

INTRODUCCIÓN

1. Visión general de la farmacología de los interferones

Los interferones (IFNs) son un grupo de citoquinas que desencadenan una amplia variedad de respuestas celulares. En general, se definen por su capacidad de conferir resistencia a las infecciones virales. Sin embargo, se han reportado muchas otras funciones biológicas, como la inhibición de la proliferación celular, la inducción de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y otras actividades inmunomoduladoras. Debido a estas propiedades, los IFNs son utilizados como agentes terapéuticos en el tratamiento de infecciones virales y un gran número de patologías tumorales y enfermedades donde el sistema inmunitario se encuentra comprometido (Gutterman, 1994; Revel, 2003; Lutton y col., 2004). El empleo de IFN para uso clínico ha suscitado un gran interés para ser producido como proteína recombinante en diferentes sistemas.

1.1. Clasificación de los interferones

Según sus características y la similitud de sus secuencias de nucleótidos los IFNs se clasifican en tres grupos principales: IFN alfa (IFN- α), IFN beta (IFN- β) e IFN gama (IFN- γ) (Tabla I). A estos deben añadirse los IFN omega (IFN- ω) e IFN tau (IFN- τ). Los IFN- α e IFN- ω (antiguamente denominado "tipo leucocitario"), IFN- β ("tipo fibroblástico"), e IFN- τ comparten similitudes estructurales y constituyen el tipo I, ya que se unen al mismo receptor (receptor de tipo I). El IFN- γ es estructuralmente distinto a los demás y constituye por sí solo el tipo II ("tipo inmune"), que interacciona con el receptor de tipo II (Sen y Lengyel, 1992; De Maeyer y De Maeyer-Guignard, 1994).

En el hombre hay unos 20 genes de IFN- α , unos 6 de IFN- ω y sólo 1 de IFN- β , careciendo todos ellos de intrones y formando una superfamilia de genes agrupados en el brazo corto del cromosoma 9. La secuencia de aminoácidos del IFN- β presenta un 30% de homología con la de los IFN- α y la secuencia de nucleótidos un 45%. Este grado de homología hace pensar que los genes del IFN- β y del IFN- α provienen de un gen ancestral común del que se generaron mediante duplicación génica. El gen del IFN- β se habría separado del gen del IFN- α hace unos 500 millones de años, mientras que la diversificación del IFN- α habría ocurrido mucho más recientemente.

El IFN- γ es codificado por un solo gen con 3 intrones, localizado en el brazo largo del cromosoma 12.

Los IFN- τ comprenden un grupo de IFNs descubiertos recientemente en hembras de rumiantes y son producidos por el trofoectodermo (el primer epitelio del

huevo) en ausencia de un estímulo viral conocido. Su principal función es la de unirse a receptores específicos del endometrio para mantener un ambiente apropiado para el embrión (Sen y Lengyel, 1992; De Maeyer y De Maeyer-Guignard, 1994).

Tabla I. Características de los principales interferones.

| Característica | IFN- α (leucocitario, tipo I) | IFN- β 1a (fibroblástico, tipo I) | IFN- γ (inmune, tipo II) |
|--------------------------|---|--|-------------------------------------|
| Origen | Leucocitos y células linfoblastoides | Fibroblastos | Linfocitos, células NK y macrófagos |
| Número de genes | 20 | 1 | 1 |
| Localización cromosómica | Cromosoma 9 | Cromosoma 9 | Cromosoma 12 |
| Intrones | 0 | 0 | 3 |
| Número de aminoácidos | 165 o 166 (monómero) | 166 (monómero) | 146 (dímero) |
| N-Glicosilación | No | Sí | Sí |
| Peso molecular | 17,5 - 23 kDa | 23 kDa | 20 - 26 kDa |
| Estabilidad en ácido | Sí | Sí | No |

1.2. Producción de interferón

Los principales productores de IFN- α son los linfocitos B, las células *natural killer* (NK) y los macrófagos. Los principales productores de IFN- β 1a son los fibroblastos, las células epiteliales y los macrófagos. Las únicas células conocidas productoras de IFN- γ son los linfocitos T, los macrófagos y las células NK.

1.3. Inductores de la síntesis de interferón

Diversos agentes pueden inducir la síntesis y secreción de IFNs. Los virus son los más potentes inductores de la expresión de los genes de IFNs. El estímulo principal para su producción parece ser la formación de ácido ribonucleico (ARN) viral de doble cadena durante la replicación del virus dentro de la célula. Por eso los virus constituidos por ácido desoxirribonucleico (ADN), por regla general, son inductores menos potentes de la síntesis de IFNs que los virus ARN. Parece ser que otras moléculas generadas durante la replicación viral también pueden inducir la transcripción de los genes de IFNs.

Las infecciones por bacterias (especialmente aquellas que se replican dentro de las células), micoplasmas y protozoos, y ciertas citoquinas y factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factores estimuladores de colonias (CSF-1), interleuquinas 1 y 2 (IL-1, IL-2) y el factor de necrosis tumoral (TNF) también pueden inducir síntesis de IFNs. En ocasiones, incluso el IFN- β 1 puede inducir la producción de IFN- γ (Sen y Lengyel, 1992; De Maeyer y De Maeyer-Guignard, 1994; Piglas y col., 1996).

1.4. Estructura del hIFN- β 1a

Por cristalografía con rayos X se han obtenido datos de la estructura del hIFN- β 1. Sus 166 aminoácidos se encuentran distribuidos en cinco α hélices (A-E). La hélice A corre paralela a la hélice B, y ambas son antiparalelas a las hélices C y E; la hélice D forma parte de un *loop* largo que conecta las hélices C y E. Otro *loop* largo conecta las hélices A y B, pudiendo subdividirlo estructuralmente en tres regiones: AB1, AB2 y AB3 (Fig. 1).

El hIFN- β 1a posee 3 cisteínas. De ellas, las presentes en la posición 31, del *loop* AB, y en la posición 141, del *loop* DE, forman un puente disulfuro, quedando libre la de la posición 17.

Además, en el final de la hélice C, posee un sitio potencial para la glicosilación en la asparagina que se encuentra en la posición 80 (Piglas y col., 1996; Karpusas y col., 1998).

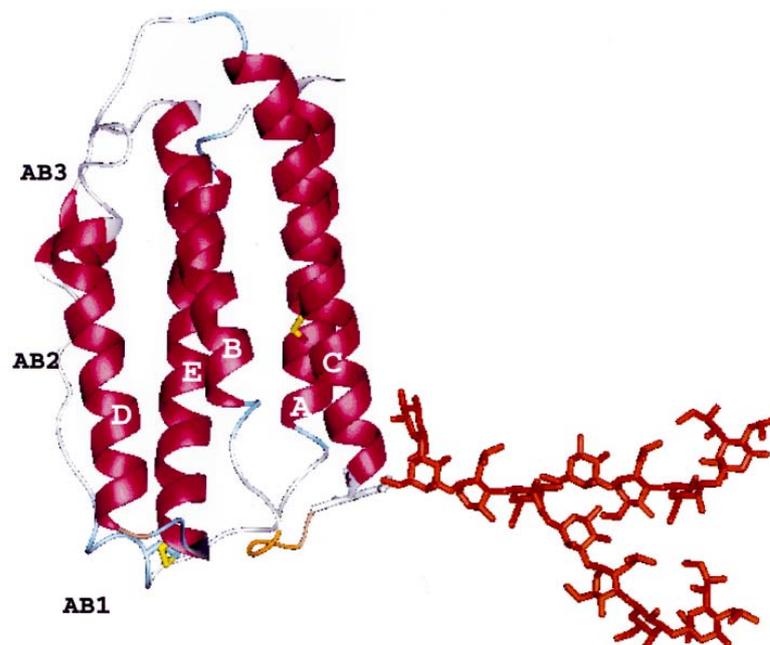


Fig 1. Estructura del hIFN- β 1a.

Representación en cintas de la cadena polipeptídica. Las hélices aparecen en color fucsia y los hidratos de carbono en color rojo. Los tres residuos de cisteína aparecen en color amarillo. La figura fue preparada con el programa QUANTA (Molecular Simulations, Inc., Burlington, MA, EE.UU.) (Karpusas y col., 1998).

