incrementen su tasa de consumo de oxígeno y nutrientes, y aunque usualmente acumulan bajas cantidades de lactato en relación a su consumo de glucosa (5,6), cuando este subproducto se acumula, presenta un efecto tóxico debido a la acidificación del medio e incremento de la osmolalidad (7), afectando el crecimiento, la productividad y la calidad de la proteína recombinante. Para combatir esta situación, se han aplicado diferentes medidas enfocadas al desarrollo de estrategias de alimentación, remoción de metabolitos tóxicos, diseño de medios basados en análisis de flujos metabólicos, así como estrategias de ingeniería celular dirigidas a atenuar o sobreexpresar proteínas de transporte y/o enzimas (8). Precisamente en esta última medida, se incluye el objetivo del presente proyecto, el cual consiste en expresar el transportador mitocondrial de piruvato en células de insecto para propiciar la producción de energía y proliferación celular, favoreciendo la conversión de piruvato a acetil-CoA, evitando que sea desviado hacia la producción de lactato.

II. Justificación

La producción de proteínas recombinantes, principalmente para usos terapéuticos, representa un gran impacto en la industria de la biotecnología, la cual ha estado revolucionándose con la implementación de nuevos u optimizados sistemas de expresión que permitan su producción a gran escala y comprometan cada vez menos su calidad. En este sentido, la implementación del Sistema células de insecto-baculovirus frente a otros métodos de expresión de proteínas, constituye una atractiva alternativa debido a que la tecnología desarrollada para el cultivo de células de insecto *in vitro* está muy bien establecida y la aplicación de vectores de baculovirus recombinantes para la sobreproducción de proteínas o la fabricación de partículas virales es robusto, seguro y escalable (4, 9,10).

El sistema es altamente versátil, porque permite la expresión de productos génicos de casi cualquier organismo (desde bacterias hasta tejidos humanos) y en cualquier locación celular (intracelular, extracelular, periplásmica) (4). Además, a diferencia de muchos sistemas de cultivo industriales de células de mamífero, éste se basa principalmente en la ingeniería del vector y no de la línea celular huésped lo que reduce drásticamente el tiempo de clonación del gen hasta la sobreproducción de proteína a semanas en lugar de meses (11).

Las células de insecto al ser eucariotes superiores, son capaces de realizar modificaciones postraduccionales similares a las realizadas por células de mamífero. Esta capacidad es muy importante, ya que estas modificaciones determinan propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas fundamentales para productos terapéuticos y profilácticos de uso humano (12). Además, en los últimos años, la capacidad del baculovirus para entrar y entregar genes en células de mamífero ha sido explotada para la producción de vectores de terapia génica y de vacunas recombinantes. Sin embargo, todavía presenta ciertas limitantes, como la alteración metabólica que experimentan las células frente a la infección y que ocasiona un incremento y acumulación de productos de desecho indeseables en el cultivo que afectan no sólo la proliferación celular, también comprometen la calidad de la proteína recombinante expresada. Diferentes estrategias se han implementado para tratar de contrarrestar este efecto. Algunas se han enfocado a la utilización de sustratos que son metabolizados lentamente y en la ingeniería celular dirigida a atenuar o sobreexpresar proteínas de transporte y/o enzimas (13). Es aquí donde se pretende impactar con el presente proyecto, debido a que la finalidad es sobreexpresar el transportador mitocondrial de piruvato en células de insecto a fin propiciar su entrada a la mitocondria, asegurando su conversión a acetil-CoA para una eficiente producción de energía vía ciclo de Krebs, logrando así un metabolismo más eficiente que permita a la célula sustentar la carga metabólica generada durante la infección por baculovirus.

III. Objetivos

3.1 Objetivo general

Sobreexpresar las proteínas de transporte mitocondrial de piruvato Mpc1 y Mpc2 en células de insecto para favorecer el metabolismo celular.

3.2 Objetivos específicos

- Fusionar las proteínas de transporte mitocondrial de piruvato a proteínas reporteras que permitan su localización intracelular.
- Generar un baculovirus recombinante control para la coexpresión de las proteínas de transporte mitocondrial de piruvato Mpc1 y Mpc2, en células de insecto.
- Generar el baculovirus recombinante para la expresión simultánea de las proteínas de transporte mitocondrial fusionadas Mpc1-EGFP y Mpc2-RFP en células de insecto.
- Determinar la concentración extracelular e intracelular de piruvato con la finalidad de evaluar la funcionalidad del transportador.
- Evaluar las cinéticas de crecimiento y de producción de metabolitos de células de insecto infectadas con el baculovirus recombinante control y el baculovirus Mpc1-EGFP/Mpc2-RFP para detectar algún efecto en la proliferación celular.

IV. Caracterización del área donde se desarrolló la Residencia Profesional

El Instituto de Biotecnología es una entidad universitaria perteneciente al Subsistema de la Investigación Científica (SIC), que realiza investigación de excelencia académica para el desarrollo de la biotecnología moderna, generando conocimiento en diversas áreas y disciplinas tales como la ingeniería celular, biología del desarrollo, biología estructural, fisiología, microbiología y medicina moleculares, así como las relacionadas con la biocatálisis, los bioprocesos y la biología molecular de plantas. Asimismo, participa activamente en la formación de recursos humanos especializados, principalmente a través de su programa de maestría y doctorado en Ciencias Bioquímicas (14).

El Laboratorio de Ingeniería de Bioprocesos y Nanobiotecnología está liderado por los Drs. Laura A. Palomares y Octavio Tonatiuh Ramírez y pertenece al Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. El enfoque central del grupo es el cultivo de células eucariontes superiores (CES) y microorganismos recombinantes. Los procesos que aquí se desarrollan comparten la aplicación de principios bioingenieriles a distintos bioprocesos para lograr su optimización a través de un mejor entendimiento de los principios fundamentales que los rigen, basándose en el desarrollo y aplicación de métodos de control y monitoreo computarizado, en el diseño de reactores, así como en la biología molecular y celular de los organismos empleados (15).

V. Problemas a resolver

La principal problemática a resolver, consiste en propiciar el importe de piruvato a la mitocondria para beneficiar su conversión a acetil-CoA y la producción de energía, favoreciendo la proliferación y al mismo tiempo disminuir la producción de lactato. Para lograrlo se pretende determinar las concentraciones de piruvato extracelular e intracelular mediante cromatografía líquida de alta resolución, ya que es una técnica bastante sensible y que además permitiría cuantificar no solo al piruvato sino también a otros ácidos orgánicos, e incluso azúcares presentes en las muestras, y obtener un panorama más amplio sobre el comportamiento metabólico de la célula durante la infección por el baculovirus recombinante.

Otra de las problemáticas a atender, es lograr la localización intracelular de las proteínas que constituyen al transportador, mediante su fusión a proteínas reporteras, las cuales permitan identificar su presencia en la mitocondria una vez que sean expresadas bajo el SCI-B.

VI. Alcances y Limitaciones

Dentro de los alcances del proyecto se encuentran los siguientes:

- Generar conocimiento útil sobre la posibilidad de expresar proteínas funcionales en la membrana mitocondrial interna de las células de insecto y describir las técnicas implementadas para este fin, detallando sus ventajas y limitantes.
- Proporcionar evidencia acerca de si existe algún efecto en la funcionalidad del transportador al fusionarlo a proteínas reporteras.
- Obtener datos generales acerca del metabolismo de las células de insecto sin infectar e infectadas por el baculovirus recombinante generado.
- Documentar toda la experiencia adquirida y los resultados obtenidos para futuros proyectos enfocados al estudio del transportador como de alguna de las metodologías empleadas.

Las principales limitaciones se enlistan a continuación:

- Con la realización del proyecto no se pretende dar una descripción completa del metabolismo celular ya que se requerirían estudios detallados mediante otro tipo de técnicas y estrategias.
- Los ensayos de inmunodetección que se pretenden realizar, probablemente sólo permitan detectar a Mpc1, debido a que la proteína Mpc2 no ha logrado detectarse mediante esta técnica en el laboratorio.
- La localización intracelular de las proteínas se encuentra basada totalmente en que la fusión resulte exitosa, de no ser así, no existe otra alternativa considerada hasta el momento ya que la detección por inmunocitoquímica no ha resultado viable.

VII. Fundamento teórico

7.1 Generalidades de las proteínas recombinantes.

Una proteína recombinante es una versión de la proteína nativa, que es producida a través de diferentes sistemas, con el objetivo de obtenerla en grandes cantidades, en algunos casos modificar su secuencia genética y finalmente obtener algún producto comercial en base a ella (1) y su desarrollo ha disipado las preocupaciones asociadas al uso de proteínas aisladas de tejidos humanos o animales (16).

La producción de proteínas recombinantes se puede dividir en 4 pasos generales: 1. Clonación del gen de interés en un vector bajo un promotor adecuado (transformando y estabilizando la célula huésped); 2. Biosíntesis de la proteína bajo condiciones controladas; 3. Recuperación y purificación del producto recombinante y finalmente, comparación con la proteína nativa (16).

El uso de proteínas recombinantes ha transformado la industria de los alimentos, la producción de enzimas, la agricultura y la biotecnología, beneficiando en gran medida a la Industria farmacéutica, al ser desarrolladas para usos terapéuticos. Las proteínas terapéuticas incluyen medicamentos basados en anticuerpos, anticoagulantes, factores sanguíneos, enzimas, factores de crecimiento, hormonas, interferones, interleucinas, entre otras y sus principales áreas de aplicación son enfermedades como la diabetes, hepatitis, anemia, artritis reumatoide, asma, insuficiencia cardíaca, apoplejía, esclerosis múltiple y distintos tipos de cáncer (1).

7.1.1 Panorama actual de las proteínas-r de uso terapéutico.

Con la introducción y creciente adopción de la “Tecnología del ADN recombinante” el mercado de la industria terapéutica ha prosperado continuamente. Diversas compañías y centros de investigación alrededor del mundo han dirigido sus esfuerzos hacia el desarrollo de terapias basadas en proteínas para el tratamiento de distintas enfermedades como el cáncer, VIH/SIDA, desequilibrios hormonales y trastornos neurológicos. Además, debido a su mayor especificidad y eficacia en comparación con otros tipos de medicamentos, los tratamientos con base en proteínas se han convertido en un campo atractivo para las empresas farmacéuticas (1). Por otra parte, el aumento de la inversión en las actividades de investigación y la introducción de nuevas proteínas terapéuticas ha contribuido significativamente al crecimiento y desarrollo del mercado de anticuerpos y proteínas terapéuticas recombinantes (17).

7.1.1.1 Análisis del mercado global de productos terapéuticos.

El mercado de productos biofarmacéuticos basados en proteínas recombinantes ha estado en constante crecimiento. En el año 2010, las ventas totales estuvieron próximas a los \$138 millones de dólares (18) y en el 2012, el sector biotecnológico de Estados Unidos creció a una tasa bastante alta. Impulsado principalmente por la rápida aceptación de varios anticuerpos monoclonales y productos para la diabetes, ese año, las ventas totales de productos biológicos alcanzaron los \$63.6 billones de dólares, con un incremento del 18.2 % con respecto a las ventas del 2011. Esto representó más de siete veces las ventas del sector farmacéutico en general, el cual sólo experimentó un crecimiento del 2.5% (19).

El año pasado el mercado mundial de fármacos con base en proteínas logró alcanzar cifras cercanas a los \$174.7 billones dólares y se estima que para el año 2020, debería estar cerca de los \$248.7 billones de dólares, mostrando una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) del 7.3% (20).

7.2 El Sistema Células de Insecto-Baculovirus (SCI-B).

El SCI-B consiste en una línea celular de insecto o larva, que es infectada con un baculovirus recombinante que posee el gen de interés. Fue desarrollado por Gale Smith y Max Summers en 1983 y puede ser usado para la producción de una proteína recombinante o para la expresión simultánea de varios genes (21). Este sistema constituye una atractiva alternativa al uso de células de mamífero para la expresión de diversos productos de genes heterólogos, donde se incluyen proteínas, vacunas e incluso vectores para terapia génica (11).

Una de sus principales ventajas es que produce altas concentraciones de proteína recombinante, principalmente porque utiliza el promotor del gen de la poliedrina (*polh*), uno de los promotores más fuertes de la naturaleza. La función de la poliedrina *in vivo* es proteger al virus del ambiente. Tal protección no es necesaria *in vitro*, por lo que es posible sustituir el gen de la poliedrina por un gen de interés sin afectar la replicación viral (22).

La producción de proteínas heterólogas mediante el SCI-B consiste en un proceso de dos etapas: primero se cultivan las células de insecto hasta la concentración deseada y después son infectadas por un baculovirus recombinante que posea el gen que codifica para la proteína de interés. Poco después de la infección, el baculovirus toma control de la célula, inhibiendo la transcripción de los genes celulares y propiciando la expresión de las partículas virales hasta que la célula muere (4,21).

Dentro de las ventajas que presenta el SCI-B se destacan las siguientes (4,21):

- Alta expresión del gen de interés: la concentración de la proteína expresada puede llegar a representar hasta el 50% de la proteína total. Comparado a las células de mamífero, los rendimientos de proteína pueden ser de 20 a 250 veces más.
- Versatilidad: permite expresar genes de casi cualquier organismo y debido a que el baculovirus permite la integración y expresión de genes bastante extensos, se han logrado producir más de 500 proteínas-r funcionales. Además, es posible clonar múltiples genes dentro de un solo baculovirus, lo que permite la expresión simultánea de proteínas multiméricas y su ensamblaje. También, puede realizarse una coinfección con varios baculovirus que contengan diferentes genes.
- Rapidez y simplicidad: el proceso de construcción de un baculovirus-r ha sido estandarizado y su uso permite producir altas cantidades de proteína en un corto periodo de tiempo.
- Modificaciones postraduccionales: las células de insecto son capaces de desarrollar la mayoría de las modificaciones postraduccionales presentes en las proteínas de origen eucariótico, permitiendo que mantengan su función biológica.
- Escalamiento: las células de insecto pueden crecer en suspensión y han logrado ser cultivadas en reactores de miles de litros principalmente para la producción de biopesticidas, lo que vuelve al sistema fácilmente escalable.
- Seguridad: los baculovirus tienen un limitado rango de huéspedes generalmente restringido a artrópodos, además de que existe una muy baja probabilidad de que las células de insecto contengan virus dañinos para los humanos u otros mamíferos.

Estas ventajas han convertido al SCI-B en uno de los más utilizados para un extenso número de aplicaciones que incluyen la producción de proteínas-r para la investigación y la producción de diferentes vacunas para uso veterinario y humano (21).

En los últimos años se ha convertido particularmente atractivo para la producción simultánea de varias proteínas que se ensamblan y forman proteínas oligoméricas logrando así constituir estructuras conocidas como pseudopartículas virales. Estas representan una alternativa interesante para el desarrollo de vacunas contra varios virus, ya que a pesar de estar conformadas por la cápside completa, no contienen el material genético viral, así que no existe peligro alguno de que propaguen la infección (12,21).

7.2.1 Características de las células de insecto.

7.2.1.1 Antecedentes.

La primera línea continua de células de invertebrados fue establecida en 1962 por Grace (23) a partir del ovario de la polilla australiana, *Antheraea eucalypti*. Desde entonces, se han aislado líneas celulares de diferentes órdenes, siendo las células lepidópteras y dípteras las más utilizadas. Este es el caso de las líneas celulares derivadas de *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni* y *Mamestra brassicae* (4).

Para el SCI-B las líneas celulares de *S. frugiperda* y *T. ni* han sido las más utilizadas. La línea celular Sf-21 aislada del tejido ovárico de la pupa de *S. frugiperda*, fue la usada por Smith et al., en 1983, cuando el sistema fue originalmente desarrollado. Su derivado, la línea celular Sf-9 (24), es la más utilizada para la expresión de proteínas recombinantes mediante este sistema y la mayor parte de los productos farmacéuticos en el mercado, son producidos en estas líneas celulares (21).

Otra línea celular de importancia comercial es la línea High-Five (células *T. ni* derivadas de BTI-Tn5B1-4), fue aislada por el grupo de Granados en el Instituto Boyce Thompson y es comercializada por Invitrogen (25). Esta línea celular ha sido reportada capaz de producir mayores cantidades de proteínas-r que las células Sf-9, principalmente cuando se expresan proteínas secretadas (21). Además, el primer producto con licencia para uso humano Cervarix, es producido en esta línea celular (26).

