

## El Potencial Redox Intracelular y su Importancia en Biotecnología

Frania J. Zúñiga-Bañuelos y Laura A. Palomares\*

*Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ave. Universidad 2001 Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos 62210 México. [franiazb@ibt.unam.mx](mailto:franiazb@ibt.unam.mx) \*Autor para correspondencia: [laura@ibt.unam.mx](mailto:laura@ibt.unam.mx)*

### RESUMEN

Potencial redox es la capacidad de transferir electrones de una especie química a otra. Su complejidad en sistemas biológicos requiere su estudio desde varios puntos de vista. Se sabe que cada organelo tiene su propio equilibrio redox, el que cambia a medida en que la célula crece y transita por las distintas fases del ciclo celular, constituyendo un sistema dinámico. El papel del potencial redox en los procesos celulares está aún en estudio. El potencial redox ha sido utilizado para el monitoreo y control de cultivos anaerobios y para diferenciar eventos metabólicos de eventos operacionales en cultivos de células animales. El estudio del potencial redox ha sido clave para entender ciertas enfermedades como Parkinson, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Esta revisión es una breve recopilación de la información disponible sobre cómo el potencial redox influye en la fisiología celular y como puede ser aprovechado en biotecnología.

**Palabras clave:** Potencial redox intracelular, especies reactivas de oxígeno, plegamiento de proteínas, potencial redox del cultivo, antioxidantes, envejecimiento.

### ABSTRACT

Redox potential is the ability to transfer electrons from a chemical species to another. The complexity of the cell requires a systematic view of the redox potential. It is known that each organelle has its own redox equilibrium, which can change at the various cell cycle phases, constituting a dynamic system. The role of the compartmentalized redox potential in cellular processes is still under investigation. Redox potential has been used as a control parameter in aerobic fermentation, as well as to distinguish operational from metabolic events in animal cell cultures. Furthermore, redox potential has been key for understanding certain diseases such as Parkinson's Alzheimer's and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). This review is a brief recompilation of the available information of how redox potential determines cellular physiology and its use in biotechnology.

**Keywords:** Intracellular redox potential, reactive oxygen species, protein folding, culture redox potential, antioxidants, aging.

## INTRODUCCIÓN

El potencial redox se refiere a la capacidad de una especie química de donar o aceptar electrones (oxidarse o reducirse, respectivamente). El potencial redox intracelular (PRI) es el sistema óxido reductor que refleja la estequiometría de diversas biomoléculas implicadas en el flujo de electrones, las que además inciden en procesos de regulación dependientes de la señalización y activación de factores transcripcionales. Una de las moléculas más importante del sistema redox es el glutatión (GSH), el cual se encuentra mayoritariamente en estado reducido dentro de la célula y su concentración va de 1 a 10 mM (Kalinina *et al.*, 2014). Además del glutatión, otras moléculas forman parte del sistema de regulación del PRI, como la tiorredoxina, NADH/NAD<sup>+</sup>, FAD<sup>+</sup>/FADH, NADP<sup>+</sup>/NADPH, además de las enzimas involucradas en su reducción. El ambiente en un sistema redox es muy dinámico, pues las reacciones redox ocurren continuamente. Se habla de un potencial redox reductor (o negativo), cuando la estequiometría de una reacción redox se inclina hacia el aumento en la concentración de la molécula que recibe electrones (reducida). Por el contrario, existe un ambiente oxidante (potencial redox positivo) cuando aumenta la concentración de la especie que pierde electrones (oxidada).

Desde los años 1950, el interés sobre el potencial redox celular aumentó con el descubrimiento de radicales libres en tejidos celulares y vegetales como productos de las

reacciones de óxido-reducción. Commoner *et al.* (1954) encontraron que los radicales libres provienen de reacciones catalizadas por enzimas involucradas en la fotosíntesis o en la formación de melanina después de la radiación ultravioleta o ionizante. Por otro lado, Harman (1956) propuso una teoría que relaciona a un alto contenido de especies reactivas de oxígeno con mutaciones, cáncer y el envejecimiento, cuando el sistema redox celular no es capaz de proteger a la célula de estos radicales. En consecuencia, diversos estudios se dirigieron hacia la comprensión de los mecanismos de homeostasis del redox celular y su importancia, especialmente para el entendimiento de patologías que afectan al ser humano.