1.5. Mecanismos de acción

1.5.1. Receptores de interferón

Todos los interferones de tipo I llevan a cabo sus funciones biológicas a través de la unión a un mismo receptor de la superficie celular como primer paso en la activación de diferentes caminos de transducción de señales. Este receptor está constituido por dos proteínas transmembrana denominadas ifnar1 e ifnar2, las cuales

se asocian luego de la unión de la molécula de IFN. Se ha demostrado que la subunidad ifnar2 es la principal responsable de la interacción, con una baja constante de disociación, mientras que la ifnar1 posee poca capacidad de unión intrínseca, pero es requerida para formar un complejo de alta afinidad. Una vez formado el complejo IFN-receptor, se produce una autofosforilación de sus subunidades y la subsecuente activación de las proteínas JAK (*Janus protein tyrosine kinases*) y STAT (*signal transducers and activators of transcription*), formando finalmente un complejo que culmina en la activación de la transcripción de genes estimulados por IFNs (ISGs).

El complejo receptor-IFN- α/β está constituido por dos proteínas transmembrana y requiere la intervención de dos proteínas citoplasmáticas con actividad tirosina-quinasa (TYK 2 y JAK 1) para transmitir la señal.

Aunque la interacción de los IFN- α y β se realice con el mismo receptor, las respuestas biológicas producidas son diferentes. Se ha propuesto que esto se debe a una interacción diferencial de cada citoquina con el receptor que conlleva a señalizaciones alternativas.

El IFN- γ se une a un receptor diferente (receptor de tipo II), que consta de por lo menos dos subunidades transmembrana y requiere la intervención de dos tirosina-quinasa para funcionar (JAK 1 y JAK 2) (Sen y Lengyel, 1992; De Maeyer y De Maeyer-Guignard, 1994; Piglas y col., 1996).

1.5.2. Transducción de la señal

Como sucede con la mayoría de las hormonas y factores de crecimiento, después de la unión al receptor, los complejos receptor-IFN se agrupan rápidamente en zonas determinadas formando pequeñas depresiones en la superficie celular, para después internarse en el citoplasma mediante endocitosis. Una vez allí, se induce la activación de enzimas ligadas al receptor (TYK 2 y JAK 1) que fosforilan residuos tirosina de las proteínas denominadas STAT 1 y 2. El complejo STAT tras la fosforilación, interacciona con una proteína de unión al ADN, de peso molecular 48 kDa (p48), también conocida como IRF9, formando el complejo ISGF3 (ISG *factor 3*), que en el núcleo celular actúa como un factor de transcripción activo. Dicho complejo se une en el núcleo a las regiones promotoras ISRE (*IFN-stimulated response element*) de distintos genes, induciendo la transcripción de ISGs a ARN mensajero (ARNm) para la síntesis de proteínas mediante las cuales los IFNs ejercen su efecto biológico (Fig. 2) (Sen y Lengyel, 1992; De Maeyer y De Maeyer-Guignard, 1994; Piglas y col., 1996; de Veer y col., 2001; Bekisz y col., 2004).

1.6. Efectos biológicos de los interferones

Los IFNs poseen efectos antivirales, antiproliferativos e inmunomoduladores. Dichos efectos están determinados por la acción de diversas proteínas sintetizadas en las células una vez que los IFNs han interactuado con sus receptores, tal y como se ha descrito en el apartado anterior, estimulando la síntesis de proteínas tales como

serina/treonina quinasa (PKR), 2'-5' oligoadenilato sintetasa (OAS), de resistencia a myxovirus (Mx), adenosín deaminasa ARN específica (ADAR), factores reguladores de IFN (IRFs) y del MHC (Fig. 2).

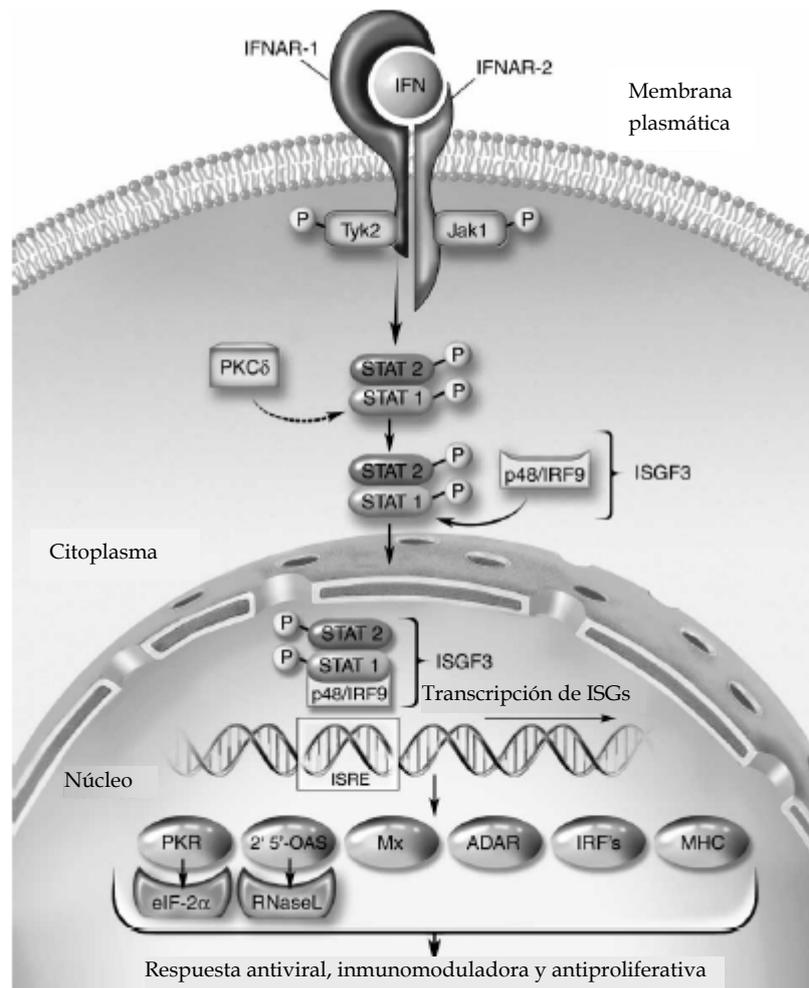


Fig 2. Mecanismo de transducción de la señal del IFN- α/β .

La unión de los IFNs a las dos subunidades del receptor (ifnar1/ifnar2) provoca su agregación, la cual lleva a la activación y fosforilación de TYK2 y JAK1. Éstas, entonces, fosforilan a STAT1 y STAT2. La proteína de unión al ADN p48 (IRF-9) forma un complejo con STAT1 y STAT2 que se mueve al núcleo, donde estimula la transcripción de genes relacionados con ISRE. Alguno de los IFN Tipo I median ISGs que contribuyen a la respuesta celular antiviral, mediante la producción de proteínas tales como PKR, OAS, Mx, ADAR, IRFs y MHC (Bekisz y col., 2004).

1.6.1. Efectos antivirales

Los IFNs inhiben la replicación viral y además protegen de muchos otros agentes infecciosos no víricos tales como bacterias, rickettsias, parásitos y hongos. El efecto antiviral de los IFNs está documentado por observaciones experimentales y clínicas: los IFNs se producen precozmente y en grandes cantidades en las

enfermedades virales, y participan en la recuperación de las mismas, por lo que la administración exógena inhibe el desarrollo de dichas enfermedades.

Las acciones antivirales de los IFNs son indirectas. Los IFNs inducen en las células infectadas o sensibles a los virus la producción de más de dos docenas de proteínas efectoras. Estas proteínas inhiben la transcripción, la traducción, el procesamiento proteico, la maduración del virus y la liberación de los viriones.

Un ejemplo de los mecanismos menos conocidos por los que los IFNs ejercen su efecto antiviral, incluye la inducción de una glucosiltransferasa, que puede glicosilar las proteínas virales e impedir su empaquetamiento, liberación y virulencia (Sen y Lengyel, 1992; De Maeyer y De Maeyer-Guignard, 1994; Piglas y col., 1996; Goodbourn y col., 2000).