7.2.1.2 Metabolismo de las células de insecto.

El metabolismo de las líneas celulares de *S. frugiperda* y *T. ni* es muy diferente, la línea celular High-Five presenta una actividad metabólica más intensa que las Sf-9 (27,28) debido a que consumen glucosa a una tasa más alta y como resultado producen mayor cantidad de subproductos (alanina y amonio) (27,28,29). Además, está reportado que las células Sf-9 producen títulos virales superiores a los producidos en células High-Five, mientras que estas últimas son mejores para la producción de proteína recombinante (30).

El comportamiento metabólico de ambas líneas celulares frente a diferentes nutrientes, se describe a continuación (véase también Anexo 3.2):

- Carbohidratos.

La glucosa es la fuente de carbono preferida por las células de insecto, aunque también son capaces de consumir fructosa y maltosa (31,32). La sacarosa añadida al medio para ajustar la osmolalidad, generalmente no es consumida por las células durante la fase de crecimiento (Sf-9: 31, 33, 34) (High-Five: 27). Únicamente se ha reportado su consumo por las células Sf-9 durante la infección por baculovirus (35,36) o durante el crecimiento celular (con una tasa más alta durante la infección) a bajas concentraciones celulares (37).

El metabolismo de los carbohidratos está regulado de manera similar que en otras células eucariotas. Bajo condiciones de ausencia de glucosa, se detiene el crecimiento en ambas líneas celulares (29,33), aunque las células se mantienen viables si existe una cantidad suficiente de aminoácidos en el medio. La falta de glucosa en el medio desencadena procesos apoptóticos en las células Sf-9, mientras que las células High-Five pueden mantenerse viables mediante el consumo de lactato (36). Cantidades excesivas de glucosa resultan en la acumulación de productos de desecho como lactato y alanina (31, 37, 38,39).

La mayor parte del piruvato derivado de la glucosa es convertido a acetil-CoA y contribuye al crecimiento celular, mientras que una parte significativa se desvía hacia la formación de alanina y lípidos, siendo las principales reacciones que reducen la eficiencia de la oxidación de la glucosa (37). Las células Sf-9 presentan un metabolismo más eficiente, con el 80% del piruvato formado dirigido hacia el ciclo del ácido cítrico (6,37).

- Aminoácidos.

La glutamina es utilizada principalmente para la biosíntesis en las células Sf-9 y se ha demostrado que es la principal fuente de energía (40). Su metabolismo resulta en una acumulación de amoniaco, que puede ser nuevamente utilizado para su síntesis por las células Sf-9 pero no así por las células High-Five.

La cistina y la glicina son esenciales para las células de insecto debido a que no expresan la metil-tetrahidrofolato sintasa (41) requerida para la síntesis de ambos aminoácidos.

Las células Sf-9 utilizan para la producción de energía a la arginina, aspartato, asparagina, glutamina, glutamato, metionina y serina (42), mientras que las High-Five utilizan los mismos a excepción de glutamato, asparagina y serina, además de histidina, leucina, lisina y treonina (43). Se ha reportado que en células Sf-9 la isoleucina, lisina, histidina, leucina y treonina son cruciales (44,46), mientras que la presencia de metionina y treonina es necesaria para retrasar la muerte celular (38).

Diversos estudios han demostrado que los aminoácidos requeridos para sustentar una alta tasa de crecimiento celular son arginina, asparagina, glutamina, glutamato, glicina y serina, tanto en células Sf-9 (27,44) como High-Five (27,45). Además, demostraron que también son necesarios durante la fase de infección, para obtener altas tasas de producción de proteína (46).

- Lípidos.

Las células de insecto presentan una limitada capacidad para sintetizar, desaturar y elongar ácidos grasos (39). Además, son incapaces de sintetizar colesterol, el cual es requerido para la formación de hormonas y membranas (47). Sin embargo, sí pueden usar lípidos para la producción de energía (48). La ausencia de lípidos en el medio causa la producción de baculovirus deficientes y degeneración celular (49) por lo que obligatoriamente deben ser suministrados.

7.2.1.3 Formación de subproductos.

La acumulación de subproductos tóxicos es uno de los principales problemas que limitan el cultivo de células eucariotas superiores *in vitro*. Sin embargo, las células de insecto son menos sensibles a ellos que las células de mamífero (31,50).

El amoniaco se genera a partir del metabolismo de la glutamina y la asparagina por lo que su producción depende de la concentración inicial de ambas en el medio de cultivo (25). Se acumula

principalmente en las células High-Five ya que no pueden consumirlo, lo que tiende a afectar la productividad de la proteína. Las células Sf-9 sí son capaces de consumirlo para producir glutamato (4,29, 37) y frente a un exceso de glucosa producen alanina, la cual no es tóxica para las células.

La toxicidad del amoníaco no ha sido claramente identificada, pero probablemente resulta, al igual que en las células de mamífero, en la acidificación de la mitocondria y el citoplasma y en la modificación del gradiente de K⁺ debido a la competencia que existe entre este y el catión amonio para el transportador de la Na⁺/K⁺ ATPasa (50,51).

El lactato es otro de los subproductos producido por las células de insecto el cual se origina bajo condiciones de limitación de oxígeno. Es rara vez acumulado en cultivos de células Sf-9 incluso en medios con altos contenidos de glucosa (37) y a concentraciones de 10 mM no parece afectar el su crecimiento (32). Sin embargo, en células High-Five llega a alcanzar concentraciones hasta de 45 mM (27). Puede ser consumido por ambas células (38) después del agotamiento de carbohidratos. La toxicidad del lactato en células de insecto es probablemente similar al de las células de mamífero debido a la acidificación del medio y el incremento de la osmolalidad (7).

La ingeniería metabólica ha sido utilizada para incrementar la eficiencia de la utilización de nutrientes por las células High-Five. En este sentido la enzima piruvato carboxilasa fue sobreexpresada, resultando en una reducción en la producción de lactato y amonio (8).

7.2.1.4 Requerimientos nutricionales y condiciones de cultivo.

Los medios de cultivo para células de insecto son complejos, conteniendo la mayoría sino todos los aminoácidos, debido a que no todos son sintetizados por las células de insecto (52), así como elementos traza (zinc, hierro y cobre), lípidos, colesterol, hormonas y vitaminas.

Las células de insecto son aerobias estrictas. Las concentraciones óptimas de oxígeno disuelto para su crecimiento se encuentran en un rango de entre 30-100% con respecto a la saturación con aire. Son cultivadas a temperatura ambiente entre 26-29 °C. Tanto las células Sf como las High Five han sido adaptadas para crecer en suspensión y son cultivadas en matraces agitados a escala laboratorio. A mayores escalas se cultivan en biorreactores que han sido diseñados para satisfacer la demanda de oxígeno de las células infectadas por baculovirus. Las células de insecto también pueden crecer en superficies bajo condiciones estáticas de cultivo, esta característica es utilizada para la titulación de los resguardos virales (32).

7.2.2 Características del baculovirus.

Los baculovirus son patógenos únicamente para artrópodos, por lo que no representan un riesgo para otros organismos. Son virus de ADN circular de cadena doble de entre 80 a 230 Kpb y su nombre deriva de la forma de bastón que presenta su cápside, que mide 40-50 nm de diámetro y 200-400 nm de largo. La familia *Baculoviridae* incluye dos géneros de virus líticos: los granulovirus (GNV) y nucleopoliedrovirus (NPV), estos últimos se caracterizan por presentar viriones ocluidos en una matriz cristalina de la proteína poliedrina de 29 kDa (4).

A lo largo de los últimos años han sido utilizados como vectores de expresión para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto. En este ámbito, el NPV de *Autographa californica* (AcMNPV) ha sido ampliamente utilizado como el vector preferido debido a que su rango de hospederos no es tan limitado como el resto y toda la secuencia de su ADN ya se encuentra disponible (4).

El ciclo viral del baculovirus en la naturaleza se divide en cuatro fases: inmediata, temprana, tardía y muy tardía. El ciclo comienza cuando la larva ingiere los viriones ocluidos en la matriz de poliedrina del NPV. La matriz de poliedrina se disuelve en el intestino de la larva debido al pH (>10), dejando

libres a los viriones para que sean absorbidos por las células epiteliales. Así comienza la primera fase donde los viriones migran al núcleo de la célula y pierden su cubierta, dando origen a la transcripción y traducción de los genes virales. La fase temprana (4-7 hpi) se caracteriza por el rearrreglo del núcleo y el citoesqueleto y por la degradación del genoma hospedero. La primera ronda de replicación del ADN viral comienza a partir de las 7 horas marcando el inicio de la etapa tardía que se extiende hasta las 20-24 hpi. A las 12 hpi comienza el ensamble de las nucleocápsides quienes posteriormente brotan de la membrana nuclear y migran hasta la membrana celular donde geman adquiriendo su cubierta. Estos viriones se conocen como virus gemados y en conjunto con los virus ocluidos conforman los dos fenotipos del NPV. Los virus gemados ahora se encargan de propagar la infección a células de otros tejidos y órganos (infección secundaria). Finalmente, en la fase tardía (24-120 hpi) comienza la transcripción de los genes sobreexpresados: poliedrina y p10. Para entonces se termina la liberación de los virus gemados y comienzan a acumularse viriones en el núcleo para ser ocluidos en la matriz de poliedrina. La proteína p10 se acumula en el citoplasma y el núcleo, formando redes fibrosas y largas que se cree participan en la síntesis de poliedrina. La acumulación de los cristales de poliedrina continúa en los siguientes días hasta que la larva muere y se desintegra liberando los virus ocluidos al ambiente para que otra larva los ingiera y el ciclo comience nuevamente (4).

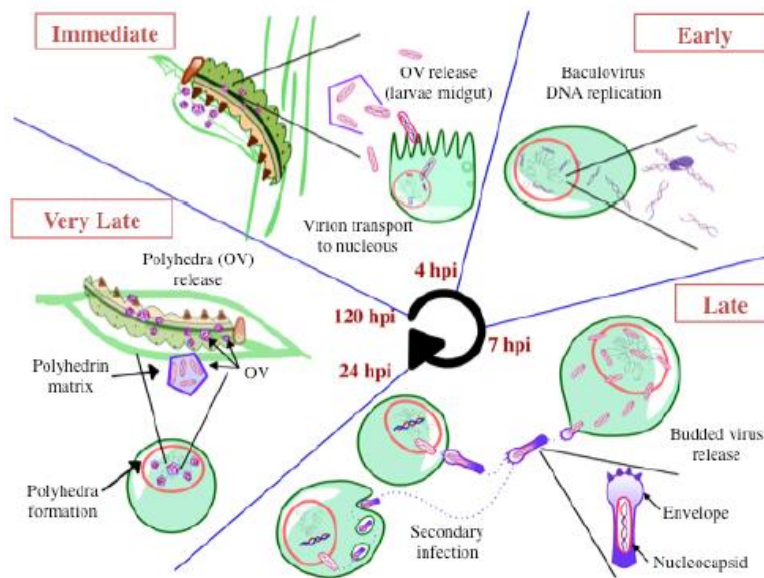


Figura 1 Ciclo del baculovirus en la naturaleza (Palomares et al., 2014). Ilustración por Enrique Paz

7.2.2.1 Infección de células de insecto por baculovirus *in vitro*.

La presencia de virus ocluidos no es necesaria *in vitro*, por lo que el gen de poliedrina puede ser fácilmente sustituido por el gen de interés. Esta situación no afecta la replicación viral, ya que se recurre al uso de los virus gemados para que lleven a cabo la infección. De igual forma, el gen de la proteína p10 tampoco es necesario, así que también puede ser reemplazado. Esta estrategia ha permitido el desarrollo del SCI-B para la expresión de proteínas recombinantes, a través del cual es posible producir grandes cantidades de proteína en un corto periodo de tiempo y de casi cualquier organismo y locación celular.

7.3 Generalidades del transportador mitocondrial de piruvato

El piruvato juega un papel fundamental en el metabolismo celular tanto para la producción de energía como para el mantenimiento de la homeostasis celular y constituye el punto intermedio entre la glucólisis y la fosforilación oxidativa. Para acoplar ambos procesos, debe ser dirigido hasta la matriz mitocondrial siendo trasladado a través de la membrana mitocondrial externa (MME) e interna (MMI). Mientras que el transporte a través de la MME no representa un problema debido a que es posible cruzar mediante porinas y diferentes canales, el paso a través de la MMI sólo puede ocurrir a través de transportadores específicos que permiten mantener un intercambio regulado. Por esta razón, la existencia y elucidación del transportador mitocondrial de piruvato ha sido el principal objeto de estudio de diferentes investigaciones a lo largo de los años, ya que permitiría obtener mayor información acerca del importe de piruvato a la mitocondria y como está regulado.

La primera evidencia de la existencia de un transportador específico para el piruvato ocurrió en 1971 cuando un estudio demostró que el importe de piruvato a la mitocondria era saturable y estaba acoplado al simporte de un protón (53). Posteriormente, la existencia de un inhibidor el aciano-4- hidroxicinamato y un análogo de éste (UK-5099) permitió realizar estudios sobre las cinéticas del importe de piruvato a la mitocondria (54,55).

7.3.1 Identidad molecular del complejo MPC.

Fue descubierto simultáneamente por dos grupos diferentes, quienes se encontraban estudiando un grupo de proteínas no caracterizadas presentes en la MMI, inicialmente conocidas como BRP44L y BRP44 compuestas de 109 y 127 aminoácidos, respectivamente. Ambos genes fueron subsecuentemente nombrados *mpc1* y *mpc2* y se descubrió que se asocian para formar un complejo de ~150 KD (56,57).

En levaduras, se demostró la existencia de un tercer gen nombrado *mpc3* que mostró alta homología y actividad funcional con *mpc2* y recientemente se ha descrito la existencia del complejo MPC en plantas (58).

Ambos estudios demostraron la implicación de estas proteínas en el transporte de piruvato al revelar que mitocondrias aisladas de células de levadura carentes de los genes de MPC, mostraron un deficiente importe de piruvato, *in vitro* (56,57). De igual forma, el silenciamiento de *mpc1* o *mpc2* en células de mamífero, mostró el mismo efecto (56).

Además, las células de levadura mutadas, presentaron un metabolismo deficiente del ácido lipoico, ya que su biosíntesis depende del acetil-CoA generado a partir del piruvato mitocondrial (57). En este estudio, también coexpresaron las proteínas de ratón *Mpc1* y *Mpc2* en la membrana celular de *Lactococcus lactis*, demostrando que la bacteria era capaz de consumir piruvato mediante esta estrategia.

7.3.2 Función del importe de piruvato mitocondrial en la homeostasis celular.

Las mutaciones que afectan los genes que controlan el destino intracelular de piruvato, como la Lactato deshidrogenasa (LDH), Piruvato quinasa (PK), Piruvato carboxilasa (PC) o Piruvato deshidrogenasa (PDH) (junto con sus reguladores: PDH quinasa y PDH fosfatasa), ocasionan diferentes afecciones. Por lo anterior, también es probable que cambios en la expresión o actividad del transportador de piruvato presenten un efecto en el metabolismo celular tan profundo como las alteraciones realizadas en la regulación de estas enzimas (59).

Estudios de células con alta proliferación celular, tanto de organismos unicelulares o pluricelulares, demuestran que dependen principalmente de la glucólisis y la fermentación de piruvato para la producción de energía, debido a que proveen intermediarios metabólicos que pueden ser utilizados para la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos requeridos para el rápido incremento de la biomasa (59). Este fenómeno se ha observado tanto en células en cultivo como en células cancerígenas, donde el piruvato y sus precursores son desviados a estos procesos anabólicos o a la producción de lactato, y fue inicialmente descrito por Otto Warburg demostrando que usan preferentemente la glucólisis y presentan una fosforilación oxidativa disminuida incluso en presencia de oxígeno, por lo que denominó a este proceso “glucólisis aerobia” o Efecto Warburg (60).