Se ha reportado que el potencial redox intracelular afecta las siguientes funciones celulares:

1. Transporte.
2. Plegamiento de proteínas.
3. Señalización celular.

Es muy posible que otras funciones celulares también sean afectadas por el potencial redox. Ya que la biotecnología utiliza seres vivos, particularmente células, los procesos biotecnológicos están también determinados por el potencial redox. Esta variable se vuelve entonces importante desde dos enfoques, primero para el entendimiento de patologías humanas y animales y el desarrollo de estrategias de tratamiento, y segundo, para el desarrollo y mejora de los procesos biotecnológicos. En biotecnología, el potencial redox ha sido utilizado para el control de procesos de

tratamiento de aguas, de procesos anaerobios o microaerobios, e incluso de cultivo de células animales. El papel del potencial redox desde estos dos enfoques es presentado en este escrito, con la finalidad de explicar la importancia de conocer y entender el comportamiento del potencial redox ante distintas situaciones metabólicas celulares, así como reconocer su importancia en la biotecnología.

## POTENCIAL REDOX A NIVEL SUBCELULAR

Los diversos estudios realizados para determinar el potencial redox en organelos de varios tipos de células han dejado en claro que el potencial redox se regula de manera independiente en cada compartimento celular y según la especie redox en cuestión, de manera que no se puede comparar el equilibrio de dos parejas de especies redox distintas o en diferentes compartimentos (Kemp *et al.*, 2007).

### *Mitocondria*

La mitocondria es el organelo con mayor actividad redox, pues contiene la cadena respiratoria a través de la cual sucede la transferencia de electrones desde los transportadores redox hasta el oxígeno como el último aceptor de electrones. La cadena respiratoria está formada por complejos metaloproteicos que bombean protones al espacio intermembranal, logrando la fuerza protón motriz necesaria para la producción de ATP. Al mismo tiempo, se ha demostrado la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) como el superóxido y

peróxido, como subproductos de la transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria, y su papel en la regulación de la apoptosis celular (Cai & Jones, 1998; Scialo *et al.*, 2013). La determinación del estado redox en la mitocondria bajo diferentes condiciones celulares ha sido de gran interés por su relevancia para explicar la causa de algunas enfermedades. Se ha estudiado el equilibrio de especies redox encontradas en toda la célula que además son reguladas de manera independiente, como el par NADPH/NADP<sup>+</sup>, tiorredoxina (Trx1, Trx2), GSH/GSSG (disulfuro de glutatión, glutatión oxidado) y Cys/CySS (Go & Jones, 2008). Mediante la cuantificación de la relación de GSH/GSSG en mitocondrias purificadas de hígado, se calculó un rango de potencial redox entre -330 y -300 mV (Kemp *et al.*, 2007). Tiempo después, mediciones en mitocondrias de células de hojas de *Arabidopsis*, utilizando roGFP2, una proteína fluorescente sensible a redox, se encontró un potencial de -330 mV (Rosenwasser *et al.*, 2010). En mitocondrias de células HeLa, Hanson *et al.*, (2004) encontraron un potencial redox de -360 mV, que es altamente reductor, posiblemente en consecuencia de un alto grado de proliferación celular, pues se ha observado que cuando el potencial redox (referido a la especie GSH) se vuelve más reductor, aumenta la concentración celular (Hutter *et al.*, 1997), de manera que cumple una función importante en la regulación del ciclo celular. Se sabe que GSH está presente en el núcleo, se ha pensado que su papel señalizador consiste en mantener una

arquitectura nuclear apta para la expresión de genes (García-Giménez, *et al.*, 2013).