1.6.2. Efectos antiproliferativos

Los IFNs se producen con frecuencia en respuesta a tumores, probablemente a través del reconocimiento por parte de los leucocitos de componentes extraños en las células tumorales. El efecto antiproliferativo de los IFNs se produce a través de diversos mecanismos (Sen y Lengyel, 1992; Piglas y col., 1996):

- Efecto antiproliferativo directo sobre las células tumorales.
- Activación de células efectoras citotóxicas del sistema inmune del huésped.
- Modulación de la producción de anticuerpos.
- Efecto antagónico sobre la expresión de diversos protooncogenes. Los IFNs, particularmente el IFN- α y el IFN- β 1, retrasan el crecimiento y la proliferación tanto de células tumorales como de células normales, mediante la prolongación del ciclo celular. Existen, no obstante, diferencias sustanciales entre las células normales y las células tumorales en cuanto a su sensibilidad a las acciones antiproliferativas; algunas células son extremadamente sensibles y otras son resistentes a los efectos antiproliferativos.
- Depleción de metabolitos esenciales. Los IFNs inhiben la inducción de la ornitina decarboxilasa, reduciendo la biosíntesis de putrescina y otras poliaminas esenciales.
- Inducción de la OAS, que cataliza la oligomerización de adenosín trifosfato (ATP) en 2'-5'oligoadenilatos, los cuales sirven como activadores de una endorribonucleasa latente, conocida como RNasa L.
- Inhibición de la actividad mitógena de diversos factores de crecimiento: CSF-1, PDGF, EGF (factor de crecimiento epidérmico), IL-2 e IL-4.

1.6.3. Efecto inmunomodulador

El papel fisiológico de los IFNs no reside en la modulación de la inmunidad específica mediada por linfocitos, sino que se asocia con un sistema más primitivo de defensa inespecífico, en el que participan granulocitos, macrófagos y células NK. La acción del IFN- α y del IFN- β 1 sobre los mecanismos de defensa inespecíficos se basa

sobre todo en la estimulación de la actividad de los macrófagos y las células NK. Los IFNs (sobre todo el IFN- γ) estimulan la síntesis de las citoquinas IL-1, IL-6 y TNF. Estos mecanismos favorecen la fagocitosis de inmunocomplejos y la capacidad lítica de microorganismos mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. La administración de IFN de tipo I o de sus inductores, a determinadas dosis óptimas, ejerce un efecto estimulador de la actividad citotóxica natural mediada por las células NK. Este aumento de actividad puede estar relacionado con un incremento en la expresión de moléculas de adhesión y de la fluidez de la membrana, facilitando de este modo la unión de las células citotóxicas a las células diana. No obstante, concentraciones superiores de IFN- β 1 causan el efecto contrario, inhibiendo la actividad NK.

Uno de los efectos inmunológicos mejor conocidos de los IFNs es la modulación de la expresión de los antígenos del MHC. Los IFNs α , β y γ son capaces de estimular la expresión de antígenos de clase I en la superficie celular, mientras que la expresión de antígenos de clase II es estimulada fundamentalmente por el IFN- γ .

No obstante, los IFNs actúan también sobre los mecanismos inmunológicos específicos y es precisamente la posibilidad de utilizar su efecto sobre los linfocitos lo que ha abierto nuevas perspectivas en el tratamiento de diversas enfermedades de supuesta o probada etiología autoinmune. En general, su efecto es ambivalente, dado que pueden tanto aumentar como disminuir la inmunidad celular o humoral, dependiendo de la dosis, momento de su administración y genotipo del receptor (Sen y Lengyel, 1992; De Maeyer y De Maeyer-Guignard, 1994).

1.7. Efecto del rhIFN- β 1 sobre la inmunidad en la esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad degenerativa que provoca la desmielinización de las terminaciones nerviosas y conduce a un alto grado de incapacidad. Inicialmente la mayoría de los pacientes experimentan períodos de recaída y remisión de las crisis. Durante aproximadamente 10 años pueden producirse una o varias etapas de exacerbación de los síntomas seguidos de períodos con recuperación parcial o total, en que el estado del paciente permanece estable. Tras esta primera etapa, la mitad de los pacientes comienza a experimentar una progresión gradual de la incapacidad, con o sin recaídas. A esta fase se la denomina progresiva secundaria. Una proporción mucho menor de los pacientes sufre un deterioro progresivo desde el inicio de la enfermedad, a lo que se le denomina curso clínico progresivo, pudiendo o no presentar recaídas.

La etiopatología de la EM se asocia tanto a alteraciones inmunológicas como a infecciones virales, factores genéticos o a una asociación de estos.

La enfermedad se caracteriza por elevar los niveles de citoquinas proinflamatorias producidas por las células Th1 (TNF- α , IL-2 e IFN- γ) y disminuir los niveles de citoquinas antiinflamatorias producidas por las células Th2 (IL-4 e IL-10) (Lutton y col., 2004; Segal y col., 2004).

Hasta hace muy pocos años, el tratamiento de la EM se basaba únicamente en fármacos que aceleraban la recuperación tras una exacerbación aguda, como son los corticoides o los agentes inmunosupresores más potentes, en los casos en los que los pacientes no responden a los corticoides. No obstante, ninguno de ellos altera la evolución natural de la enfermedad.

El IFN- β 1 es el único fármaco que se ha demostrado capaz de modificar el curso natural de la EM, disminuyendo la tasa de exacerbaciones y su severidad. El mismo actuaría disminuyendo los niveles de citoquinas proinflamatorias y aumentando los de las antiinflamatorias (Sega y col., 2004).

Hay dos formas comercialmente disponibles de IFN- β 1 recombinante humano (rhIFN- β 1): el rhIFN- β 1a glicosilado, expresado en células eucariotas de mamíferos [específicamente en células CHO (células de ovario de hámster chino)], estructuralmente indistinguible del hIFN- β 1; y el rhIFN- β 1b producido en *E. coli* (*Escherichia coli*) como una proteína no glicosilada, con un aminoácido menos, con un cambio en la posición 17 de cisteína por serina y con una actividad antiviral específica aproximadamente 10 veces menor que la de su contraparte glicosilada. A partir del estudio de ambas formas se ha sugerido que la porción glicosídica de la molécula mejora su estabilidad, solubilidad y actividad biológica (Karpusas y col., 1998). Además, el rhIFN- β 1a, en su estado monomérico y glicosilado, resulta poco inmunogénico y posee una alta actividad específica, por lo que puede suministrarse a los pacientes en bajas dosis y frecuencia, lo que implica una sustancial ventaja con respecto a la molécula producida en *E. coli* (Colby y col., 1984; Runkel y col., 1998; Williams y Witt, 1998; Brickelmaier y col., 1999, Kivisakk y col., 2000).

El rhIFN- β 1 reduce la tasa de exacerbaciones y disminuye las lesiones cerebrales nuevas, muy probablemente a través de su efecto regulador sobre el sistema inmunológico.

Se desconocen los mecanismos exactos por los que el rhIFN- β 1 ejerce su efecto beneficioso en la EM, en parte debido a que tampoco se conocen completamente la fisiopatología e inmunología de la enfermedad (Leppert y col., 1996; Yong y col., 1998). No obstante, se sabe que el rhIFN- β 1 produce los siguientes efectos:

- Aumento de la función supresora de los linfocitos CD8+ (deficitaria en los pacientes con EM).
- Disminución de la secreción de IFN- γ , TNF- α y TNF- β (linfotóxina) por parte de los macrófagos activados y los linfocitos Th1 (lo cual reduce los efectos proinflamatorios inducidos por estas citoquinas).
- Aumento de la secreción de IL-4 e IL-10.

2. Desarrollo de un proceso biotecnológico

La biotecnología moderna aplicada al desarrollo de productos de uso terapéutico fue fundada cuando por primera vez apareció en el mercado farmacéutico la insulina humana recombinante en EE.UU. hacia 1982.

Otro paso esencial en el desarrollo de la biotecnología moderna lo constituyó la aparición del denominado desarrollo de procesos, mediante el cual se trata de elucidar las mejores condiciones de cultivo para producir la proteína en la mayor cantidad posible y de la manera más eficiente. Posteriormente, el mejor proceso es escalado para producir cantidades de la proteína necesarias para ensayos pre-clínicos, clínicos y para la producción. El desarrollo de un proceso también incluye el desarrollo de medios de cultivo, *buffers*, reactivos y la elección correcta de herramientas tales como biorreactores y columnas cromatográficas, para que el crecimiento de las células recombinantes, el aislamiento y la purificación de la proteína recombinante sean óptimos.

Debido a que es imposible predecir exactamente si un proceso en particular puede ajustarse o no a un protocolo existente, en general, para cada nuevo producto se debe realizar el desarrollo del proceso en particular, a pesar del uso de líneas celulares estándares (Wagner, 2001).