Con la reciente elucidación del complejo MPC, un estudio se enfocó en identificar si presenta alguna alteración en células cancerígenas, demostrando que tanto Mpc1 como Mpc2 se ven afectados, revelando que *mpc1* se encuentra deletado o se expresa en bajas cantidades en múltiples tipos de cáncer (colon, riñón, pulmón, vejiga y cerebro) y en el caso de Mpc2, este presenta una baja expresión en algunos tipos de cáncer mientras que en otros se sobreexpresa. Para determinar si este fenómeno es una característica importante del cáncer, re-expresaron Mpc1 y Mpc2 en células de cáncer de colon las cuales mostraron una oxidación mejorada de piruvato y una glucólisis disminuida, lo contrario al Efecto Warburg (61).

7.3.3 Mutaciones en los genes que codifican para MPC.

En humanos, la secuenciación de los genes de MPC en tres familias que presentaban defectos en la oxidación del piruvato mitocondrial, hiperpiruvatemia y acidosis láctica, permitió la identificación de mutaciones en residuos altamente conservados del gen *mpc1*(56).

En ratones se han deletado los genes *mpc1* o *mpc2*, mostrando efectos como letalidad embrionaria y concentraciones elevadas de lactato en la sangre, debido a que al disminuir la capacidad mitocondrial para importar piruvato y usarlo como sustrato en la fosforilación oxidativa, una mayor proporción de este es convertido a lactato (62).

Todo lo anterior demuestra que tanto las deficiencias en enzimas involucradas en el metabolismo de piruvato, así como en su transportador, alteran la homeostasis celular, por lo que estos procesos deben estar altamente regulados y constituyen blancos para futuras terapias.

VIII. Procedimiento y descripción de las actividades realizadas

8.1 Capacitación y revisión bibliográfica.

Se realizó lectura, comprensión y análisis de textos y artículos científicos referentes a cada uno de los temas abordados en el proyecto, así como de las técnicas implementadas para su realización.

8.2 Cinética de células de insecto sin infectar e infectadas con el baculovirus roGFP2-citoplasma.

Se llevó a cabo una cinética de células de insecto Sf+ en medio PSFM para determinar los parámetros cinéticos de interés tanto de células sin infectar como de células infectadas con el baculovirus que contiene el gen para la expresión de la proteína roGFP-2 dirigida a citoplasma, con el fin de utilizar estos datos como control en estudios posteriores cuando se infecte con el baculovirus recombinante generado (Bac-Mpc1/Mpc2).

8.2.1 Descripción general del experimento:

- Se utilizaron tres matraces de 250 mL con 25 mL de volumen de operación con las siguientes condiciones de cultivo: 110 rpm a 27°C.
- Se comenzó la cinética a una densidad celular de 1×10^6 células viables/mL y se infectó a una multiplicidad de infección (MDI) de 5 unidades formadoras de placa (ufp) por célula.
- Se destinó uno de los matraces como control, es decir, células Sf+ sin infectar y dos matraces con células infectadas con el Bac roGFP-2 citoplasma.
- Se realizó toma de muestra cada 12 horas bajo condiciones de esterilidad para los siguientes fines:
 - 200 μ L: Conteo y viabilidad celular.
 - 200 μ L: Medición de unidades arbitrarias de fluorescencia.
 - 200 μ L: Medición de piruvato extracelular e intracelular por HPLC.
 - 200-300 μ L: Cuantificación de metabolitos usando un analizador bioquímico (YSI).

8.2.2 Conteo celular y determinación de viabilidad mediante una cámara de Neubauer y la técnica de exclusión de azul de tripano.

- a. La concentración celular fue obtenida con el equipo Coulter Counter Multisizer 3, primero se llenaba una cubeta con 9.9 mL de solución salina (Isoton) y 100 μ L de suspensión celular proveniente del cultivo en matraz.
- b. Al terminar de leer, el equipo presenta una gráfica a partir de la cual se elegía el rango de lectura de 10 μ m a 40 μ m para obtener el total de partículas (células) contadas y el promedio del tamaño celular. Estos datos fueron registrados para su posterior análisis.
- c. Se realizaba una dilución de la suspensión celular con azul de tripano al 20%.
- d. Se llenaban ambos lados de la cámara de Neubauer con 10 μ L de la dilución realizada y se observaba bajo un microscopio marca Nikon usando el lente 10X.
- e. Se realizaba un conteo de células distinguiendo entre vivas y muertas. Únicamente se consideraban aquellas que estuvieran dentro de los 5 cuadrantes contados por cada lado de la cámara, por lo tanto, se contaban 10 cuadrantes en total. Las células que se encontraban en los márgenes del cuadrante se omitían.

- f. A partir de los datos obtenidos se calculaba tanto la concentración como la viabilidad celular por medio de las siguientes fórmulas:

$$\text{Cél. viables/mL} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número de cuadrantes contados}} (\text{Factor de dilución}) (10,000)$$

$$\text{Cél. no viables/mL} = \frac{\text{Número de células muertas}}{\text{Número de cuadrantes contados}} (\text{Fact. Dilución})(10,000)$$

$$\text{Viabilidad} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

- g. Una vez realizado el conteo y obteniendo la densidad celular viable, se procedía a inocular los matraces a la concentración celular deseada o se realizaban pases para mantener las células, haciendo uso de las siguientes fórmulas:

$$\text{Volumen de inóculo} = \frac{(\text{Conc. celular deseada})(\text{Volumen del cultivo})}{\text{Conc. celular viable del inóculo}}$$

$$\text{Volumen del inóculo (mL)} = \frac{(0.7 \times 10^6 \text{ cells/mL})(20 \text{ mL})}{3 \times 10^6 \text{ cell/mL}} = 4.7 \text{ mL}$$

$$\text{Volumen de medio fresco a añadir} = 20 \text{ mL} - 4.7 \text{ mL} = 15.3 \text{ mL}$$

8.2.3 Procedimiento y condiciones de infección con el baculovirus roGFP2-citoplasma.

- a. Una vez que el cultivo alcanzó la concentración celular deseada aprox. 1×10^6 Cél. Viables/mL se procedió a añadir el volumen de baculovirus necesario para infectar a una MDI de 5 ufp/cél, usando la siguiente ecuación:

$$\text{Volumen de baculovirus (mL)} = \frac{(\text{MDI } \frac{\text{ufp}}{\text{cél}})(\text{Densidad celular viable } \frac{\text{cél}}{\text{mL}})(\text{Volumen mL})}{(\text{Título viral } \frac{\text{ufp}}{\text{mL}})}$$

- b. Los matraces se incubaron bajo las siguientes condiciones: 27 °C y 110 rpm.
c. La cinética se detuvo cuando la viabilidad decayó hasta un 40-30%.

8.3 Determinación de la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo.

La medición de la concentración de glucosa en las muestras se realizó usando un analizador bioquímico YSI.

8.3.1 Preparación de las muestras: únicamente se requiere diluirlas para que la concentración se encuentre dentro del rango de linealidad del instrumento.

8.3.2 Procedimiento:

- a. Se creaba una nueva corrida o lote y se elegía la placa R24.
- b. Se editaba el programa para seleccionar los lugares donde se encontraban las muestras.
- c. Se procedía a seleccionar los analitos, en este caso glucosa.
- d. Posteriormente se configuraban parámetros como el nombre del lote, factor de dilución y unidades.
- e. Se presionaba el botón start para dar comienzo a la lectura.
- f. Al finalizar, se elegía el panel de resultados y la posición de la muestra para desplegar los datos y se seleccionaba el metabolito (glucosa) para obtener la concentración en la muestra.
- g. Los datos fueron registrados para su posterior análisis.

8.4 Medición de unidades arbitrarias de fluorescencia: análisis de la expresión de proteína recombinante roGFP2 dirigida a citoplasma.

Las mediciones se realizaron usando el espectrómetro de luminiscencia LS 55 de Perkin Elmer Instruments usando el software FL WinLab.

Las muestras no requerían de preparación adicional. Únicamente se realizaron diluciones de las últimas horas de monitoreo para evitar que la señal se saturara, debido a que el espectro sólo reconoce hasta 1000 unidades de fluorescencia.

- a. Se tomaban 150 μL de la muestra o dilución, y se depositaban en la celda, se tenía especial cuidado de resuspender continuamente la muestra para que fuera homogénea evitando así la sedimentación de las células y por lo tanto una lectura errónea.
- b. La celda se depositaba en el compartimento del espectro.
- c. Se realizaba un barrido de excitación usando los siguientes parámetros:
Emisión = 510 nm
Rango de excitación = 300-500 nm
Abertura de excitación = 2.5
Abertura de emisión = 5
- d. Se asignaba un nombre para la identificación de la muestra.
- e. Se presionaba el botón de inicio para comenzar la lectura.
- f. Se repetía el mismo procedimiento para cada una de las muestras, al final se recolectaban los datos para su posterior análisis.

8.5 Determinación de piruvato extracelular e intracelular de células Sf+ por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Se utilizó un Cromatógrafo Waters haciendo uso de los detectores de Índice de Refracción y Arreglo de fotodiodos con la columna Aminex HPX-87H de BioRad útil para la detección de ácidos orgánicos, azúcares y alcoholes. Como fase móvil se preparó H₂SO₄ 5mM 10X para la preparación de los estándares de piruvato y dilución de las muestras.

A continuación, se presentan los cálculos realizados para la preparación de la curva estándar de Piruvato de 0-2 g/L. Se filtraron 750 µL de cada estándar con filtros de 0.45 µm y se depositaron en viales de vidrio.

Tabla 1 Curva estándar de piruvato

Concentración (g/L)	Piruvato de Na ⁺ (g/mL)	µL del estándar [x]	µL H ₂ SO ₄ 10X	Vol. Final (µL)
2	0.002	1500 [Stock]	0	1500
1	0.001	750 [Stock]	750	1500
0.5	5x10 ⁻⁴	750 [1]	750	1500
0.25	2.5x10 ⁻⁴	750 [0.5]	750	1500
0.12	1.25x10 ⁻⁴	750 [0.25]	750	1500
0.06	6.25x10 ⁻⁵	750 [0.12]	750	1500
0.03	3.12x10 ⁻⁵	750 [0.06]	750	1500
0.01	1.56x10 ⁻⁵	750 [0.03]	750	1500
0.007	7.81x10 ⁻⁶	750 [0.01]	750	1500
0	0	0	1500	1500

8.5.1 Preparación de las muestras:

a. Determinación de piruvato extracelular:

Se tomaron 200 µL del sobrenadante de las muestras de la cinética de las 0-72 h de cultivo para el matraz control de células sin infectar y de un matraz (M2) de las células infectadas con el baculovirus roGFP2-citoplasma y se diluyeron con 400 µL de la fase móvil de H₂SO₄ 10X para tener un volumen total de 600 µL. Se filtraron mediante filtros de 0.45 µm y se depositaron en viales de vidrio para HPLC.

b. Determinación de piruvato intracelular:

Se centrifugaron las muestras después de cada toma de muestra (200 µL) y se obtuvieron los pellets, éstos, después de separar el sobrenadante se resuspendieron en 100 µL de PBS. Posteriormente fueron sonicados a una amplitud de 30 por 7s con 5s de periodos de descanso entre cada muestra a fin de extraer proteína intracelular.

Las muestras se mantuvieron en hielo para evitar su sobrecalentamiento y se sonicaron 2 veces. Se almacenaron en tubos para microcentrifuga de 0.6 mL y se guardaron a 4°C hasta su análisis. Estas muestras no se filtraron, únicamente se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min inmediatamente antes de inyectarlas y sólo 60 µL fueron colocados en los viales.

8.6 Identificación de la proteína de transporte mitocondrial Mpc1 nativa en células de insecto mediante técnicas de inmunodetección.

8.6.1 Microensayo de Bradford para cuantificación de proteína total. Primero se realizó la extracción de proteína usando buffer de lisis RIPA 1x adicionado con inhibidor de proteasas siguiendo el siguiente protocolo:

- Se lavó el pellet de células con 100 μ L de PBS frío y se centrifugó 4 min a 12,000 rpm.
- Se añadió 100 μ L de buffer RIPA y se incubó en hielo por 15 min.
- Se sonicó a una amplitud de 30, 2-3 pulsos de 7s y se dejó descansar 5s entre cada muestra.
- Se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C.
- Se realizó ensayo de Bradford para cuantificación de proteína.

8.6.1.1 Preparación del reactivo Dye: 1 parte del reactivo y 4 partes de H₂O mQ.

8.6.1.2 Protocolo de preparación de la curva estándar de BSA de 0.05 mg/mL a 0.5 mg/mL.

- a. Se agregó a cada pozo 10 μ L de cada estándar o muestra.
- b. Se añadieron 200 μ L de la solución del reactivo Dye y se mezcló.
- c. La placa se incubó por 5 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm en menos de 1 hora.
- d. Se graficó absorbancia (eje Y) contra concentración (eje X) para obtener la curva estándar de BSA.
- e. Finalmente, se obtuvo la ecuación de la recta, se introdujeron los valores de absorbancia de las muestras y se despejó su concentración. Estos valores fueron empleados para determinar la concentración de proteína total usada en los ensayos de inmunodetección.

8.6.2 Técnica de detección de proteínas bajo condiciones desnaturizantes y reductoras: Western Blot.

8.6.2.1 Preparación del gel de separación al 12% de poliacrilamida en soportes Bio-Rad.

Se utilizaron vidrios con separadores de 1.5 mm y se preparó una solución al 12% de poliacrilamida en un tubo de 15 o 50 mL (dependiendo de la cantidad de geles a preparar) y se depositaba en medio de ambos vidrios. El gel se agregaba hasta dejar aproximadamente 1.5 cm de espacio para el gel concentrador, se colocaba etanol al 70% para emparejar el gel y se esperaba a que polimerizara.

8.6.2.2 Preparación de gel concentrador al 4% de poliacrilamida.

Se eliminaba el etanol por decantación. Se preparaba la solución de gel al 4% y se vaciaba para llenar el espacio restante arriba del gel de separación. Entre los 2 vidrios, se insertaba el peine de 10 o 15 pozos (dependiendo el número de muestras) evitando la formación de burbujas y se esperaba hasta la polimerización del gel.

8.6.2.3 Preparación de las muestras en condiciones desnaturizantes y reductoras.

A un volumen determinado de muestra (dependiendo de la concentración de proteína total) se le añadían los μ L de buffer de carga 4X necesarios. Las muestras se calentaban en el ThermoStat plus a 99 °C durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugaban por 20 segundos a 10,000 rpm.

8.6.2.4 Separación de las muestras por SDS-PAGE

Se colocaba el gel en la cámara Mini-Protean 3 Cell, se llenaba el interior como el exterior de la cámara con buffer de corrida 1X. En cada pozo del gel se colocaban lentamente de 20-30 μ L de las muestras centrifugadas y en un pozo 4 μ L del marcador de peso molecular Dual

Color. La cámara de electroforesis se conectaba a la fuente de poder para realizar la separación a 120 V constantes.

8.6.2.5 Transferencia húmeda de proteínas separadas por SDS- PAGE a membranas de PVDF.

Se desmontaba la cámara de electroforesis y se separaban los vidrios cuidando de no romper el gel. El gel se colocaba en 20 mL de buffer de transferencia durante 1 min. Se preparaba el tanque de transferencia Mini Trans-Blot humedeciendo papeles filtro en buffer de transferencia y recortando una membrana de PVDF de 5 x 8.5 cm. Primero se sumergía la membrana en metanol al 100% durante 15 segundos y posteriormente se colocaba en 20 mL de buffer de transferencia por 5 min. Se armaba el casete de transferencia colocando papeles filtro entre el gel y la membrana, tratando de no dejar burbujas. Se encendía la fuente de poder y se dejaba transferir durante 2 horas a 250 mA constantes.

8.6.2.6 Bloqueo de la membrana de PVDF

La membrana se colocaba en una solución de PBS con leche al 5% durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación.

8.6.2.7 Detección con el anticuerpo primario

Se realizaban 3 lavados de 10 min con buffer PBS y se colocaba el anticuerpo primario a una dilución de 1:500 en PBS con 5% de leche. Se dejaba incubar durante 2 horas con agitación a temperatura ambiente.