En estudios más recientes, se ha comparado el impacto de la oxidación de glutatión dentro de la mitocondria, con el fin de conocer el tiempo de recuperación del potencial redox gracias a la actividad antioxidante de la célula. Para ello, Kolossov *et al.* (2014) transfectaron establemente células CHO con roGFP2 unida a Grx1 (Glutarredoxina 1), dirigida a mitocondria y citoplasma, añadieron diamida, un eficiente oxidante de tioles (Kosower *et al.*, 1969; Rigobello *et al.*, 2005) y retirándolo después de unos minutos, observaron el cambio del potencial redox mediante microscopía de fluorescencia en tiempo real, siguiendo el grado de oxidación de roGFP2. Ellos encontraron que el tiempo de vida media de recuperación del sensor es de  $160 \pm 6$ s en mitocondria y  $155 \pm 12$ s en citoplasma, valores muy cercanos. Sin embargo, cuando inhibieron la síntesis de GSH por BSO (Butinona sulfoxamina) en ambos compartimentos, hubo una diferencia importante en ambos compartimentos, resultando en un potencial redox más oxidante en la mitocondria, mientras que en el citoplasma el potencial redox regresó rápidamente a sus valores normales. Estos resultados resaltan la importancia del GSH en la capacidad de amortiguamiento del potencial redox en la célula, como lo han mencionado diversos trabajos en el tema (Ayer *et al.*, 2014; Foyer *et al.*, 2002). Esto indica que la respuesta a perturbaciones externas en el equilibrio redox es

independiente para cada compartimento, ya que el control del exceso de moléculas oxidantes o reductoras, puede sujetarse a la presencia y concentración de antioxidantes, reguladores e incluso la producción de ERO, como lo propone Kolossov *et al.* (2015) para el caso de la cadena respiratoria en mitocondria.

## *Citoplasma*

Durante estudios de superóxido en apoptosis, Cai & Jones (1998) compararon el potencial redox, calculado con la ecuación de Nerst, de las especies GSSG/GSH (-239 mV) en equilibrio contra el del par NADPH/NADP (-394mV), reportado por Sies (1982), en estado estacionario. Se observa que el primero tiene un balance más oxidante que el segundo, el cual funciona como cofactor para reducir el GSSG por la glutatión reductasa (Karplus & Shulz, 1989).

## *Retículo endoplásmico*

El equilibrio redox en el retículo endoplásmico (RE) tiende a ser oxidante. La primera cuantificación fue realizada enzimáticamente por Hwang *et al.* (1992), siguiendo la metodología de Anderson (1985), encontrando que el estado redox celular global en células de hibridoma esta entre -233 y -239 mV, mientras que en RE obtuvieron un redox de -172 a -188 mV. En otro estudio en células de epidermis de tabaco, se comparó el potencial redox en citosol y RE al expresar roGFP2 en estos compartimentos, encontrando valores de  $-320 \pm 0.2$  mV y  $-225 \pm 2.0$  mV,

respectivamente, confirmando así un mayor grado de oxidación en RE (Schwarzländer *et al.*, 2008). Actualmente se sabe que una de las funciones más importantes del retículo endoplásmico es recibir, plegar y ensamblar las proteínas que transitan por esta vía secretora, para lo cual, como se describirá más adelante, un entorno oxidante es imprescindible.

## *Golgi*

Después de su descubrimiento hace más de 100 años, la complejidad de este organelo ha atraído el interés de muchos investigadores en diversos temas, uno de ellos es la forma en que funciona durante la respuesta celular para contender con el estrés oxidante. Se ha determinado el potencial redox en los lisosomas, utilizando la proteína roGFP dirigida a este sitio y se sabe que es de -240 mV (Austin *et al.*, 2005), mucho más oxidante que en mitocondria, pero similar al estado redox global en hibridoma, según Anderson (1985). A pesar de esta diferencia, los lisosomas se consideran los principales organelos en la modulación del estrés oxidante (Go & Jones 2008; Kurz, *et al.*, 2010). Aunque no se conoce el potencial redox en el Golgi, se han descrito mecanismos de respuesta ante estrés oxidante (Jiang *et al.*, 2011), por ejemplo cuenta con las bombas  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ATPasas codificadas por los genes *ATPC1/ATP2C2* en mamíferos (Vanoevelen *et al.*, 2005), que contribuyen a disminuir la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en el citoplasma, lo cual es muy relevante, por ser iones involucrados en vías de señalización

para la producción de ERO e inducción de apoptosis (Brookes *et al.*, 2004; Görlach *et al.*, 2015).