El proceso de producción de proteínas recombinantes mediante el empleo de técnicas de la biotecnología moderna está dividido en dos etapas: el *upstream*, durante el cual las células manipuladas genéticamente producen la proteína de interés y el *downstream*, durante el cual la proteína producida es aislada y purificada. Si bien estas etapas están íntimamente relacionadas si se tiene en cuenta lo que implica un análisis integrado del proceso de producción, de aquí en adelante sólo se describirán en detalle los pasos involucrados en el *upstream* (Fig. 3), debido a que gran parte del trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral estuvo enmarcado en esta etapa.

El *upstream* de un proceso de producción de una proteína recombinante consiste en dos etapas fundamentales. Una primera etapa que incluye la selección de un sistema celular de expresión adecuado, que involucra, además, la preparación y la transfección del material genético que codifica la proteína de interés. Y una segunda etapa de cultivo celular, que implica la puesta a punto de diferentes tecnologías de cultivo, optimizando la producción y el monitoreo de las mismas.

Para desarrollar un proceso biotecnológico desde la escala de laboratorio a la de producción, se deben tener en cuenta varias consideraciones. Antes de comenzar con el desarrollo del proceso, se debe tener en claro la cantidad, calidad y posterior aplicación del producto requerido.

Para ello, primero se debe realizar una cuidadosa selección del **gen** a expresar. En segundo término, se debe optar por los **vectores** donde clonar el gen de interés. Dos criterios han de tenerse en cuenta al respecto: el método a emplear para la introducción del gen en las células de mamíferos y los elementos regulatorios necesarios para una eficiente transcripción del ARNm y posterior síntesis de la proteína (Kaufman, 1990).

En tercer término, considerando las modificaciones post-transcripcionales y/o post-traduccionales del producto a expresar, se debe seleccionar la **línea celular** a emplear como huésped debido a que esto puede condicionar la antigenicidad, la solubilidad, la actividad biológica o la vida media *in vivo* de la proteína recombinante (Kratje, 1991).

Por otro lado, no debe quedar librada al azar la elección del método empleado para la **transfección**. La estrategia a elegir dependerá del vector seleccionado, del tipo celular, de las características de crecimiento y del uso posterior que se le dará a la célula manipulada genéticamente, entre otros factores (Schlokot y col., 1997).

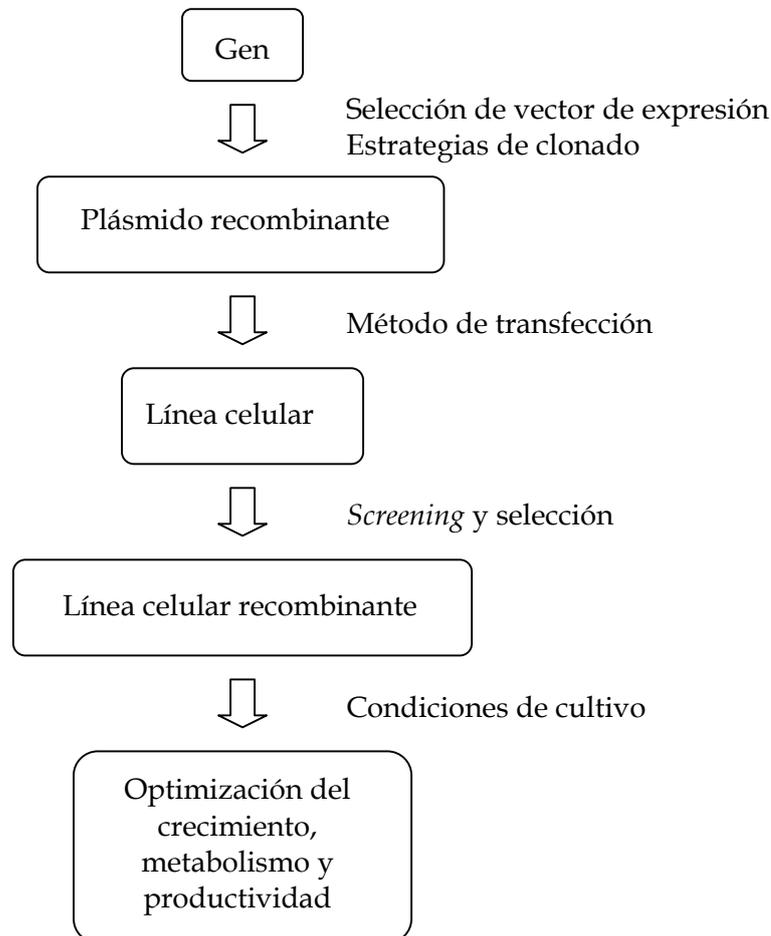


Fig.3. Esquema representativo del *upstream* de un proceso biotecnológico.

Si se desea obtener una línea celular recombinante que exprese la proteína de interés en forma estable, resulta imprescindible optimizar el **método de selección** de transfectantes. En general, los plásmidos empleados en transfecciones estables contienen, además del gen de la proteína a expresar, un gen que confiere una nueva resistencia a la célula en la cual es introducido. Adicionalmente, se debe disponer de **métodos de screening** y seguimiento que permitan evaluar la capacidad de expresión de la proteína recombinante por parte de una línea celular dada. Dichos métodos deben ser sensibles y específicos, a fin de poder detectar cuali y cuantitativamente la proteína expresada por diferentes clones productores, especialmente en estadios tempranos.

La estrategia para incrementar el **rendimiento de la proteína recombinante** producida en un sistema de cultivo de células animales, puede llevarse a cabo en dos

niveles: aumentando la productividad específica por célula y/o el rendimiento celular por unidad de volumen. Un incremento de la productividad específica por célula se puede lograr por manipulación genética mediante amplificación génica, como por ejemplo mediante el empleo del metotrexato (MTX), o mediante la adición de promotores/*enhancers* para aumentar la transcripción del gen (Weymouth y Barsoum, 1986). El rendimiento total por unidad de volumen se puede incrementar mediante un detallado conocimiento de las características físicoquímicas del medio de cultivo durante el crecimiento y mantenimiento celular.

3. Expresión de proteínas recombinantes

3.1. *E. coli*

E. coli tiene una rápida velocidad de crecimiento con altos niveles de expresión de proteínas recombinantes y, además, existe una profunda caracterización genética y fisiológica de esta bacteria. Sin embargo, existen desventajas importantes al usar este sistema, que incluyen altos niveles de endotoxinas, producción de proteínas recombinantes insolubles y plegadas incorrectamente, que se agregan en cuerpos de inclusión, requiriendo un gran esfuerzo para replegarlas, proteínas con metioninas N-terminal, y ausencia de modificaciones post-traduccionales que pueden ser requeridas para generar moléculas biológicamente activas. En consecuencia, los altos niveles de expresión alcanzados en dichos sistemas pueden no ser apropiados para la obtención de una variedad de moléculas de uso terapéutico (Etcheverry, 1996).

El uso de sistemas procariontes está usualmente restringido a la producción de proteínas que no están glicosiladas o que son farmacológicamente activas aún sin glicosilar (Schmidt, 2004).

3.2. Levaduras

Las levaduras como sistema de expresión han sido utilizadas para producir proteínas correctamente ensambladas y glicosiladas.

Como las bacterias, crecen rápidamente en medios simples. Sin embargo, los patrones de glicosilación son diferentes a los encontrados en organismos superiores; las levaduras no son capaces de adicionar oligosacáridos complejos y están limitadas al agregado de estructuras hiperglicosiladas potencialmente inmunogénicas, que pueden ser rápidamente removidas desde el suero, pudiendo interferir con la actividad biológica de la proteína. Por estas dificultades no resultan generalmente útiles para la expresión de proteínas recombinantes glicosiladas para uso terapéutico (Etcheverry, 1996; Schmidt, 2004).

3.3. Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son más organizados que las levaduras, y consecuentemente producirían modificaciones post-traduccionales más complejas y

similares a las de los mamíferos, pero se conoce muy poco acerca de estas modificaciones y del metabolismo de secreción.

Además, el ADN foráneo es rápidamente degradado y la velocidad de expresión de las proteínas recombinantes está restringida por el alto *turnover* del ARN y el incompleto plegamiento y secreción de proteínas influenciados por el patrón de glicosilación. Las proteínas que son incompleta o incorrectamente glicosiladas, son secretadas y degradadas.