8.6.2.8 Incubación con el anticuerpo secundario

Se realizaban 3 lavados de 10 min. Posteriormente, se agregaba el anticuerpo secundario a una dilución de 1:5000 en PBS con leche al 2.5% y se incubaba durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

8.6.2.9 Revelado con luminol.

Se realizaban 3 lavados de 10 min. Se desechaba el buffer y se agregaba la solución de luminol (750 μ L- 1000 μ L).

8.6.3 Técnica de detección de proteínas en su forma nativa: Dot Blot.

Para esta técnica las muestras no requieren de mayor preparación más que realizar diluciones para cargar la cantidad de proteína total deseada, por lo que no se realiza un paso de desnaturalización proteica. El protocolo utilizado se describe a continuación:

- a. Para armar el sistema, primero se coloca la plataforma que contiene la manguera y válvula necesaria para conectar el sistema a una bomba de vacío, en esta plataforma se inserta la placa de soporte, posteriormente se coloca una cubierta delgada, porosa y transparente. Encima de la cubierta se coloca la membrana del tamaño deseado, éste depende de la cantidad de muestras a analizar. La membrana debe ser activada 15 s con metanol antes de ser colocada en el sistema. Finalmente se cubre todo el sistema con la plataforma donde se depositan las muestras y se ajusta con los tornillos presentes en los extremos (Figura 2).
- b. El sistema se conectaba a la bomba de vacío y se añadía un poco de agua a los pozos para probar que estuviera perfectamente cerrado y permitiera la absorción de la muestra.
- c. Cada una de las muestras era cargada al pozo correspondiente teniendo cuidado de depositarla directamente en el fondo del pozo y no por las paredes (Figura 3).

- d. Una vez que se observaba que todas las muestras eran absorbidas y no quedaba líquido en los pozos, se retiraba la membrana.
- e. Se realizaba el bloqueo con leche al 5% disuelta en PBS por 2 horas.
- f. Al finalizar el bloqueo, se realizaban 3 lavados con PBS de 10 min cada uno.
- g. Se incubaba con el anticuerpo primario BR44L contra la proteína de interés Mpc1 diluido 1:500 en PBS con leche al 5% por 2 horas.
- h. Nuevamente se realizaban 3 lavados con PBS.
- i. La membrana se incubaba con el anticuerpo secundario conjugado a una peroxidasa diluido 1:5000 en PBS con leche al 2.5% por 1 hora.
- j. Se revelaba la membrana con 750-1000 μL de luminol y se observaba en el equipo ChemiDoc de BioRad.

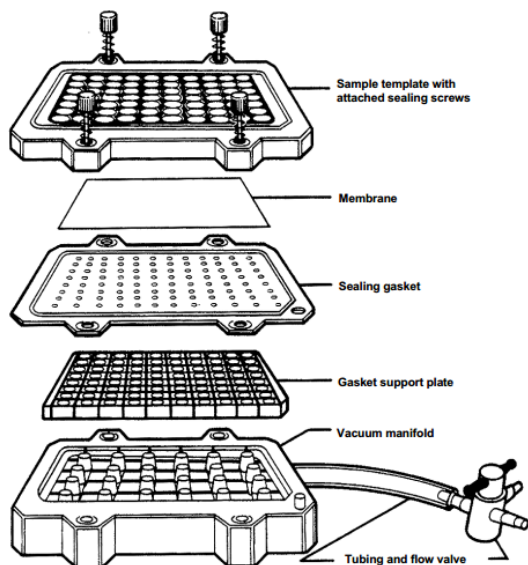


Figura 2 Ejemplo del armado del equipo de Dot-Blot

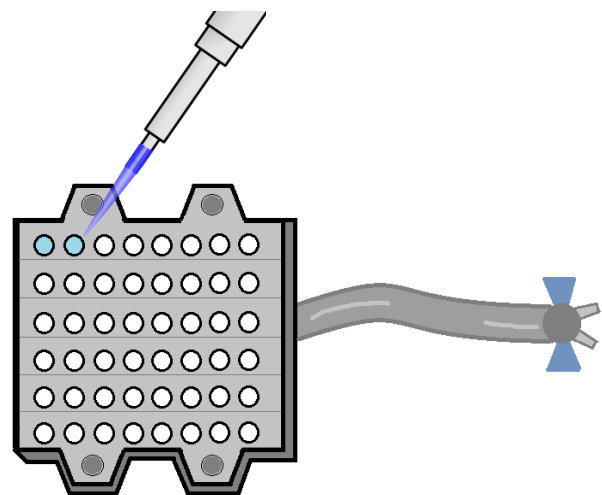


Figura 3 Ejemplo para el cargado de las muestras

8.6.4 Inmuncitoquímica.

Se realizó una inmuncitoquímica para la detección y localización de la proteína de transporte mitocondrial nativa (Mpc1) en células de insecto Sf+ con el fin de poder ubicarla en la mitocondria con ayuda del colorante rojo fluorescente MitoTracker Deep Red FM y del anticuerpo BR44L, siguiendo el siguiente protocolo:

- a. Se depositaron 40,000 células Sf+/pozo en una Chamber Slide y se dejaron incubando 24 horas para favorecer la fijación celular.
- b. Se realizó una dilución del colorante MitoTracker Deep Red en medio PSFM, a una concentración de 500 nM = 0.0005 mM.
- c. Se retiró el medio de los pozos y se agregaron 200 μL de la solución de MitoTracker.
- d. Se dejó incubando por 40 min.
- e. Nuevamente se retiró el medio de cada pozo y se añadieron 125 μL de medio PSFM fresco.
- f. Se añadió paraformaldehído al 3.7 % diluido en PBS por 15 minutos.
- g. Se retiró el paraformaldehído y se realizaron 4 lavados con PBS.
- h. Para permeabilizar la membrana se incubaron las células con Tritón X-100 al 0.2% diluido en PBS por 10 min.

- i. Se retiró el Tritón X-100 y se hicieron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- j. Se añadió leche al 5% disuelta en PBS para bloquear, por 2 horas.
- k. Se retiró la leche y se realizaron lavados con PBS para eliminar cualquier residuo.
- l. Se añadió el anticuerpo BR44L que detecta a Mpc1 diluido 1:500 en PBS con 5% leche y se dejó incubando por 1 hora.
- m. Se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados, 2 con PBS y el último con PBST por 5 minutos cada uno.
- n. Se agregó al anticuerpo secundario conjugado con alexa flúor diluido 1:10000.
- o. Se realizaron 3 lavados al igual que el paso m.
- p. Se desmontó la Chamber Slide y se agregó una pequeña gota de solución de montaje en una de las esquinas de cada pozo y se colocó un cubreobjetos.
- q. Se utilizó barniz para sellar.
La placa se guardó a 4°C hasta su posterior análisis.

8.7 Diseño y construcción del vector pFastBacDual

Se utilizó el vector pFastBacDual para la clonación de las proteínas de interés Mpc1 y Mpc2 lo que permitiría la generación del baculovirus recombinante mediante el sistema Bac to Bac de Invitrogen y por consiguiente la expresión de ambas proteínas en células de insecto.

8.7.1 Descripción y características del vector (Anexo 13.1).

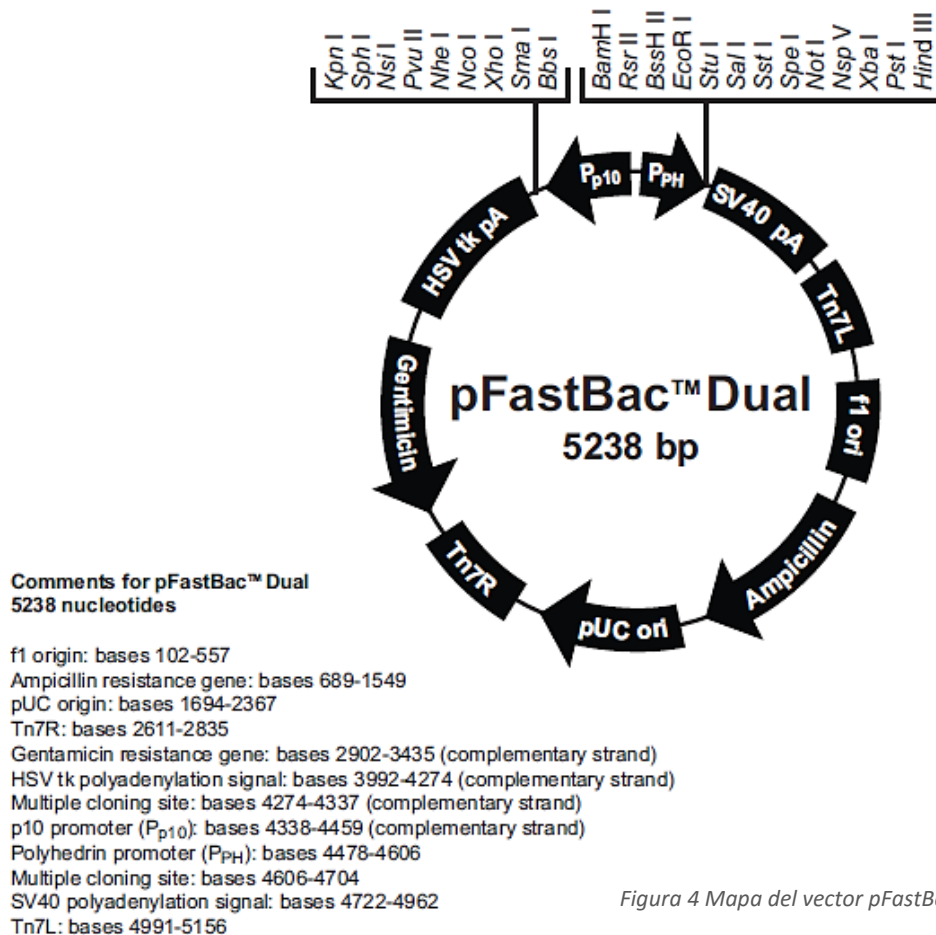


Figura 4 Mapa del vector pFastBac Dual de Invitrogen.

8.7.2 Diseño y estrategia de construcción del plásmido control pFBDual Mpc1/Mpc2.

- La amplificación de plásmido se realizó transformando células quimiocompetentes de *E. coli* DH5α usando el método de choque térmico. La extracción de ADN Plasmídico se realizó mediante el kit Zyppy Plasmid Miniprep Kit de Zymo Research.
- Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR): Para todas las reacciones de PCR se usó la enzima phusion DNA polymerase de New England Biolabs (NEB). En el PCR de colonia se usó la *Taq* polymerase con ThermoPol Buffer de la misma compañía. Las reacciones se prepararon de forma idéntica a la sugerida por el proveedor, dependiendo del volumen elegido y en todas se añadió 1 µL de ADN, debido a que se ajustaba su concentración por medio de diluciones, para tener entre 5-8 ng/µL y no usar más de lo recomendado. En el caso de la amplificación de las proteínas de Mpc1 y Mpc2 se añadía DMSO a la reacción para evitar la formación de estructuras secundarias.
- Digestiones: se realizaron con enzimas NEB y se prepararon reacciones de 50 µL siguiendo la cantidad de cada componente como lo especifica el proveedor. Únicamente se variaba el ADN utilizado y el tiempo de incubación.
- Ligación: se utilizó la enzima T4 DNA Ligase de NEB con el T4 Ligase Buffer y las reacciones se preparaban como recomienda el proveedor para 20 µL totales máximo 25. Antes de la ligación, se defosfatava al vector para evitar que se ligara así mismo y se impidiera la clonación del gen de interés. Se agregaba 1 µL de enzima CIP (Fosfatasa alcalina de intestino de ternera) inmediatamente después de la digestión, la cual ya contenía el buffer y se incubaba por 1h a 37°C.
- Purificación de ADN: en los casos donde se requería se purificó por columna usando el Kit Zymo Research “DNA Clean & Concentrator”.

8.7.2.1 Se diseñaron oligos para amplificar las secuencias de las proteínas Mpc1 y Mpc2 con los sitios de restricción necesarios para poder clonarlas en el plásmido pFastBacDual. Ambas secuencias cuentan con la secuencia Kozak con la finalidad de poder ser expresadas en células de mamífero (Tabla 2).

El gen que codifica para Mpc1 se insertará bajo el gen de poliedrina mientras que el de Mpc2 en el de p10 (Figura 5).

Tabla 2 Diseño de oligos para la amplificación de las secuencias de Mpc1 y Mpc2

Oligo	Longitud (bp)	Secuencia (5'-3')
Mpc1Fwd_polh	36	CTT <i>GAATTC</i> TGG ATA TCG GCC ACC ATG GCT GGA GCG
Mpc1Rev_polh	42	TTG <i>CTGCAG</i> GTT CTA <i>ACTAGT</i> <u>AGC</u> AGA TGG CCG CTT ACT CAT
Mpc2_Fwd_p10	38	TTA <i>CTCGAG</i> ATA <u>TCC</u> TAG GGC CAC CAT GGC AGC TGC CG
Mpc2_Rev_p10	49	CAC <i>GGTACC</i> TAT TTA <i>ACTAGT</i> <u>CTG</u> GAT CCC TTT AGA TTT GAG TTC <u>TTG</u> G

¹Las letras en cursiva representan sitios de restricción de diferentes enzimas (detallados más adelante).

³Las letras subrayadas corresponden a la secuencia de la proteína.

²Las letras en negrita corresponden a la secuencia Kozak.

8.7.2.2 Representación de las secuencias amplificadas de cada proteína (5'-3').

a. Mpc1: EcoRI /Mpc1/ SpeI/ TAG/ PstI

b. Mpc2: XhoI /Mpc2/ SpeI/ TAA/ KpnI

8.7.2.3 Representación del plásmido pFastBac Dual Mpc1/Mpc2:

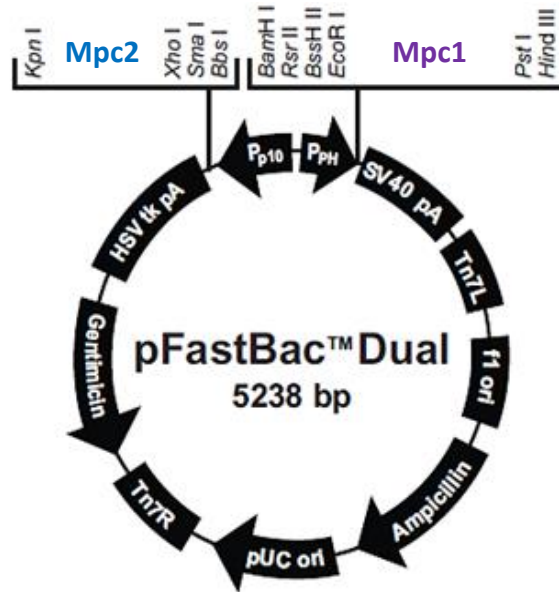


Figura 5 Representación del vector pFBDual Mpc1/Mpc2

8.7.3 Diseño y estrategia de construcción del plásmido pFBDual Mpc1-EGFP/Mpc2-RFP

8.7.3.1 Se diseñaron oligos para amplificar las secuencias de las proteínas fluorescentes que se fusionarían a Mpc1 y Mpc2, con los sitios de restricción necesarios para poder ligarlas directamente a las secuencias o clonarlas en el plásmido pFastBacDual. Se decidió fusionar Mpc1 a EGFP y Mpc2 a RFP ambas en el extremo C' terminal (Tabla 3).

8.7.3.2 En el diseño de oligos se incluyó una secuencia corta de 6 aminoácidos que servirá como líker entre ambas proteínas, este consiste en una modificación realizada por el LCG. Enrique Paz de la secuencia que desarrolló M.C Ricardo Rojas en el 2009.

Tabla 3 Diseño de oligos para la amplificación de secuencias de proteínas reporteras

Oligo	L (bp)	Secuencia (5'-3')
EGFP_Fwd_Mpc1	51	TTA <i>GAATTC</i> ATA <i>GCTAGC</i> GGA GAT CCT CAT <u>GTG AGC AAG GGC</u> <u>GAG GAG CTG</u>
EGFP_Rev_Mpc1	35	TAT <i>CTGCAG</i> AGA TTA <u>CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC</u>
mRFP-FWD	51	GCA <i>GAATTC</i> TGA <i>GCTAGC</i> GGC GAC CCT CAT <u>ATG GCT TCC TCC GAA</u> <u>GAC GTT</u>
RFP_Rev_Mpc2	38	CA <i>GGTACC</i> ATA CTA <u>GCA CTA TCA GCG TTA TTA AGC A CC</u>

¹Las letras en cursiva representan sitios de restricción de diferentes enzimas (detallados más adelante).