Actualmente no son sistemas de expresión utilizados y para explotarlos como tales debería investigarse más acerca de su fisiología y metabolismo de glicosilación (Schmidt, 2004).

3.4. Células de insecto

Las células de insecto transformadas con vectores de baculovirus han alcanzado mucha popularidad. Son considerados sistemas más resistentes al estrés, más fáciles de manejar y un poco más productivos que las células de mamífero.

Se han encontrado algunas desventajas relacionadas con el ineficiente procesamiento, impedimentos en el plegamiento y la capacidad de secreción de las proteínas recombinantes, en casos de infección con baculovirus; alta actividad de proteasas, en parte codificadas por los baculovirus, que hace necesario utilizar inhibidores de proteasas durante el cultivo o crear vectores deficientes en ellas; bajos niveles de expresión de las proteínas recombinantes y desviaciones en las modificaciones post-traduccionales, que podrían hacer inmunogénicas a las proteínas producidas. Además, la ausencia de sialilación de las proteínas recombinantes obtenidas en células de insecto brinda moléculas que pueden perder su actividad biológica *in vivo* (Schmidt, 2004).

3.5. Células de mamífero

3.5.1. Ventajas

La decisión de usar células animales para la expresión de proteínas recombinantes está a menudo basada en la complejidad del producto a generar. Los cultivos de células de mamífero tienen la ventaja de efectuar los complejos eventos post-traduccionales como una propiedad inherente del sistema de procesamiento y secreción, involucrando la formación de puentes disulfuro, la glicosilación y un correcto plegamiento.

El proceso de secreción tiene la ventaja adicional de hacer que el producto se acumule en el medio de cultivo, por lo que la molécula de interés no se asocia con proteínas intracelulares, la proteólisis es limitada y el proceso de purificación es más simple.

La gran mayoría de las proteínas secretadas por las células de mamíferos son glicoproteínas. Las cadenas laterales de hidratos de carbono que ellas poseen

frecuentemente influyen sobre sus propiedades bioquímicas y biológicas, especialmente están relacionadas con la conformación, secreción, protección contra degradación proteolítica, desnaturalización térmica y, además, actividad específica, antigenicidad y tiempo de vida media *in vivo* (Gooche y Monica, 1990). Existen tres sitios posibles sobre la cadena polipeptídica reconocidos por las glicosiltransferasas y glicosidasas celulares para la síntesis de oligosacáridos: los residuos de asparagina, serina y treonina. Cuando la síntesis de oligosacáridos se inicia sobre los residuos de asparagina, se generan las N-glicoproteínas (unión a través del nitrógeno amídico), mientras que sobre los residuos de serina y treonina, se generan las O-glicoproteínas (unión a través del hidroxilo).

Por otro lado, tanto el tipo como el grado de glicosilación de una determinada glicoproteína sintetizada en células de mamíferos depende de varios factores (Savage, 1997):

- Célula huésped empleada.
- Condiciones de cultivo.
- Contenido de amonio intracelular.
- Cambios en la actividad de las glicosiltransferasas durante las fases del cultivo.
- Concentración de glucosa y glutamina.
- Presencia de glicosidasas, fundamentalmente sialidasas, en el sobrenadante de cultivo.
- pH fuera del rango 6,9 - 8,2.
- Concentración de CO₂ del cultivo.

Por estos motivos, numerosos desarrollos se han llevado a cabo utilizando el cultivo de células de mamífero como sistema de expresión de productos farmacéuticos (Etcheverry, 1996).

Sin embargo, el cultivo de estas células es complicado, costoso y usualmente se producen bajas concentraciones de proteínas.

3.5.2. Líneas celulares huésped

La mayoría de las células disponibles para la expresión de genes recombinantes son derivadas de líneas celulares inmortalizadas. Algunas de las líneas comúnmente usadas son las células COS [células de riñón de mono verde africano transformadas con el simian virus 40 (SV40)], las células CHO, las células BHK (células de riñón de hámster bebé), las células HEK-293 (células de riñón de embriones humanos transformadas), y las células NS0 (células de mieloma murino no secretor). Estas líneas celulares han sufrido un proceso de transformación, pudiendo propagarse *in vitro* en forma indefinida. Con esta propiedad, las células se dividen rápidamente, poseen bajos requerimientos nutricionales y generalmente son más resistentes que las células normales. La inmortalización permite un fácil manejo y consistencia entre experimentos.

Las células de mamíferos se pueden cultivar en forma adherente, sobre placas de Petri o frascos T, o en suspensión, empleando frascos *spinner* o biorreactores. Las

células que no se pueden adaptar al crecimiento en suspensión son denominadas dependientes de anclaje, y requieren una superficie cargada negativamente donde se adhieren para su crecimiento óptimo.

Las células COS-7 son utilizadas en forma muy efectiva como sistemas de expresión transiente, exhibiendo una limitación en cuanto a su uso para expresión estable. Estas células son dependientes de anclaje.

Los huéspedes más usados para expresión estable que pueden crecer en forma adherente o en suspensión, son las células CHO.K1 y BHK.21. Estas líneas celulares son las elegidas para las transfecciones estables debido a sus niveles de producción y a que pueden adaptarse al crecimiento en suspensión en medios con bajas cantidades o totalmente libres de suero fetal bovino (SFB) (Etcheverry, 1996).

Las células HEK-293 expresan en forma constitutiva el gen E1a de adenovirus. Se la considera una buena línea para utilizar con vectores que posean promotores eficientemente transactivados por la proteína E1a (Cockett y col., 1990; Swaminathan y Thimmapaya, 1996; Hauser, 1997; Soeth y col., 2002), ya que ésta aumenta la transcripción de promotores específicos tales como el promotor citomegalovirus (CMV), pero inhibe otros promotores virales como el SV40 (Cockett y col., 1990; Fussenegger y col., 1999). Se puede adaptar su crecimiento en forma adherente o en suspensión.

Las células NS0 son derivadas de un plasmacitoma inducido en ratón por inyección peritoneal de aceite mineral. Las células de este tumor fueron clonadas y seleccionadas hasta obtener una línea celular no secretora, por lo que no producen anticuerpos endógenos y son a menudo usadas como huésped para la producción de proteínas recombinantes, específicamente anticuerpos (Rossman y col., 1996; Barnes y col., 2001; Barnes y col., 2003). Estas células crecen en suspensión.

Pocas líneas celulares son aceptadas para la producción en gran escala de proteínas de uso farmacéutico. Este bajo número resulta no sólo de consideraciones racionales, sino del hecho de que las agencias de control deben aceptar una línea celular como segura, dando crédito de sus futuras aplicaciones basadas en los procesos que las involucren. Líneas celulares aceptadas son por ejemplo, CHO.K1 y BHK.21 (Hauser, 1997). Las células COS no son recomendables para la producción de proteínas para uso en salud humana debido a la posible contaminación con agentes adventicios, por su cercanía en la escala evolutiva.

4. Vectores de expresión para células eucariotas

La selección de un vector apropiado es tan importante como la elección de una correcta línea celular o las condiciones de cultivo en las cuales se llevará a cabo la transfección.

La mayoría de los vectores son plásmidos, híbridos con secuencias bacterianas y eucariotas o regiones virales. Algunas de estas secuencias se requieren para permitir la replicación del vector en bacterias, generalmente *E. coli*, y así propagar el ADN a ser

usado en posteriores transfecciones. Otras secuencias son esenciales para la expresión de los transgenes clonados en las células eucariotas.

Los vectores poseen elementos para mediar la iniciación de la transcripción del gen de interés y su terminación. Además de estos componentes pueden contener otros elementos que modulan la eficiencia de transcripción (generalmente usan fuertes combinaciones de promotores y *enhancers*), los procesos post-transcripcionales, la integración sitio específica y la amplificación del gen (Rai y Padh, 2001).

Los niveles de expresión dependen principalmente de parámetros que influyen la eficiencia de transcripción, traducción o estabilidad del ARNm. La eficiencia de transcripción está determinada, por ejemplo, por la interacción entre la unidad promotor-*enhancer* de un dado plásmido con los factores de transcripción celulares, por lo que esta unidad es más o menos activa dependiendo de la línea celular, el número de copias y el sitio de integración del ADN exógeno en el cromosoma huésped. Entonces, en general, los niveles de expresión van a depender del par línea celular-plásmido.

Algunos vectores se replican exponencialmente en las células eucariotas, produciendo la muerte celular. Así, son sólo útiles para expresar transientemente la proteína de interés. Otros vectores no se replican en las células eucariotas y son útiles para la expresión transiente o estable. También es posible obtener expresión estable de una proteína recombinante sin la integración del ADN exógeno, usando plásmidos con replicación autónoma que permiten la replicación no exponencial en células eucariotas (Gibco BRL, EE.UU.; Wirth y Hauser, 1993).

5. Transfección de células eucariotas

Con el objeto de estudiar la regulación y/o expresión de genes, se han desarrollado una variedad de técnicas y reactivos que permiten la introducción de ácidos nucleicos foráneos dentro de células eucariotas. A pesar de eso, la mayoría de los métodos presentan problemas relacionados con toxicidad celular, baja reproducibilidad, inconveniencia o ineficiencia.

Actualmente, se utilizan dos diferentes formas de introducción de ADN:

- Transfección: proceso en el que el gen de interés es introducido por métodos bioquímicos o físicos.
- Infeción: proceso mediado por virus en el que las células blanco son infectadas con un virus clonado conteniendo secuencias de interés en su genoma.

La transfección generalmente requiere de algunos reactivos simples y ADN plasmídico que contenga el gen de interés en forma tal que permita su expresión en las células de trabajo. La introducción de ADN por infección, contrariamente, es a menudo más complicada, requiere de más pasos, más tiempo y, generalmente, se debe trabajar con normas de bioseguridad más estrictas. Aunque la eficiencia de las infecciones virales son altas en líneas celulares permisibles, son bajas o nulas en líneas celulares carentes del receptor para el virus elegido. Por estos motivos y debido a la facilidad de uso y a los avances tecnológicos logrados para aumentar la eficiencia del método de

transfección, éste es el procedimiento más utilizado para la introducción de ADN foráneo dentro de las células huésped.

La elección de la estrategia puede depender del tipo celular, de las características de su crecimiento y del subsiguiente uso de las células recombinadas.

Existen diferencias entre los distintos métodos de transfección en cuanto a eficiencia, facilidad de uso y reproducibilidad, por lo que no se puede predecir cuál es el método más efectivo para un tipo de célula y es crítico optimizar las condiciones a ser utilizadas en cada caso.

A diferencia de otras técnicas de transfección, como la mediada por dietilaminoetil dextrano o microproyectiles, la coprecipitación con fosfato de calcio o la electroporación, la mediada por lípidos catiónicos resulta simple, asegura resultados reproducibles y provee altos porcentajes de transfección en una amplia variedad de líneas celulares eucariotas. Los lípidos catiónicos forman pequeñas vesículas unilaminares (liposomas) en soluciones acuosas. La superficie de los liposomas está cargada positivamente e interacciona tanto con los grupos fosfato del ADN como con las cargas negativas de la membrana celular. El ADN en solución no es encapsulado dentro del liposoma sino que se une espontáneamente a las cargas positivas de los mismos formando complejos (Gibco BRL, EE.UU.), que son captados por las células.

Existen distintos genes procariontes utilizados como reporteros de la actividad transcripcional de promotores de mamíferos; estos genes pueden utilizarse, además, para evaluar y optimizar la eficiencia de transfección de una línea celular en particular. Tal es el caso del gen que codifica para la enzima β -galactosidasa (β -gal), que permite distinguir las células transfectadas transitoriamente de las que no. El método se basa en la acción hidrolítica que ejerce la enzima β -gal sobre el indicador cromogénico X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactósido), tiñendo de azul las células que han sido transfectadas exitosamente.

6. Modos de selección de las células transfectadas

Una vez que las células han incorporado el ADN que codifica para la proteína en estudio, éstas lo expresan transitoriamente durante algunos días o semanas y eventualmente el ADN se pierde en la población. La habilidad de expresar este ADN durante un período corto de tiempo es llamada expresión transitoria. En una pequeña proporción de las células transfectadas, el ADN adicionado es incorporado al genoma celular por recombinación, resultando así una transfección estable (Kaufman, 1997; Schlokot y col., 1997; Meissner y col., 2001).

La expresión transitoria es un método rápido para el estudio de genes foráneos en células de mamífero, ya que ofrece una manera relativamente sencilla de realizar el *screening* de diferentes vectores y controlar *in vitro* la funcionalidad de los mismos. Generalmente es recomendable testear nuevas construcciones mediante transfecciones transitorias antes de iniciar el laborioso procedimiento de seleccionar y caracterizar una línea celular establemente transfectada (Kaufman, 1997).

Con respecto a las transfecciones estables, las células transfectadas son subcultivadas a una baja densidad celular de manera de brindar el espacio necesario para su crecimiento, a fin de someter las mismas a una presión de selección durante días o semanas. Las células seleccionadas crecen como colonias discretas, fácilmente aislables. Estas experiencias de expresión estable de un gen conllevan a la obtención de líneas celulares permanentes.

Diversos factores influyen sobre el éxito tanto de las transfecciones estables como de las transitorias y resulta importante que los mismos sean considerados cuidadosamente antes de transfectar una línea celular.

Las consideraciones a ser tenidas en cuenta incluyen:

- La dificultad para transfectar una determinada línea celular.
- Las características celulares específicas y los marcadores genéticos del vector seleccionado.
- El método y/o reactivo de transfección empleado para una línea celular en particular.
- El tipo de ensayo empleado para determinar la expresión del gen en estudio.

Para hacer una rápida identificación de las células transformadas que expresan estable y permanentemente la proteína de interés, un marcador de selección es usualmente cointroducido en las células, junto con el gen que codifica la proteína deseada. Después de subsecuentes exposiciones a la presión selectiva, sólo las células que expresan el marcador podrán sobrevivir y una cierta fracción de estos clones podrían expresar, además, la proteína de interés. La selección puede ser dominante o recesiva.

6.1. Selección dominante

La selección es dominante en los casos en que el marcador de selección es aportado por un gen bacteriano que hace a la célula eucariota resistente a un antibiótico.

6.1.1. Antibiótico tipo aminoglucósido

Este sistema de selección utiliza el gen bacteriano *neo*, que codifica para la aminoglucósido 3' fosfotransferasa (APH). Dos enzimas APH distintas son codificadas por genes encontrados en los transposones bacterianos Tn5 y Tn60. Éstas confieren resistencia a antibióticos aminoglucósidos, como kanamicina, neomicina y geneticin, que son inhibidores de la síntesis proteica en células eucariotas y procariotas.

Las células eucariotas normalmente no expresan la actividad APH endógena, pero son capaces de expresarla desde los transposones bacterianos (Sambrook y col., 1989a; Etcheverry, 1996).

6.1.2. Antibiótico tipo *bleomycin/phleomycin*

La zeocina pertenece a una familia de antibióticos estructuralmente relacionados tipo *bleomycin/phleomycin* aislada de *Streptomyces*. Los antibióticos de esta familia son de amplio espectro y actúan como fuertes antibacterianos y antitumorales.

No se conoce el mecanismo exacto de acción de la zeocina; sin embargo, se cree que el mecanismo es el mismo que el de la *bleomycin*. La resistencia a la zeocina es conferida por el gen *sh ble*, que codifica para una proteína de 13.665 Da. En las células eucariotas que expresan esta proteína, la zeocina no puede unirse y clivar el ADN.

6.2. Selección recesiva

Para la selección recesiva se requiere que la célula sea deficiente en la correspondiente actividad enzimática. Este tipo de selección tiene una ventaja adicional, ya que brinda la posibilidad de amplificar el gen de interés. Si las condiciones de selección son apropiadas, el grado de amplificación, en la mayoría de los casos, resulta proporcional al nivel de expresión del gen.

6.2.1. Dihidrofolato reductasa

La dihidrofolato reductasa (DHFR) es la enzima más usada como marcador génico amplificable (Schlokot y col., 1997). Para el procedimiento de selección y amplificación de esta enzima, se utilizan células CHO *dhfr* (células CHO deficientes en la actividad dihidrofolato reductasa).

La DHFR cataliza la conversión de folato a tetrahidrofolato. El tetrahidrofolato es requerido para la biosíntesis de glicina desde serina, de timidina monofosfato desde deoxiuridina monofosfato y de purinas.