³Las letras subrayadas corresponden a la secuencia de la proteína.

²Las letras en negrita corresponden a los últimos 4 aminoácidos de la secuencia del linker, los primeros 2 corresponden al sitio de restricción que se encuentra antes.

8.7.3.3 Representación de las secuencias amplificadas de cada proteína (5'-3').

a. EGFP: NheI /Linker/**EGFP**/ TAA/ PstI

b. RFP: KpnI/TAA/**RFP**/Linker/NheI

8.7.3.4 Representación del plásmido pFastBac Dual Mpc1-EGFP/Mpc2-RFP:

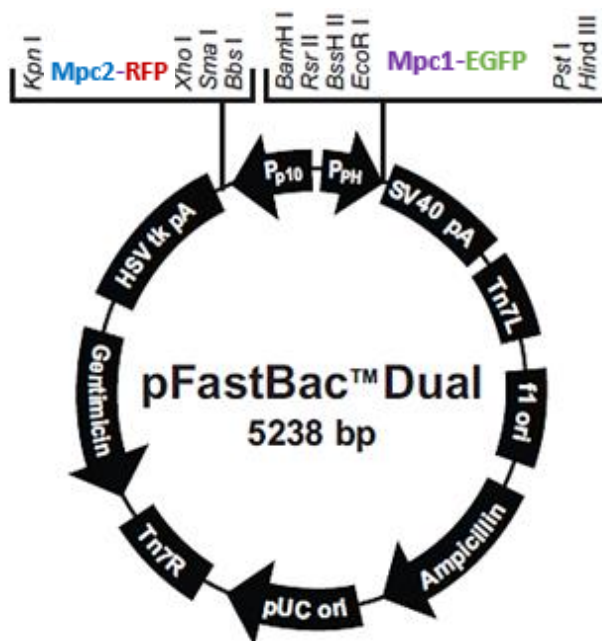


Figura 6 Representación del vector pFBDual Mpc1-EGFP/Mpc2-RFP

IX. Resultados y discusiones.

9.1 Cinética de células de insecto sin infectar e infectadas con el baculovirus roGFP2-citoplasma

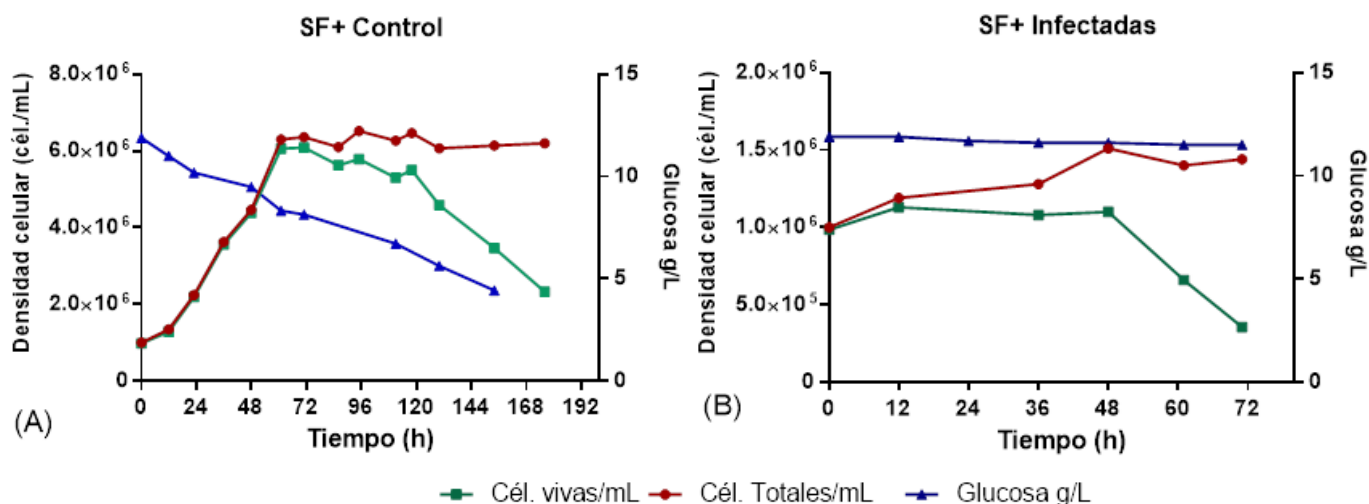


Figura 7 Cinéticas de crecimiento de células Sf+ y concentración de glucosa en el medio. A. Células sin infectar; B. Células Infectadas por Bac roGFP-2 citoplasma

9.1.1 Análisis de la cinética de crecimiento y consumo de glucosa de células Sf+.

En las células control, la fase lag al parecer tuvo una duración menor a las 20h, mientras que la fase exponencial se mantuvo hasta las 60h. Posteriormente se observa el inicio de la fase estacionaria que duró ≈60h. A partir de las 118h se produce una disminución pronunciada de la viabilidad, que decayó del 85% hasta el 57% en tan sólo 24 horas. El cultivo se detuvo cerca de las 180h cuando la viabilidad se encontraba apenas por encima del 35%. El cultivo permitió obtener los siguientes datos de interés:

- La densidad celular máxima fue de 6.3×10^6 cél./mL a las 61h de cultivo.
- La viabilidad se mantuvo por encima del 95% hasta las 71h
- La μ fue de 0.03 h^{-1} y el TD de 22 h

Con respecto a la cinética de células Sf+ infectadas por baculovirus, claramente se aprecia como ocurre un cambio metabólico importante ya que no se presentó una fase de crecimiento exponencial, por el contrario, el cultivo parece estacionarse y no logra alcanzar más allá de 1.4×10^6 cél./mL, apenas por encima de la densidad a la que se inocularon las células. Esto también concuerda con el efecto de la multiplicidad de infección empleada que fue de 5 ufp/cél, ya que el uso de multiplicidades altas produce una infección generalizada donde la mayor parte de las células son infectadas inicialmente, y al ser arrestadas por el baculovirus no continúan creciendo, destinando su maquinaria de síntesis hacia la producción de proteínas virales.

La viabilidad comenzó a decaer a partir de las 12h, indicando que el baculovirus empleado es potente y los virus gemados producidos son altamente infecciosos ya que lograron propagar rápidamente la infección alrededor del cultivo, ocasionado que el metabolismo celular se viera afectado. Además, a partir de las 24h comienza la etapa muy tardía del ciclo viral, lo que produce que la proteína bajo el promotor de *polh* (roGFP-2) comience a producirse en grandes cantidades y se acumule dentro de las células por lo que el tamaño celular incrementa, esto también se origina

por la acumulación de viriones. Todo lo anterior ocasiona la alteración del ciclo celular y conlleva a que la célula muera rápidamente en comparación a cuando no es infectada por baculovirus.

Los valores de la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo, permite justificar lo observado en las gráficas de crecimiento, deduciéndose lo siguiente:

- En las células sin infectar, el consumo de glucosa resultó como lo esperado ya que las células presentan un metabolismo no alterado y necesitan consumirla para poder adquirir la energía necesaria para la biosíntesis de los componentes celulares que permitan el crecimiento celular.
- Por el contrario, en el caso de las células de insecto infectadas, éstas no consumen glucosa a lo largo del cultivo al no observarse una disminución de su concentración en el medio, lo que corresponde a lo anteriormente reportado (Anexo 13.2). Esta situación se origina debido a que las células recurren a otro mecanismo: el metabolismo de los aminoácidos. Diferentes estudios han demostrado que las células infectadas presentan un alto consumo de aminoácidos a una tasa mayor de lo estrictamente necesario para la síntesis proteica, esto da a entender de la importancia de las vías anapleróticas especialmente a bajas densidades, como en este caso. El metabolismo de aminoácidos permite la incorporación de esqueletos carbonados al ciclo de Krebs logrando la producción de energía mediante la fosforilación oxidativa situación que también demuestra el alto consumo de oxígeno.

9.2 Medición de unidades arbitrarias de fluorescencia: análisis de la expresión de proteína recombinante roGFP2 dirigida a citoplasma.

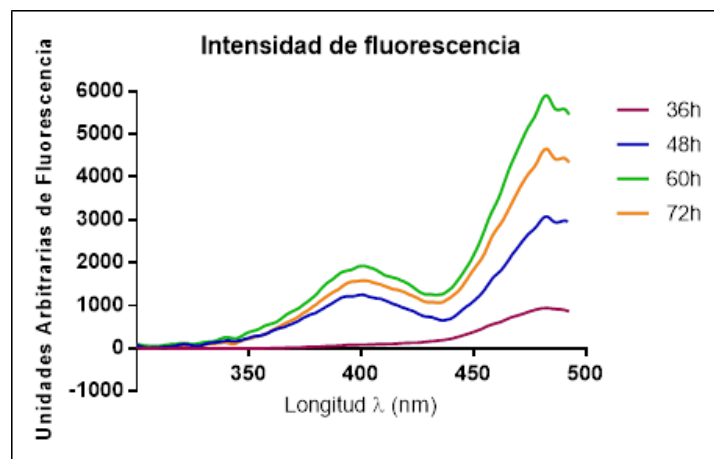


Figura 8 Intensidad de fluorescencia de muestras del cultivo de células Sf+ infectadas

La gráfica presenta las unidades arbitrarias de fluorescencia alcanzadas a lo largo del cultivo, lo que permite tener una idea de los niveles de expresión de la proteína recombinante roGFP-2. Se observa que a las 60h se presentó la cantidad máxima de 6000 unidades. Sin embargo, lo esperado era que la cantidad máxima fuera alcanzada a las 72h que corresponde al último monitoreo, pero no fue así, una posible explicación para este fenómeno puede deberse a que las muestras no se leyeron inmediatamente después de ser tomadas y se dejaron expuestas a temperatura ambiente, lo que provocó posiblemente una degradación de la proteína.

9.3 Determinación de piruvato extracelular e intracelular de células Sf+ por cromatografía líquida de alta resolución.

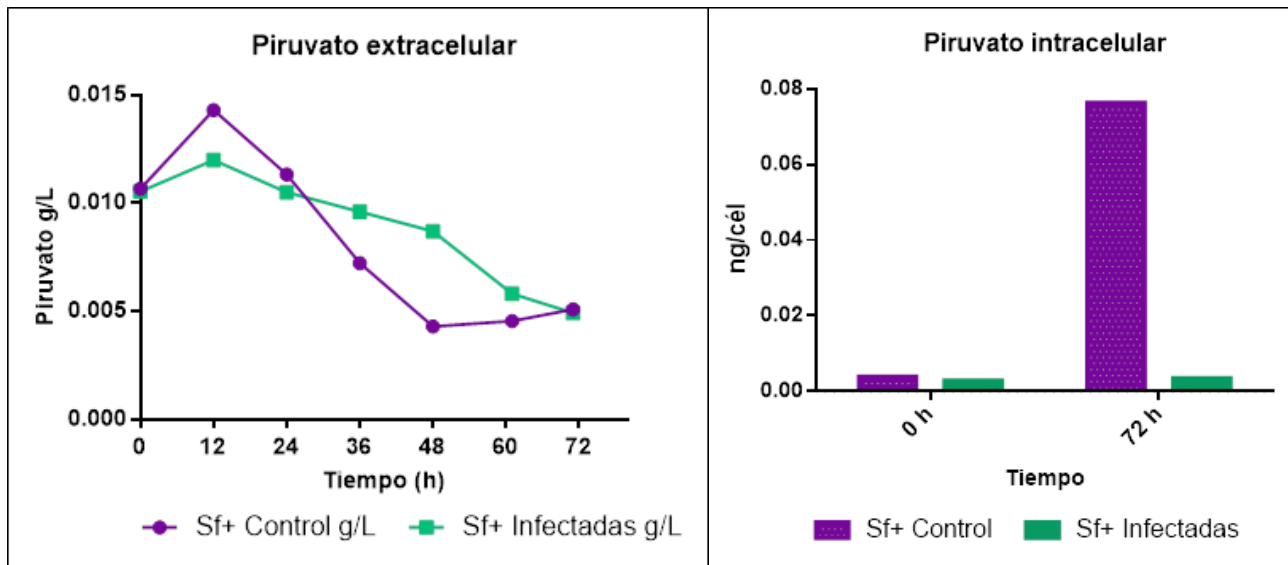


Figura 9 Concentración de piruvato en el medio

Figura 10 Concentración de piruvato intracelular

9.3.1 Concentración de piruvato intracelular y extracelular en células Sf+.

Al inicio del cultivo se puede observar un valor inicial de piruvato, indicando su presencia en el medio de cultivo.

- Células Sf+ control: los valores de piruvato muestran que durante poco antes de la fase exponencial (12 h), se incrementa la concentración de piruvato en el medio, esto puede explicarse a que en esta etapa del crecimiento celular existe una tasa elevada de glucólisis que por consiguiente ocasiona una acumulación de piruvato a tal grado que es excretado al medio de cultivo. Durante el resto del crecimiento exponencial (24-60 h) se observa un consumo de del piruvato presente en el medio, esto se debe a que durante esta etapa la demanda energética es elevada debido a la duplicación celular. Respecto a los niveles de piruvato intracelular ocurre que a las 72 h de cultivo existe una acumulación de piruvato, lo cual puede atribuirse a que la fase exponencial ha terminado y la demanda energética ha disminuido.
- Células Sf+ Infectadas: Se puede apreciar un consumo del piruvato presente en el medio, el cual podría estarse destinando a la producción de energía. Respecto a los niveles de piruvato intracelular a las 0 y 72 h estos no varían significativamente debido a que tal como se observa en la Figura 7-B, no existe un consumo de glucosa.
- Los gráficos anteriores permiten visualizar el comportamiento cinético del cultivo de células Sf+ infectadas y sin infectar lo cual será de utilidad al momento de caracterizar los cultivos de células que sobreexpresen el transportador mitocondrial de piruvato, pudiendo así compararlos con la finalidad de identificar el efecto que este pueda tener sobre el metabolismo central.

9.4 Identificación de la proteína nativa de transporte mitocondrial de piruvato Mpc1 en células de insecto mediante técnicas de inmunodetección

9.4.1 Microensayo de Bradford para cuantificación de proteína total.

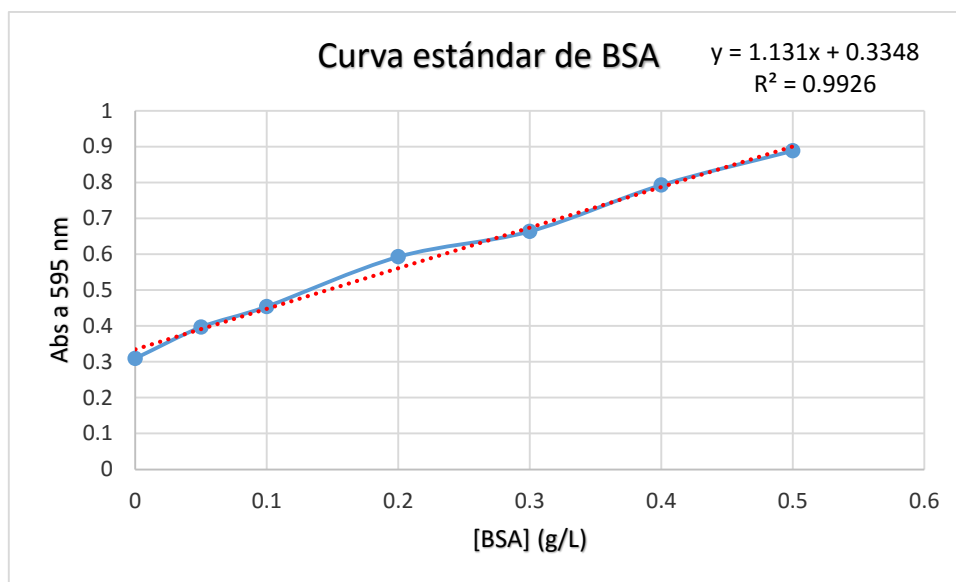


Figura 11 Curva estándar de BSA

9.4.1.1 Concentración de proteína total en muestras de cultivo de células de insecto Sf+

Tabla 4 Concentración de proteína total en las muestras del cultivo de células Sf+

Muestra	ABS	ABS	Promedio (ABS)	[mg/mL]	FD	[Final] (mg/mL)
M1 24 h	0.484	---	0.484	0.132	20	2.64
M1 36 h	0.455	0.407	0.431	0.085	20	1.70
M1 48 h	0.437	0.42	0.4285	0.083	20	1.66
M2 36 h	0.517	0.562	0.5395	0.181	10	1.81
Ctrl 12 h	0.478	0.449	0.4635	0.114	20	2.28
Ctrl 24 h	0.386	0.351	0.3685	0.030	20	0.60

9.4.2 Técnica de detección de proteínas por Western Blot.

Muestras de células Sf+	
1	Sin infectar 0h
2	Infectadas (M1) 24h
3	Infectadas (M1) 36h
4	Dual Color
5	Infectadas (M2) 36h
6	Infectadas (M1) 48h
7	C+ CHO Mpc1/Mpc2

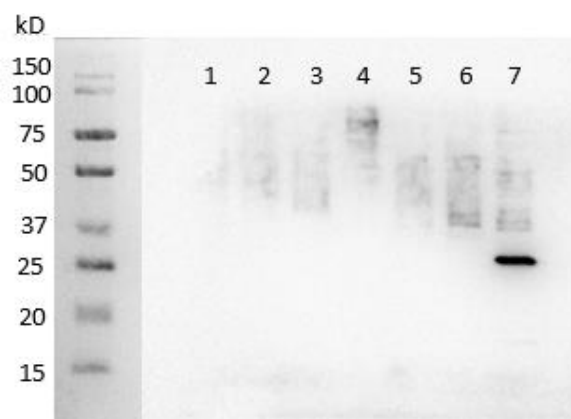


Figura 12 Membrana de Western Blot para la detección de Mpc1 nativa en células Sf+

Como se observa en la imagen, no fue posible detectar Mpc1 nativa de células de insecto mediante WB, las múltiples bandas que se observan se deben a inespecificidades, probablemente la concentración del anticuerpo secundario no fue la adecuada y habría que probar con una concentración más baja, o el tiempo de bloqueo no fue eficiente, ocasionando que el anticuerpo se uniera a la membrana.