El MTX es un análogo del ácido fólico que se une e inhibe a la DHFR, llevando a la muerte celular. Cuando las células son seleccionadas para crecer en concentraciones crecientes de MTX, la población que sobrevive contiene niveles aumentados de DHFR, como resultado de la amplificación de este gen. Este sistema es utilizado para coamplificar un gen heterólogo y así obtener un alto nivel de expresión, ya que la amplificación del gen de la DHFR iría acompañada de la concomitante amplificación de regiones flanqueantes a este gen (Sambrook y col., 1989a; Kaufman, 1990).

Durante la selección inicial, el nivel de expresión de la proteína recombinante se relacionaría con la posición del cromosoma en la cual se integra el gen, por ejemplo en sitios transcripcionalmente muy activos. En contraste, después de la amplificación, existe una estrecha relación entre el número de copias del gen y el nivel de expresión (Schlokot y col., 1997).

7. Factores que afectan la expresión de una proteína recombinante

La producción de proteínas por las células es modulada por eventos moleculares en diferentes niveles, desde la transcripción, procesos post-transcripcionales, traducción, procesos post-traduccionales, hasta la secreción.

Los niveles de expresión de genes heterólogos introducidos en células de mamíferos dependen de numerosos factores que incluyen:

- La línea celular utilizada como huésped.
- El plásmido de expresión utilizado.
- El número de copias del gen por célula.
- El sitio de inserción cromosómica del o los genes codificantes.
- La eficiencia de transcripción, procesamiento, transporte, estabilidad y eficiencia de traducción del ARNm.
- El procesamiento, secreción y estabilidad de la proteína.
- Las condiciones de cultivo empleadas.

7.1. Estabilidad del ARNm

Los ARNm eucariotas poseen regiones 3' y 5' no traducibles (UTR) de diferentes tamaños. Existe evidencia de que estas secuencias no traducidas están involucradas en el control post-transcripcional de la expresión de genes, gobernando la eficiencia de traducción y la estabilidad. Por ejemplo, el segmento poli(A) que aumenta marcadamente la estabilidad de varios ARNm (Kruys y col., 1987), es una característica común de la mayoría de los ARNm de eucariotas y tendría una función importante en el procesamiento, la estabilidad y traducción del ARNm (Grafo y col., 1993).

La estabilidad de los ARNm es muy importante en la regulación de la expresión génica. Los ARNm de células de mamíferos exhiben un amplio espectro de tiempos de vida media, que pueden ir desde 17 h para la β -globina (BGH) hasta 30 min para *c-fos*.

El rápido *turnover* de un ARNm asegura que se mantenga en relativamente bajas concentraciones, y cambios en la velocidad de *turnover* modifican las cantidades en un breve período de tiempo. En general, los ARNm de vida corta son sintetizados por genes que responden rápida y transientemente a varias señales celulares, y a menudo codifican para citoquinas, factores de crecimiento, factores de transcripción y protooncogenes (Aharon y Schneider, 1993). Este tipo de regulación permite alteraciones transientes en su expresión aún en presencia continua del inductor. Una característica de estos ARNm es que poseen secuencias repetidas (AUUUA)_n también conocidos como elementos ricos en A y U (ARE) en la región 3' UTR, que sirven como señal para el rápido *turnover*.

Las regiones ARE han sido clasificadas en tres categorías diferentes basadas en el número y distribución de los pentámeros AUUUA:

- Clase I, caracterizada por la presencia de uno a tres pentámeros distribuidos en la región 3'UTR acoplada con regiones cercanas ricas en U.
- Clase II, tienen al menos dos copias del nonámero UUAUUU(U/A)(U/A)U en un ambiente rico en U.
- Clase III, no contiene pentámeros pero presenta regiones ricas en U.

Las ARE de las tres clases confieren inestabilidad a los ARNm en las células en cultivo a través de diferentes mecanismos que implican deadenilación del ARNm. Los ARE de clase II [ej: interleuquina-3 (IL-3), factor estimulante de colonias de

granulocitos y macrófagos (GM-CSF), TNF- α] inducen deadenilación asincrónica resultando en la acumulación de intermediarios poli(A)-. En contraste, los ARE de clase I y III (ej: *c-fos* y *c-myc*) inducen el acortamiento de la cola de poli(A) sincrónico. Basado en su secuencia, el IFN- β 1 pertenece a la clase II. La degradación de ARNm de genes transientemente inducidos usualmente procede a través de un camino de 2 pasos. El primer paso incluye la deadenilación, como se ha demostrado para el ARNm de IFN- β 1, y el segundo paso involucra una rápida degradación del ARNm deadenilado, que es facilitado por la presencia de motivos ARE en la región 3'UTR (Raj y Pitha, 1993; Chen y Shyu, 1995).

El ARNm de IFN- β 1 humano es muy inestable, su tiempo de vida media fue estimado entre 30 y 60 min (Raj y Pitha, 1981). Se ha encontrado que posee secuencias ARE en la región 3'UTR y dominios de inestabilidad en la región codificante (CRID), también identificados en protooncogénes (Mosca y Pitha, 1986; Whittemore y Maniatis, 1990; Raj y Pitha, 1993).

Recientemente se han identificado en una variedad de células eucariotas numerosas proteínas que se unirían específicamente a los motivos ARE, cuyo rol sería controlar el tiempo de vida media de los ARNm. Aunque se desconoce el mecanismo por el cual estas secuencias ejercerían su efecto sobre la eficiencia de traducción y estabilidad, se han propuesto algunos modelos. Brewer y Ross sugieren para el ARNm de *c-myc* que las proteínas que se unen a la secuencia de poli(A) migrarían desde ésta a las secuencias 3' ricas en AU, dejando la cola de poli(A) desprotegida del ataque de nucleasas. Otro modelo sugiere un posible apareamiento entre las bases de la cola de poliA y la secuencia ARE, que permitirían el ataque de nucleasas en los puntos de apareamientos erróneos. Se ha sugerido que éste sería el caso del ARNm de IFN- β 1.

7.2. Condiciones de cultivo

Los cultivos celulares muestran diferentes respuestas a cambios externos en las condiciones de cultivo. La respuesta celular más común incluye cambios en la expresión de genes.

7.2.1. Efecto del butirato de sodio

El paso limitante de la velocidad de transcripción es el nivel de iniciación de transcripción. El ADN está altamente condensado en la estructura de la cromatina y esta condensación a menudo dificulta la accesibilidad de los complejos de transcripción al ADN. La activación de la transcripción requiere el reordenamiento de la estructura de la cromatina, también conocido como remodelado de la cromatina. La cromatina y las proteínas importantes para el control de la transcripción pueden desarrollar una variedad de modificaciones, tales como metilación, ubiquitinación, fosforilación y acetilación. La acetilación es un importante paso en el control de la transcripción. Como regla general, los genes transcripcionalmente activos usualmente exhiben acetilación, mientras que los inactivos no (Barnes y col., 2003).

Una posible ruta para incrementar la productividad de una célula recombinante resulta entonces de suplementar el medio de cultivo con butirato de sodio (NaBu), ya que se ha encontrado que el mismo aumenta la biosíntesis de proteínas en diferentes líneas celulares. Uno de los cambios más evidentes es a través de la remodelación de la cromatina, vía acetilación de las histonas por inhibición de la enzima histona desacetilasa (Fig. 4). La acetilación del core de histonas ejerce una gran influencia en la accesibilidad a la cromatina de moléculas reguladoras (Lee y col., 1993; Mimura y col., 2001).

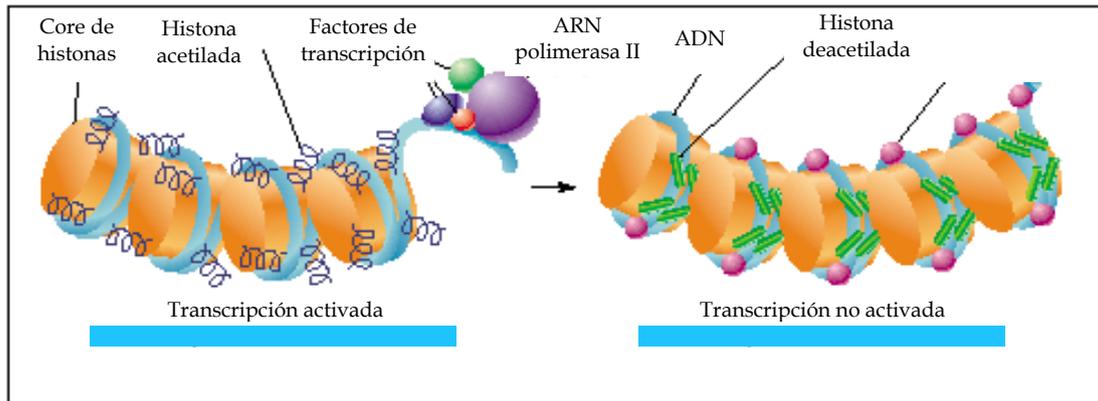


Fig. 4. Modificación en el estado de transcripción hacia un estado activo, favorecido por la acetilación de las histonas (Modificado desde Brown y Strathdee, 2002).

El tratamiento de cultivos celulares con NaBu produce modificaciones de la estructura de la cromatina y del ensamblaje del citoesqueleto, y alteraciones en la morfología celular, velocidad de crecimiento, síntesis de ADN, actividades enzimáticas y diferente expresión de genes (D'Anna y col., 1980; Souleimani y Asselin, 1993).

Se ha demostrado que el tratamiento con NaBu disminuye la probabilidad de que las células puedan pasar de la fase G1 a la fase S y que el efecto es dependiente de la concentración de NaBu. A menor concentración algunas células continúan atravesando la fase G1 y el crecimiento celular continúa por lo menos durante las primeras 24 h de exposición. Además, habría un enlentecimiento de la progresión en todas las fases del ciclo celular, con arresto predominantemente en la fase G1. El NaBu afectaría el ciclo celular de las células CHO por enlentecer la progresión del ciclo celular a través de las fases G2 y/o M, resultando en un incremento de la proporción de células en la fase G1. Diferentes líneas celulares tienen diferentes tiempos de duplicación y quizás diferente sensibilidad al NaBu. La concentración de NaBu puede alterar el período requerido para arrear las células en la fase G1 o puede inducir un indiscriminado arresto del ciclo celular (D'Anna y col., 1980).

7.2.2. Efecto del Zn^{2+}

Se ha encontrado que la proteína tristetraprolina (TTP), requerida para la regulación de la degradación del ARNm del TNF, GM-CSF e IL-3, se une a secuencias ARE presentes en dichos ARNm (Chen y col., 2001).

En ensayos realizados *in vitro*, se ha observado que esta unión fue inhibida por excesos del metal zinc, estabilizando los ARNm que poseen motivos ARE. Algunos autores han hipotetizado que para todos los ARNm que poseen regiones ARE, el mecanismo de estabilización podría ser la interferencia de la unión de proteínas desestabilizantes a las secuencias ARE (De y col., 1999; Worthington y col., 2002).

Además, se ha propuesto que el Zn^{2+} tiene efecto antiapoptótico atribuido a la inhibición de endonucleasas dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} (Perry y col., 1997) y varios estudios han sugerido un rol a la OAS que es inhibida en presencia de iones Zn^{2+} (Hartmann y col., 2001).

Por lo tanto el Zn^{2+} inhibiría tanto la apoptosis celular como la degradación de ARNm lábiles.

Objetivos y Plan de Tesis

Los objetivos de esta Tesis titulada “Desarrollo de una tecnología de producción de interferón β recombinante humano en células eucariontes” fueron los siguientes:

1. Desarrollo de métodos de *screening*, cuantificación y valoración de rhIFN- β 1.
2. Obtención de plásmidos de expresión para eucariontes conteniendo el gen del hIFN- β 1. Utilización de vectores con diferentes regiones reguladoras.
3. Optimización de las condiciones de transfección.
4. Obtención de clones celulares estables productores de rhIFN- β 1a mediante la transfección de diferentes líneas celulares.
5. Caracterización de la producción de rhIFN- β 1a expresado por las distintas líneas celulares obtenidas.
6. Optimización de las condiciones y procedimientos de cultivo para lograr la máxima producción.

Los objetivos planteados abordan el estudio de distintos factores que influyen en la producción de la proteína recombinante, y que se resumen en la Fig. 5.

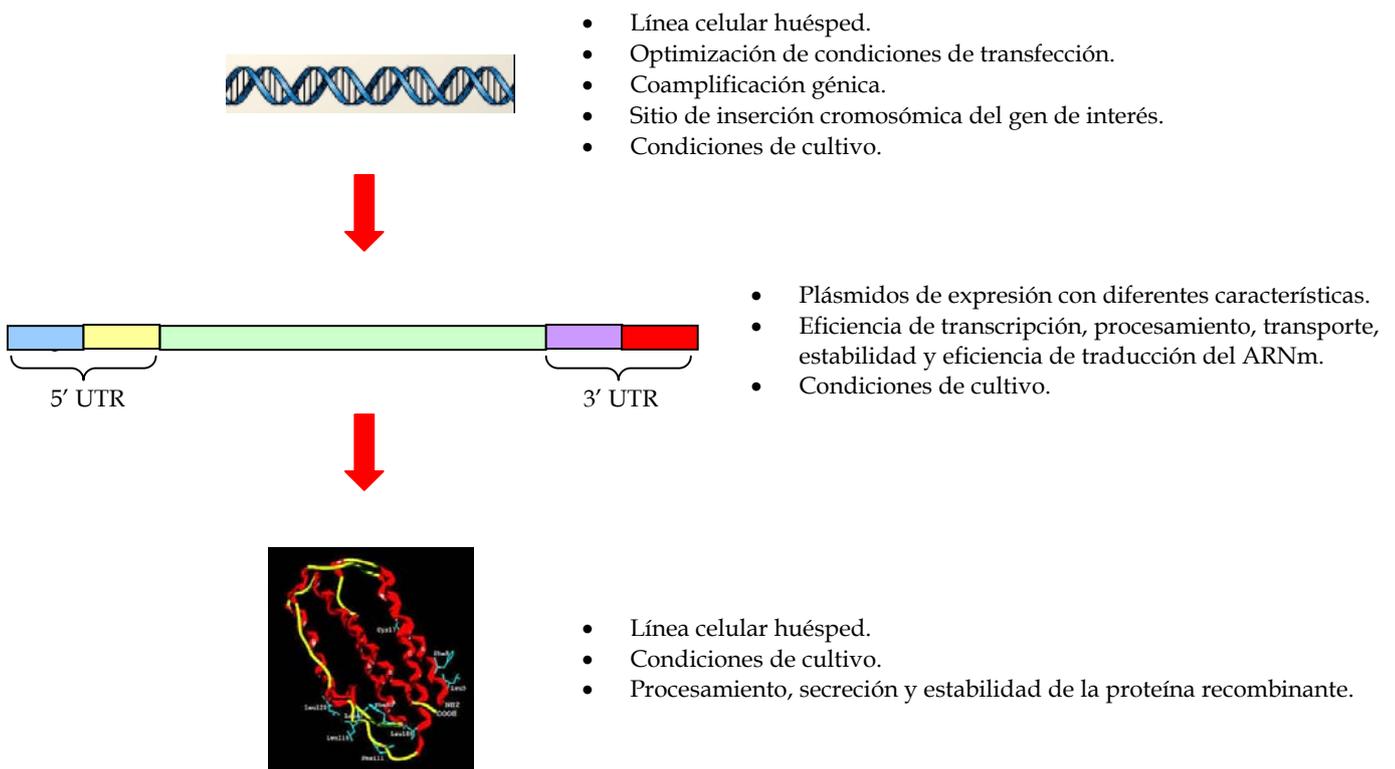


Fig. 5. Esquema general de los potenciales puntos de regulación de la expresión de rhIFN- β 1a optimizados durante el trabajo de Tesis.

De esta manera se realizaron transfecciones de diferentes líneas celulares, debido a que cada una de ellas puede presentar diferente eficiencia en la captación de ADN exógeno, optimizando previamente las condiciones de lipofección de manera tal de obtener la máxima eficiencia.

Teniendo en cuenta que los niveles de expresión de la proteína recombinante dependen de los constituyentes de los vectores y del sitio de inserción de dichos plásmidos en los cromosomas de la célula huésped, se utilizaron vectores de expresión con diferentes elementos reguladores, realizando varias transfecciones en cada caso.

Con el fin de aumentar el número de copias del gen de interés, se realizó un procedimiento de coamplificación génica con MTX en células CHO dhfr.

Se optimizaron las condiciones de cultivo agregando aditivos tales como el NaBu, que remodela la cromatina favoreciendo la transcripción, y/o Zn^{2+} , que estabiliza ARNm inestables.