9.4.3 Técnica de detección de proteínas en su forma nativa por Dot Blot.

Muestras de células Sf+				
C	A		B	
	Nombre	µg	Nombre	µg
1	C1 48h	30	C1 48h	20
2	C2 48h	30	C2 48h	20
3	M1 48h	30	C1 48h	40
4	M2 48h	30	M1 24h	40
5	M1 60h	30	M2 36h	40
6			Ctrl. 12h	30
7			M2 72h	40
8			C+ CHO	40

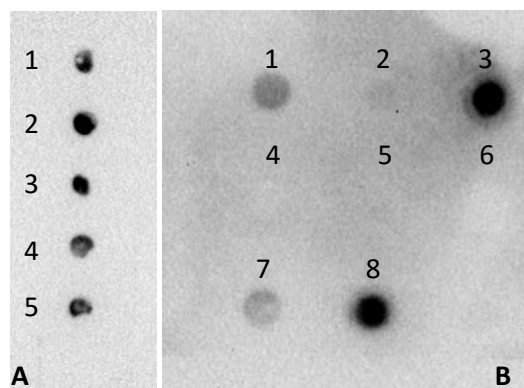


Figura 13 Membrana de Dot-Blot para la detección de Mpc1 nativa en células Sf+.

Ambas imágenes permiten demostrar que la proteína nativa Mpc1 si puede ser detectada mediante el anticuerpo utilizado (BRP44L) y al compararlo con el ensayo de WB se deduce que probablemente la región que reconoce este anticuerpo se encuentre en una forma tridimensional de la proteína por lo que es probable detectarla en su forma nativa que es el caso de esta técnica, probablemente el anticuerpo no la reconozca cuando se encuentra desplegada o desnaturizada debido a que ha perdido esta conformación espacial. En el caso de la figura B, no se observa la detección de la proteína en las muestras de células Sf+ infectadas por Bac roGFP-2 dirigida a mitocondria ni de las células sin infectar a las 12h de cultivo, posiblemente porque la concentración de proteína presente en la muestra era demasiado baja.

9.4.4 Inmuncitoquímica.

En las imágenes presentan los diferentes campos visualizados. Como puede observarse en la figura 14-D, el anticuerpo saturó toda la célula y no presenta la distribución esperada, que era alrededor de las mitocondrias lo que permitiría colocalizar la proteína Mpc1 nativas de las células con MitoTracker (Figura 14-C)

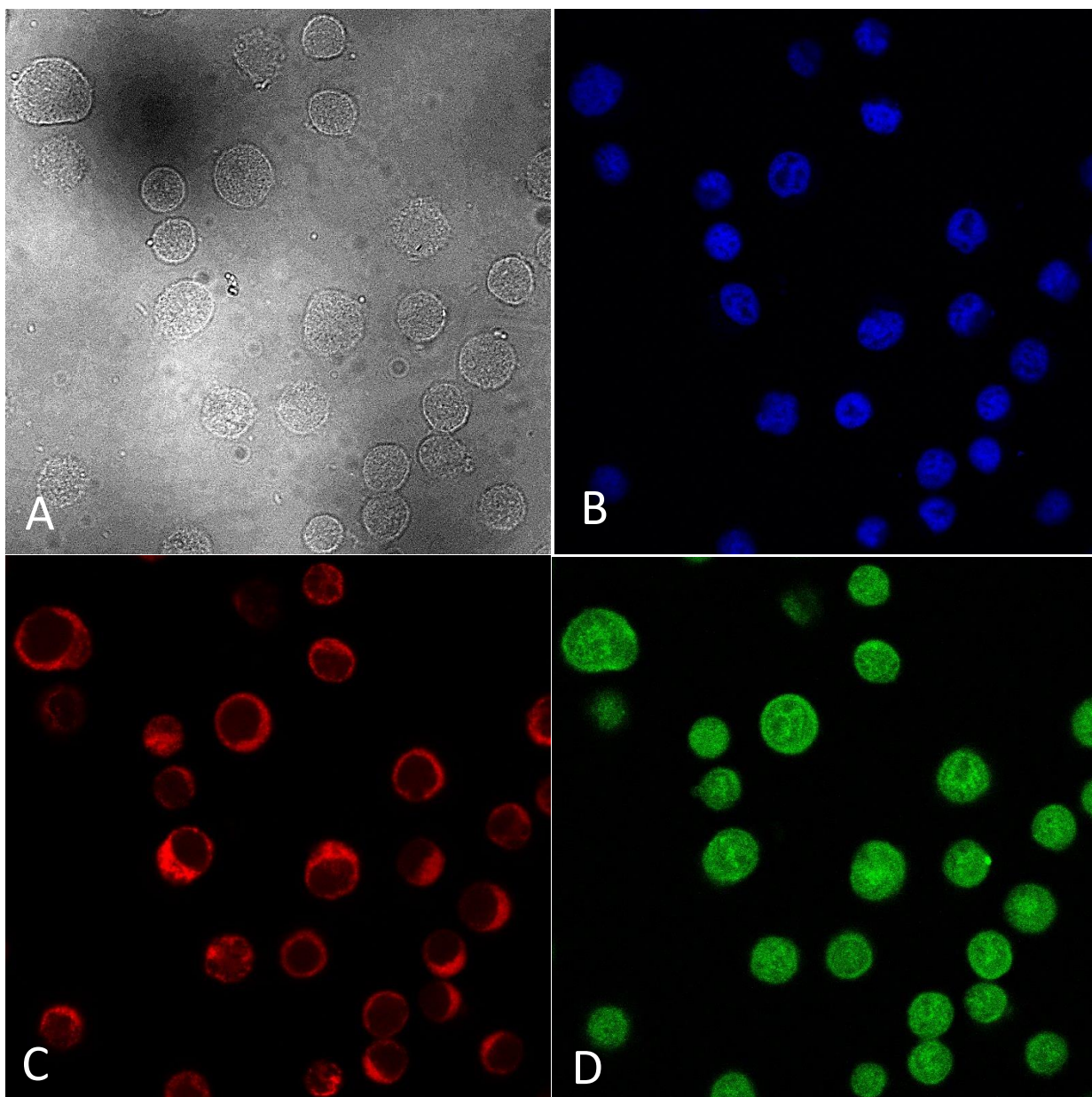


Figura 14 Células de insecto Sf+: A. Campo claro; B. Tinción de núcleos por DAPI; C. Tinción de mitocondrias por MitoTracker; D. Anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor.

9.5 Diseño y construcción del vector pFastBacDual

A continuación se presentan los avances en la construcción del vector hasta el momento, se da una breve descripción y se presentan tablas que permiten identificar cada carril (C) con la muestra que le corresponde. Además, se indican los pares de bases que debía presentar el amplicón, a partir del cual se deduce si la reacción fue exitosa o no. Por lo general, únicamente se muestran los experimentos exitosos que permitieron avanzar en la construcción y de lo contrario se especifica en la descripción.

9.5.1 Amplificación de *mpc2*.

Se realizaron 2 reacciones de PCR de 25 μ L, para verificar si los oligos y el programa de PCR elegido era adecuado, como se puede observar fue posible amplificar correctamente la secuencia.

9.5.1 ORDEN DEL GEL		
C	Muestra	pb
1	Marcador Molecular 100pb	
2	PCR <i>mpc2</i>	427
3	PCR <i>mpc2</i>	427

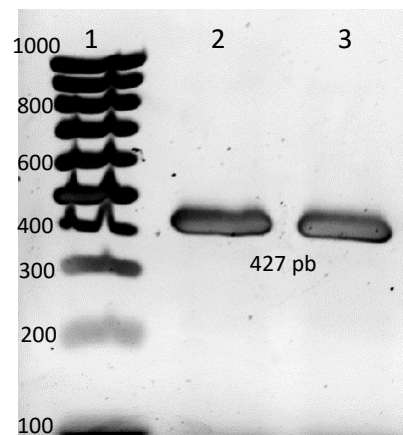


Figura 15 Amplificación de *mpc2*

9.5.2 Digestiones purificadas por columna de *mpc2*/SpeI y NheI/RFP.

Se observan los productos de la digestión de ambas secuencias y a pesar de haber sido purificados por columna presentan suciedad, sin embargo, esto no pareció afectar los pasos posteriores.

9.5.2 ORDEN DEL GEL		
C	Muestra	pb
1	MM 100pb	
2	pDig. <i>mpc2</i> /SpeI	412
3	pDig. NheI/RFP	734

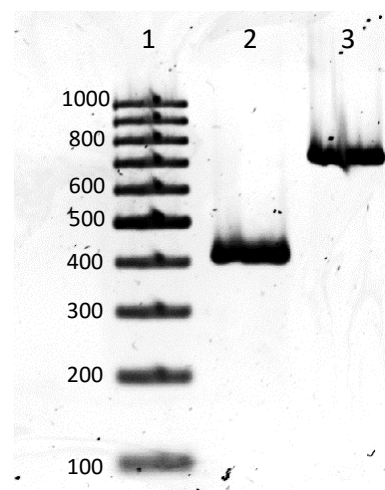


Figura 16 Digestiones de *mpc2* y RFP

9.5.3 Ligación de *mpc2* a RFP.

A partir de las digestiones del paso anterior se procedió a ligar directamente ambas secuencias, *mpc2/SpeI* y *NheI/RFP*, estos sitios de restricción son compatibles por lo que pueden ligarse sin mayor problema, lo que resulta en un nuevo sitio totalmente diferente a ambos.

Una reacción se dejó incubando 2 horas a 16°C y la otra en el termociclador con ciclos de 30°C y 16°C, una estrategia propuesta por LCG. Enrique Paz. Como se observa en la imagen, esta estrategia resultó más eficiente y en estudios posteriores fue la única empleada.

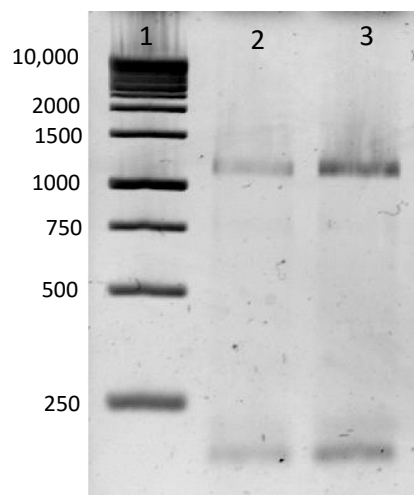


Figura 17 Ligación *mpc2*-RFP

9.5.3 ORDEN DEL GEL		
C	Muestra	pb
1	MM-1kb	
2	PCR Lig. 16 °C	1146
3	PCR Lig. 30/16 °C TC	1146

9.5.4 Amplificación de *mpc1* y EGFP.

Se observa que la amplificación de EGFP esta ocasión si resultó exitosa, pero fue menos eficiente para la muestra 5, donde además se observa una alta cantidad de productos inespecíficos por debajo de los 100pb.

9.5.4 ORDEN DEL GEL		
C	Muestra	pb
1	MM-100 pb	
2	PCR <i>mpc1</i>	372
3	PCR EGFP p7U	783
4	PCR EGFP p7U	783
5	PCR EGFP pPCR polh GFP-VP3	783

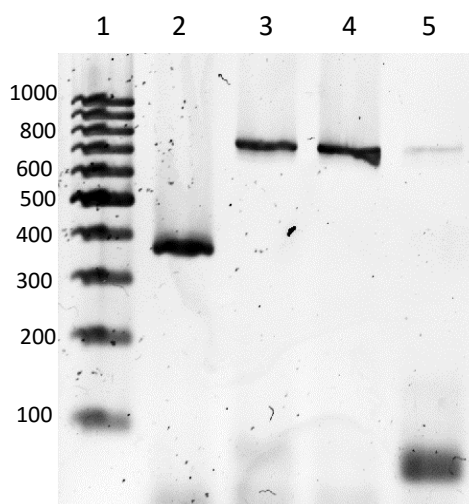


Figura 18 Amplificación de *mpc1* y EGFP

9.5.5 Ligación de *mpc1*-EGFP.

De las digestiones de *mpc1* y EGFP se realizó una ligación, siguiendo el mismo procedimiento del que se usó en la lig. *mpc2*-RFP. Sin embargo, al querer confirmar por PCR si había logrado exitosa no se observó ninguna banda de los pb esperados (1128pb), además de que se presentan productos inespecíficos (\approx 750 y 400pb).

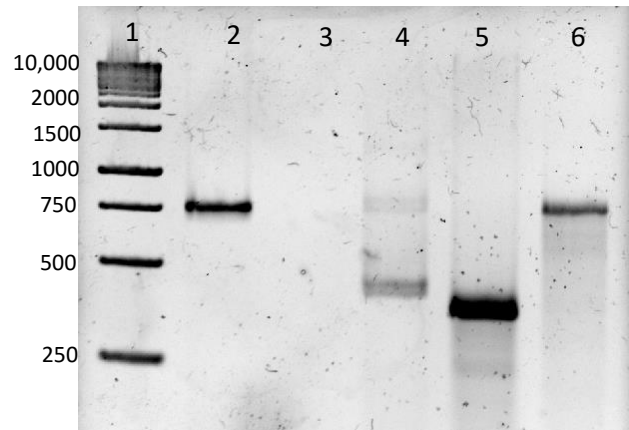


Figura 19 Ligación *mpc1*-EGFP

9.5.5 ORDEN DEL GEL		
C	Muestra	pb
1	MM 1 kb	
2	PCR EGFP 1	783
3	PCR EGFP 2	783
4	PCR Lig. <i>mpc1</i> -EGFP	1128
5	pDig. <i>mpc1</i> /Spel	357
6	pDig. NheI/EGFP	771

9.5.6 Repetición de la Lig. *mpc1*-EGFP.

Se repitió la ligación a partir de los purificados de digestión de *mpc1* y EGFP. Posteriormente, para comprobarla se realizó una reacción de PCR usando el Fwd de *mpc1* y Rev de RFP. Como se puede observar en la imagen, nuevamente aparecen productos inespecíficos (\approx 400 bp). En esta ocasión, se obtuvieron dos amplicones por encima de 1000bp, la ligación esperada era de 1128pb. Probablemente sea el más cercano a 1000 así que se tendrá que purificar y transformar células competentes para confirmar por PCR de colonia.

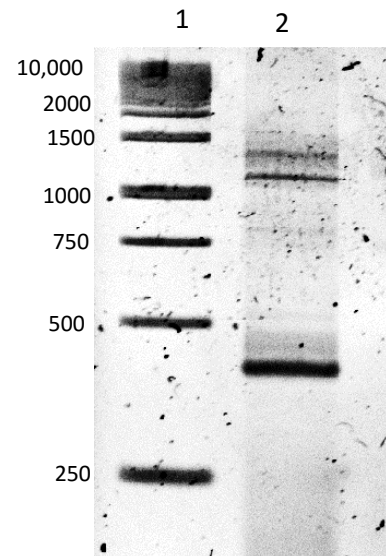


Figura 20 Ligación 2. *mpc1*-EGFP

9.5.6 ORDEN DEL GEL		
C	Muestra	pb
1	MM-1kb	
2	PCR Lig. 30/16°C	1128

9.5.7 PCR de colonia pFastBac Dual.

Se amplificó el vector transformando células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α . Posteriormente, se realizó un PCR de colonia para comprobar la presencia del plásmido y poder realizar gliceroles. Como Fwd se utilizó el del promotor de *polh* y el Rev de la señal de *polyA* (poliadenilación). Se comprobó que todas las colonias picadas presentaban el vector al mostrar la secuencia amplificada esperada de ≈ 490 .

9.5.7 ORDEN DEL GEL		
C	Muestra	pb
1	MM-1Kb	
2	Colonia a	490
3	Colonia b	490
4	Colonia c	490
5	Colonia d	490

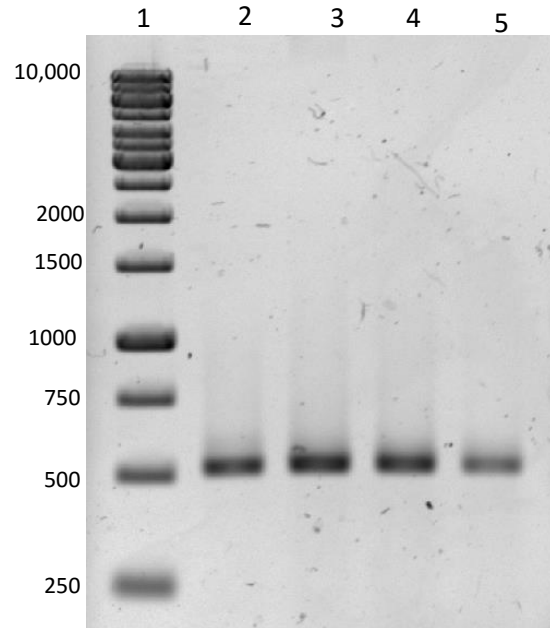


Figura 21 PCR de colonia pFBDual

9.5.8 Digestión de EcoRI/*mpc1*/PstI & EcoRI/pFBDual/PstI

Las digestiones se incubaron por 2h a 37°C, posteriormente se inactivaron a 80°C por 20min. Después, se defosfató el vector con 1 μ L de enzima CIP a 37°C por 1h. Posteriormente se cargaron muestra de cada digestión e el gel.

9.5.8 ORDEN DEL GEL		
C	Muestra	pb
1	MM-1 Kb	
2	pDig. <i>mpc1</i>	357
3	pDig. pFastBac Dual	5175

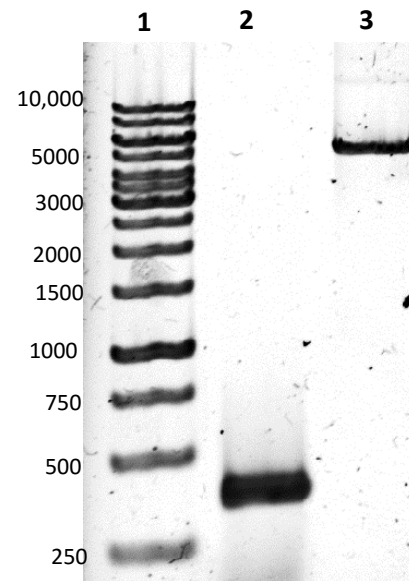


Figura 22 Digestión de *mpc1* y pFBDual

9.5.9 Ligación de pFastBac Dual- *mpc1*.

Se realizó una ligación de los productos de digestión de *mpc1* y pFBDual y para comprobarla se preparó una reacción de PCR en donde se utilizó el Fwd de *polh* y Rev del sitio de *polyA*. Se esperaba un fragmento de 841pb el cual se observó en la muestra 2. Nuevamente se demostró que la estrategia de los ciclos a 30/16°C resulta más eficiente. Posteriormente esta ligación fue utilizada para transformar células quimiocompetentes DH5α.

9.5.9 ORDEN DEL GEL		
C	Muestra	pb
1	MM-1 Kb	
2	PCR Lig. PFBDual + <i>mpc1</i> 16°C	841
3	PCR Lig. PFBDual + <i>mpc1</i> 30/16°C	841

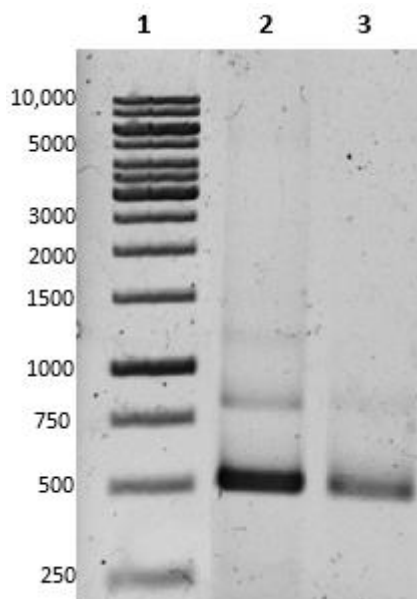


Figura 23 Ligación pFBDual-*mpc1*

9.5.10 PCR de colonia ligación pFastBac Dual-*mpc1*.

9.5.10 ORDEN DEL GEL		
C	Muestra	pb
1	MM-100 bb	
2	Colonia 1	485
3	Colonia 2	485
4	Colonia 3	485
5	Colonia 4	485
6	Colonia 5	485
7	Colonia 6	485
8	Colonia 7	485
9	Colonia 8	485

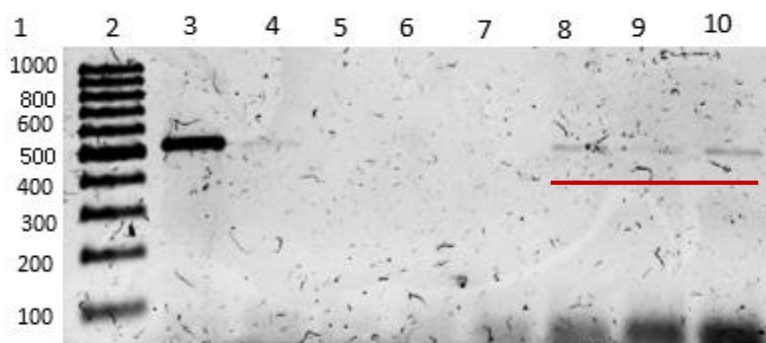


Figura 24 PCR de colonia lig. PFBDual*mpc1*

Se realizó una reacción de PCR de colonia usando el Fwd de *polh* del vector y el Rev de *mpc1*, por lo que se esperaba un fragmento de 485 pb (128 de *polh* + 357 *mpc1*). Como se observa la colonia C1 es la que mejor se aprecia mostrando que las células se transformaron correctamente con la ligación, las colonias C7-C9 también presentaron en menor medida el plásmido resultante de la ligación.

9.5.11 Digestión del pFBDual + *mpc1* para comprobar el inserto.

9.5.11 ORDEN DEL GEL			
C	Muestra	pb (pFBDual)	pb
1	MM-1Kb		
2	NheI/pC1/EcoRI	5260	335
3	NheI/pC9/EcoRI	5260	335
4	XhoI/pC1/SpeI	4588	672
5	XhoI/pC9/SpeI	4588	672

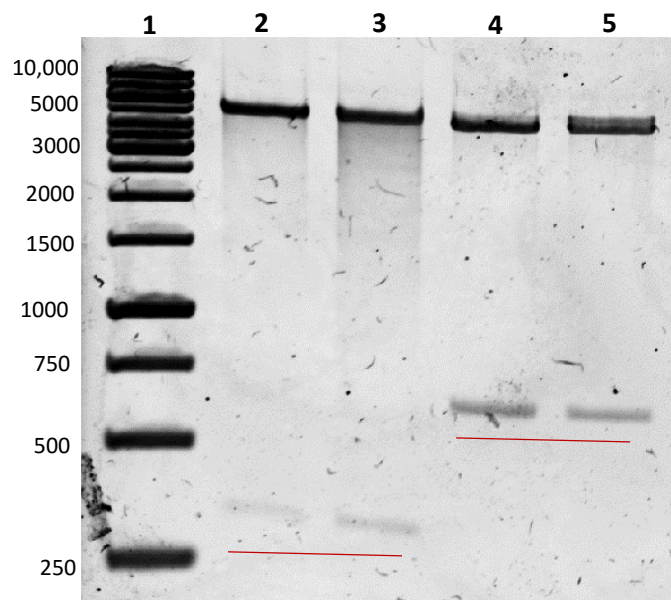


Figura 25 Digestión pFBDual- *mpc1*

Se realizaron digestiones de los plásmidos extraídos de dos de las colonias que mostraron la ligación en el PCR de colonia (C1 Y C9). Se utilizaron diferentes enzimas para verificar la presencia del inserto *mpc1* en el vector. La imagen demuestra que ambos plásmidos mostraron fragmentos de corte con los pb esperados, confirmándose así la presencia de *mpc1* en el vector de ambas colonias.

X. Conclusiones y recomendaciones

Hasta el momento se han logrado avances en cuanto al estudio, familiarización e implementación de diferentes técnicas de laboratorio, una de ellas, es la detección de proteínas mediante ensayos de inmunodetección. Esto ha permitido saber que es probable que la proteína nativa de Mpc1 se degrade durante la sonicación y no sea posible detectarla por WB, también es probable que la región que reconoce el anticuerpo se trate de una estructura tridimensional en células de insecto, por lo que es posible detectarla mediante Dot Blot, pero no cuando se encuentra totalmente desplegada. Esto representaría una ventaja en el aspecto de que, cuando se exprese Mpc1 de ratón en células de insecto y se detecte por WB, no se tendría el ruido de fondo ocasionado por la detección de las proteínas nativas, asegurándose así la expresión de la proteína.

Se ha avanzado en la implementación de la técnica de HPLC en muestras de células de insecto sin infectar e infectadas por un baculovirus recombinante, lo que ha permitido saber si el equipo es lo suficientemente sensible para detectar concentraciones de piruvato intracelular. Los resultados obtenidos han demostrado que sí es posible cuantificar concentraciones de piruvato del orden de ng/cél, por lo que esta técnica si resulta viable para proporcionar evidencia sobre la funcionalidad del transportador.

En cuanto a la fusión de proteínas y construcción del vector recombinante, se ha logrado la fusión de Mpc2 a la proteína reportera RFP, sin embargo, hasta el momento sólo se ha intentado clonar en el vector pJet sin tener éxito, por lo que ahora intentará clonarse directamente en el vector pFastBac Dual. La ligación de *mpc1* a EGFP se ha intentado sin resultados positivos hasta el

momento, por lo que se pretende utilizar otra estrategia que consiste en introducir primero *mpc1* al vector pFBDual y posteriormente clonar EGFP.

Con respecto al vector recombinante que servirá para la generación del baculovirus control (proteínas del transportador sin fusionar), ya se ha logrado insertar el gen de *mpc1* y se está en espera de los resultados para ver si *mpc2* ya ha podido también introducirse.

De los avances obtenidos hasta ahorita, se concluye que el proyecto es extenso, pero realizable, ya que se ha evaluado la eficiencia de las técnicas para lograr el cumplimiento de los objetivos planteados y se presentan bastante viables, ya que con los equipos e instrumentos con los que se cuenta en el laboratorio permiten realizar todas las actividades sin mayor problema.

Como recomendaciones para la continuidad del proyecto, se sugiere utilizar cantidades de muestra mayores para la determinación de piruvato intracelular, ya que al ser centrifugadas y resuspendidas en PBS, la cantidad obtenida es de 100 μ L solamente y el resuspender en mayores cantidades de PBS no resulta adecuado ya que la concentración se diluiría aún más, por lo que se recomienda tomar un volumen mayor de muestra para obtener mayor concentración celular.

XI. Competencias desarrolladas y/o aplicadas

- Capacidad de análisis y síntesis de la información: al procesar, resumir y aplicar la información adquirida mediante la lectura de artículos y textos científicos.
- Desarrollo de capacidades sistémicas: al adaptarme a un nuevo entorno y diferentes situaciones aprendiendo a trabajar de forma autónoma, mostrando iniciativa y actitud positiva.
- Desarrollo de competencias interpersonales: me permitieron interactuar y cooperar con los demás descubriendo mi capacidad crítica y autocrítica, logrando comunicarme con profesionales de distintas áreas.
- Uso de nuevas tecnologías: utilicé diferentes programas y herramientas para la obtención de información, análisis y procesamiento de datos, así como para su representación por medio de gráficas y tablas.
- Desarrollo de habilidades para la experimentación y análisis científico: hice uso de mi capacidad de observación, análisis, identificación y manejo de variables, selección de datos relevantes y planteamiento de hipótesis y objetivos.
- Aprendí a usar conceptos y terminología técnico-científica.
- Me enfrenté a problemas y evalúe diferentes formas de resolverlos integrando mis habilidades y conocimientos adquiridos.
- Me capacité continuamente para poder relacionar y expresar adecuadamente mis ideas de forma oral y escrita.
- Desarrolle mi destreza en la comprensión de una lengua extranjera, al leer y comprender artículos científicos en inglés.
- Dentro de las asignaturas a las que recurrí se encuentran las siguientes:
 - a. Fundamentos de Investigación: me brindó las herramientas necesarias para poder procesar la información y elegir fuentes útiles y confiables.
 - b. Bioquímica: me permitió la comprensión de las reacciones y procesos bioquímicos que se llevan a cabo dentro de la célula, principalmente en la mitocondria, uno de los objetos de estudio de mi proyecto.

- c. Química Analítica: de amplia utilidad para la preparación de soluciones, diluciones de muestras y reactivos, realización de curvas estándar, entre otros.
- d. Microbiología: empleé las técnicas de cultivo y transformación bacteriana específicamente para *E. coli*. También realicé la preparación de medio de cultivo selectivo para el crecimiento y mantenimiento de la cepa.
- e. Bioquímica del nitrógeno y regulación genética: me fueron útiles los temas sobre el proceso de transmisión de la herencia genética y su regulación entre los diferentes seres vivos, así como el fundamento y aplicación de las diferentes técnicas de biología molecular y del ADN recombinante.
- f. Cinética química y biológica: me brindó las herramientas para realizar las cinéticas de crecimiento celular, así como para el análisis y comprensión de los resultados obtenidos y su relación con el consumo de sustratos y producción de metabolitos.

XII. Referencias bibliográficas y virtuales

1. Recombinant Therapeutic Proteins Market & Pipeline Analysis. 2014; New Delhi: Kuick Research.
2. Protein Expression Market by Products (Expression Vector, Service, Reagent), Application (Industrial, Therapeutic), Expression Systems (Mammalian, Prokaryotic, Baculovirus, Yeast) & by End User (Pharmaceutical, Biotechnology, CRO)- Global Forecast to 201. 2014; Magarpatta: Markets and Markets
3. Gooche CF, Gramer MJ, Andersen DC; Bahr JB, Rasmussen J. The oligosaccharides of glycoproteins. *Bio/Technology* 1991; 9:1347–1355.
4. Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT. Principles and Applications of the Insect-Cell-Baculovirus Expression Vector System. *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cellular Applications*. S Ozturk, WS Hu (eds.) Taylor and Francis, Nueva York. 2006; 627-692.
5. Ikononou L, Schneider Y-J, Agathos SN. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 62:1-20.
6. Neermann J, Wagner R. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *J Cell Physiol* 1996; 166:152–69.
7. Cruz HJ, Freitas CM, Alves PM, Moreira JL, Carrondo MJT. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme Microb Technol* 2000; 27:43–52.
8. Elias CB, Carpentier E, Durocher Y, Bisson L, Wagner R, Kamen AA. Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK293 and *Trichoplusia ni* insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. *Biotechnol Prog* 2003; 19:90–97.
9. Agathos SN. Insect cell culture. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Baltz RH, Davies JE, Demain AL (eds). Washington, DC. 2010; 212–22.
10. Ikononou L, Schneider Y-J, Agathos SN. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 62:1-20.
11. Drugmand JC, Schneider YJ, Agathos SN. Insect cells as factories for biomanufacturing. *Biotechnol Adv* 2012; 30: 1140-1157.
12. Palomares LA, Ramírez OT. El Sistema de Células de Insecto-Baculovirus: una alternativa poderosa para la producción de pseudopartículas virales y otras proteínas recombinantes. *BioTecnología* 2001; 6(2,3): 16-29.
13. Altamirano C, Berrios J, Vergara M, Becerra S. Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. *Electronic Journal of Biotechnology* 2013; 16(3):1-14.
14. Instituto de Biología UNAM. Sitio web oficial <http://www.ibt.unam.mx/>, visto el 10 de Julio de 2016.
15. Palomares LA, Ramírez OT. Líneas de investigación. http://www.ibt.unam.mx/server/PRG.base?tipo:doc,dir:PRG.lineas,par:laura,tit:_Dra._Laura_Alicia_Palomares_Aguilera, visto el 10 de Julio de 2016.

16. Palomares LA, Kuri BF, Ramírez OT. Industrial Recombinant Protein Production. *Biotechnology* 2009; 5: 203-245.
17. Recombinant Therapeutic Antibodies & Proteins Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast 2015 – 2023. Transparency Market Research. Albany NY.
18. VISIONGAIN. Biosimilars and Follow-On Biologics: Global Market Outlook 2010-2022. 2012; 213 p.
19. Aggarwal SR. What's fueling the biotech engine-2012 to 2013. *Nature Biotechnology* 2014; 2(1):32-39.
20. Global Markets and Manufacturing Technologies for Protein Drugs. BCC Research LLC 2016, Massachusetts.
21. Palomares LA, Realpe M, Ramírez OT. An Overview of Cell Culture Engineering for the Insect Cell-Baculovirus Expression Vector System (BEVS). *Animal Cell Culture* 2014; 9:501-519.
22. Palomares LA. Aplicaciones de la Bioingeniería en la producción de proteínas recombinantes por células de insecto. *BioTecnología* 2004; 9(2):22-31.
23. Grace TDC. Establishment of four strains of cells from insect tissue grown in vitro. *Nature* 1962; 195:788–789.
24. Summers MD, Smith GE. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin. Texas Agricultural Experiment Station; College Station, TX. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures 1987.
25. Granados RR. Trichoplusia ni cell line which supports replication of baculoviruses. US Patent 5300435A.1991.
26. Cox MMJ. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine* 2012; 30: 1759-1766.
27. Rhiel M, Mitchell-Logean CM, Murhammer DW. Comparison of Trichoplusia ni BTI-Tn-5B1-4 (High Five) and Spodoptera frugiperda Sf-9 insect cell metabolism in suspension cultures. *Biotechnol Bioeng* 1997; 55: 696-706.
28. Monteiro F, Bernal V, Saelens X, Lozano AB, Bernal C, Sevilla A, Carrondo MJT, Alves PM. Metabolic profiling of insect cell lines: Unveiling cell line determinants behind system's productivity. *Biotechnol Bioeng* 2014; 111: 816-828.
29. Benslimane C, Elias CB, Hawari J, Kamen A. Insights into the central metabolism of Spodoptera frugiperda (Sf-9) and Trichoplusia ni BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5) insect cells by radiolabeling studies. *Biotechnol Prog* 2005; 21: 78-86.
30. Krammer F, Schinko T, Palmberger D, Tauer C, Messner P, Grabherr R. Trichoplusia ni (High Five™) are highly efficient for the production of influenza A virus-like particles: a comparison of two insect cell lines as production platforms for influenza vaccines. *Mil Biotechnol* 2010; 45:226-234.
31. Bédard C, Tom R, Kamen A. Growth, nutrient consumption and endproduct accumulation in Sf-9 and BTI-EAA insect cell cultures: insights into growth limitation and metabolism. *Biotechnol Prog* 1993; 9: 615-624.
32. Palomares LA, Ramírez OT. The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. *Cytotechnol* 1996; 22: 225-237.
33. Drews m, Doverskog M, Ohman L, Chapman BE, Jacobson U, Kuchel PW, Haggstrom L. Pathways of glutamine metabolism in Spodoptera frugiperda (Sf9) insect cells: Evidence for the presence of the nitrogen assimilation system and a metabolic switch by ¹H/¹⁵N NMR. *J Biotechnol* 2000; 78: 23-37.
34. Reuveny S, Kemp CW, Eppstein L, Shiloach J. Carbohydrate metabolism in insect cell cultures during cell growth and recombinant protein production. *Ann NY Acad Sci* 1992; 665:230–7.
35. Sugiura T, Amann E. Properties of two insect cell lines useful for the baculovirus expression system in serum-free culture. *Biotechnol Bioeng* 1996; 51:494–9.
36. Wang M-Y, Kwong S, Bentley WE. Effects of oxygen/glucose/glutamine feeding on insect cell baculovirus protein expression: a study on epoxide hydrolase production. *Biotechnol Prog* 1993a; 9:355–61.
37. Bernal V, Carinhas N, Yokomizo Y, Carrondo MJT, Alves PM. Cell density effect in the baculovirus-insect cells system: a quantitative analysis of energetic metabolism. *Biotechnol Bioeng* 2009; 104:162–80.

38. Mendonça RZ, Palomares LA, Ramirez OT. An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. *J Biotechnol* 1999; 72:61–75.
39. Öhman L, Ljunggren J, Häggström L. Induction of a metabolic switch in insect cells by substrate-limited fed batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995; 43:1006–13.
40. Palomares LA, López S, Ramírez OT. Utilization of oxygen uptake rate to assess the role of glucose and glutamine in the metabolism of insect cell cultures. *Biochemical Eng J* 2004; 19 (1) 87–93.
41. Tremblay G, Mejia N, MacKenzie R. The NADP-dependent methylenetetrahydrofolate synthetase is not expressed in *Spodoptera frugiperda* cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 8281-8285.
42. Drews M, Paalme T, Vilu R. The growth and nutrient utilization of the insect cell line *Spodoptera frugiperda* Sf9 in batch and continuous culture. *J Biotechnol* 1995; 40:187–98.
43. Drugmand J-C. Study of the metabolism and physiology of High-Five insect cells for the development of processes for the production of recombinant protein. [Ph.D.Thesis]. Louvain-la-Neuve, Belgium: Université Catholique de Louvain; 2007.
44. Ferrance JP, Goel A, Ataa MM. Utilization of glucose and amino acids in insect cells cultures: quantifying the metabolic flows within the primary pathways and medium development. *Biotechnol Bioeng* 1993; 42: 697–707.
45. Wang M-Y, Wester K, Bentley WE. Glutamine determination in insect cell culture media. *Biotechnol Tech* 1993b; 7:841–6.
46. Radford KM, Reid S, Greenfield PF. Substrate limitation in the baculovirus expression vector system. *Biotechnol Bioeng* 1997; 56:32–44.
47. Mitsuhashi J. Nutritional requirements of insect cells in vitro. In: Mitsuhashi J, editor. *Invertebrate Cell System Applications*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1989; 3-20.
48. Luukkonen A, Brummer-Korvenkotio M, Renkonen O. Lipids of cultured mosquito cells (*Aedes albopictus*). Comparison with cultured mammalian fibroblasts (BHK 21 cells). *Biochim Biophys Acta* 1973; 326:256–61.
49. Goodwin RH. Replacement of vertebrate serum with lipids and other factors in the culture of invertebrate cells, tissues, parasites and pathogens. *In Vitro Cell Dev Biol-Anim* 1991; 27:470–8.
50. Schneider M, Marison IW, von Stockar U. The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J Biotechnol* 1996; 46:161–95.
51. Martinelle K, Westlund A, Häggström L. Ammonium ion transport — a cause of cell death. *Cytotechnology* 1996; 22:251–4.
52. Bhatia R, Jesionowski G, Ferrance J, Ataa MM. Insect cell physiology. *Cytotechnology* 1997; 24:1–9.
53. Papa S, Francavilla A, Paradies G, Meduri B: The transport of pyruvate in rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 1971; 12:285-288.
54. Halestrap AP, Denton RM: Specific inhibition of pyruvate transport in rat liver mitochondria and human erythrocytes by alpha-cyano-4-hydroxycinnamate. *Biochem J* 1974; 138:313-316.
55. Halestrap AP: The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochem J* 1975; 148:85-96.
56. Bricker DK, Taylor EB, Schell JC, Orsak T, Boutron A, Chen YC, Cox JE, Cardon CM, Van Vranken JG, Dephoure N et al.: A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila*, and humans. *Science* 2012; 337:96-100.
57. Herzig S, Raemy E, Montessuit S, Veuthey JL, Zamboni N, Westermann B, Kunji ER, Martinou JC: Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science* 2012; 337:93-96.
58. Li CL, Wang M, Ma XY, Zhang W: NRGA1, a putative mitochondrial pyruvate carrier, mediates ABA regulation of guard cell ion channels and drought stress responses in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 2014.
59. Vanderperre B, Bender T, Kunji ER, Martinou JC: Mitochondrial pyruvate import and its effects on homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology* 2015; 33:35-41.
60. Warburg O: On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956; 124:269-270.

61. Schell JC, Olson KA, Jiang L, Hawkins AJ, Van Vranken JG, Xie J: A role for the Mitochondrial Pyruvate Carrier as a Repressor of the Warburg Effect and Colon Cancer Cell Growth. *Mol Cell* 2014; 56:400-413.
62. Vigueira PA, McCommis KS, Schweitzer GG, Remedi Ms, Chambers KT, Fu X, McDonald WG, Cole SL, Colca JR, Kletzien RF et al., Mitochondrial Pyruvate carrier 2 hypomorphism in mice leads to defects in stimulated insulin secretion. *Cell Rep* 2014; 7:2042-2053.

XIII. A N E X O S

13.1 Características del vector pFastBac Dual de Invitrogen.

Característica	Beneficio
Promotor de poliedrina (P _{PH})	Permite una elevada y eficiente expresión de la proteína recombinante de interés en células de insecto.
Sitio de clonación múltiple (P _{PH})	Clonación del gen de interés mediante el uso de enzimas de restricción.
Señal de poliadenilación SV40	Terminación eficiente de la transcripción y la poliadenilación del ARNm.
Tn7L y Tn7R	Permiten la transposición sitio específica del gen de interés dentro del genoma del baculovirus
Origen f1	Permite el rescate de ADN de cadena simple.
Gen de resistencia a ampicilina	Útil para la selección del plásmido en <i>E. coli</i>
Origen pUC	Replicación con alto número de copia y mantenimiento del plásmido en <i>E. coli</i> .
Gen de resistencia a gentamicina	Permite la selección del bácmido recombinante en las células de <i>E. coli</i> DH10Bac
Señal de poliadenilación de la timidina quinasa (tk) del virus del Herpes (HSV).	Permite la terminación eficiente de la transcripción y poliadenilación del ARNm.
Sitio de clonación múltiple (P _{p10})	Clonación del gen de interés mediante enzimas de restricción.
Promotor de p10 (P _{p10})	Permite un alto y eficiente nivel de expresión de la proteína recombinante en células de insecto.

13.2 Principales diferencias entre las células Sf-9 y High-Five.

Summary of differences between High-Five and Sf-9 cells.

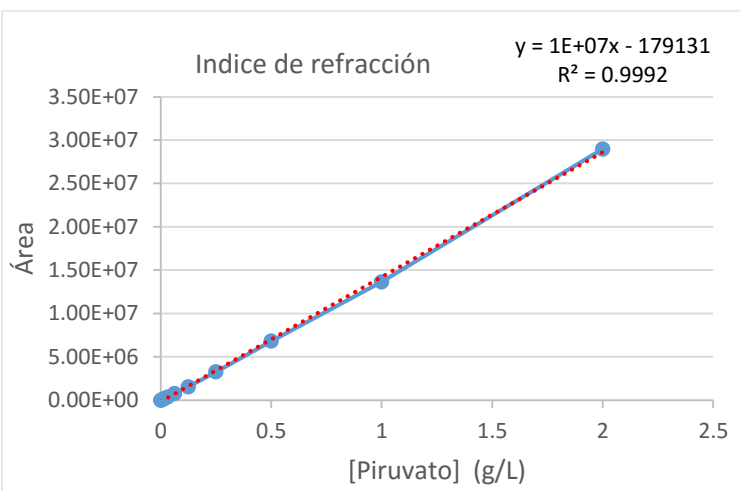
	Sf-9 cells	Both cell lines	High-Five cells	
Physiology – culture conditions				
Cell Size	13 µm		Bigger (15 µm)	
Reached cell density (10 ⁶ cells/ml) in batch		4–10		
Growth rate	0.025 h ⁻¹		Higher (0.030 h ⁻¹)	
Optimal growth temperature		27 °C		
Optimal protein production temperature		25–29 °C		
Optimal pH	6.2–6.4		6.2–6.3	
Metabolism				
Growth	Glucose consumption	+++	Higher (++++)	
	Glutamine consumption			
	Asparagine consumption	+	++	Higher (++)
	Amino acid consumption	++		Higher (++++)
	Oxygen consumption		++++	
	Lactate production	+		Higher (++)
	Ammonia production	++		Higher (++++)
Infection	Alanine production			
	Glucose consumption	++	++	Higher (++++)
	Glutamine consumption	+		Higher (++++)
	Asparagine consumption	–		Higher (++)
	Amino acids consumption	+		Higher (++++)
	Oxygen consumption	+++++		Higher (+++++)
	Lactate production	–		Higher (++)
Sensitivity	Ammonia production	+	Higher (++)	
	Alanine production			++
	Thermal shocks	Less sensitive		More sensitive
	Changes of pH		Weak sensitivity	
	Osmotic shocks	More sensitive		Less sensitive
	Shear stresses	More sensitive		Less sensitive
	Changes of DO		Moderate sensitivity	
Ammonia by-product	More sensitive		Less sensitive	
Lactate by-product	More sensitive		Less sensitive	
Production				
Yield of r-protein	Good		Best (up to 10 times more)	
Yield of virus	Best		Good	
Post-translational modification		Complex glycosylation and sialylation		
Secretion of r-protein	Good		Best	
Industrialization				
Adapted to serum-free media		Yes		
Availability of adapted media	Best		Good	
Scaling-up possibilities	Good		Best	
Established knowledge on				
Cell line characterization		Good		
Metabolism of cells	Good		Moderate	
Culture conditions	Very good		Good	
Process development (fed-batch, perfusion, fixed-bed, etc.)	Good		Moderate	

–: Almost null, +: weak, ++: moderate, +++: high, ++++, higher, +++++: very high.

Imagen extraída de: Drugman et al., *Insect Cells as factories for biomanufacturing* (2012). Ref. 11

13.3 Curva estándar de Piruvato usando el Detector de Índice de Refracción Diferencial 410 de Waters.

[Piruvato] g/L	Área	TR (min)
2	28974649	12.353
1	13648926	11.73
0.5	6811757	11.335
0.25	3267496	11.274
0.125	1552760	11.247
0.062	778264	11.232
0.03	367536	11.223
0.015	165690	1.222
0.007	79233	11.213
0	0	11.629



13.3.1 Curva estándar de Piruvato usando el Detector de arreglo de fotodiodos (UV) (Waters 2487, Dual λ Absorbance Detector).

[Piruvato] g/L	Área	TR (min)
2	79189710	11.706
1	38988123	11.12
0.5	19577281	10.719
0.25	9748036	10.641
0.125	4879489	10.599
0.062	2411661	10.58
0.03	1200896	10.568
0.015	585797	10.561
0.007	305130	10.564
0	0	0