En el Golgi también hay producción de antioxidantes por componentes en su membrana. La ubiquinona es el transportador de electrones y es un antioxidante (Nyquist *et al.*, 1970; Crane *et al.*, 1993; Maroz, *et al.*, 2009), principalmente evitando la peroxidación lipídica relacionada a enfermedades cardiovasculares (Siegel, *et al.*, 2014). Dos glutaredoxinas (Grx6 y Grx7) y parkin, se añaden a la lista de antioxidantes. Las primeras evitan la oxidación y posible degradación de proteínas citoplásmicas, lo que aumenta la resistencia de la célula al estrés oxidante (Mesecke *et al.*, 2008). Parkin fue localizada en el trans-Golgi por Kobo y colaboradores (2001). Posee un dominio ubiquitin en la región N-terminal y dos motivos tipo dedo de zinc. Fue llamada así porque es codificada por un gene que presenta amplias deleciones en pacientes con AR-JP ("*Autosomal recessive juvenile parkinsonism*") (Kitada *et al.*, 1998). La sobreexpresión de parkin silvestre y mutado en células NT-2 y SK-N-MC por Hyun *et al* (2002) mostró que la concentración de lípidos peroxidados es más alta en las células expresando la mutante. Esto sugiere que estos componentes son vitales para conservar la homeostasis celular.

Interesantemente la regulación del potencial redox en cada organelo es distinta e independiente. Al parecer esto tiene relación con la función que cada uno desempeña en la célula. No obstante, el desequilibrio de las reacciones redox en tan

solo un compartimento celular puede causar una sucesión de eventos con impacto fisiológico, por ejemplo, el plegamiento ineficiente de proteínas como resultado de un exceso de radicales libres en el retículo endoplásmico (Iqbal *et al.*, 2014; Karademir *et al.*, 2015), que conduce a la formación de agregados proteicos y a diversas respuestas de estrés, como se describe a continuación.

## IMPORTANCIA EN PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS

Una de las funciones más importantes de las especies redox es la formación de puentes disulfuro a través de la oxidación de las cisteínas que poseen las proteínas. Este evento sucede principalmente en el retículo endoplásmico (RE) y forma parte del proceso de maduración y estabilización de proteínas que finalmente serán secretadas o formarán parte de la membrana celular. El número de combinaciones posibles para el plegamiento de una proteína puede ser enorme, sin embargo, como lo propuso Anfinsen (1962) hace 50 años, el arreglo tridimensional de la cadena de aminoácidos es el más favorable, y la proteína contiene información que permite el correcto apareamiento de sus puentes disulfuro y así lograr la formación de otros entrecruzamientos covalentes que le den mayor estabilidad a la proteína. Actualmente se sabe que las reacciones que catalizan la formación de puentes disulfuro son realizadas por un amplio número de enzimas con actividad disulfuro isomerasa (PDI por sus siglas en inglés "*Protein disulfide isomerase*"), caracterizadas por tener un dominio tiorredoxina (Trx) (Edman

*et al.*, 1985). Cada una de estas proteínas tiene especificidad por su sustrato, regulada por el número, localización y reactividad redox de los motivos Cys- Xaa- Xaa- Cys, de la proteína a plegar, así como de los valores de *pKa* de ambas cisteínas (Okumura *et al.*, 2015).

El mecanismo de formación de puentes disulfuro se esquematiza en la figura 1. La primer reacción ocurre a partir de la PDI oxidada (PDloxd), que, después de encontrarse con su sustrato ditiol, genera la PDI reducida (PDIred) y el puente disulfuro en la proteína "cliente", luego un oxidante no enzimático o enzimático, como Ero1, reacciona con PDIred para generar nuevamente PDloxd y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lo anterior vuelve a repetirse iterativamente hasta formar los puentes disulfuro de la proteína "cliente" (Hudson *et al.*, 2014). La complejidad de este mecanismo aumenta, pues otros pares redox contribuyen directamente a la oxidación de proteínas desplegadas, como GSSG, dehidroascorbato, peróxido de hidrógeno (Hudson *et al.*, 2014), y miembros de la familia quiescin-sulfidril oxidasa (QSOX), muy abundante en eucariontes, que utilizan un dominio de tiorredoxina y un pequeño sitio de unión a FAD (Thorpe *et al.*, 2002). Se sabe que la PDI contribuye a evitar la formación de agregados proteicos. Aunque estudios en pacientes con enfermedades neurodegenerativas han encontrado que PDI forma cuerpos de inclusión en células del sistema nervioso central (Iqbal *et al.*, 2014).

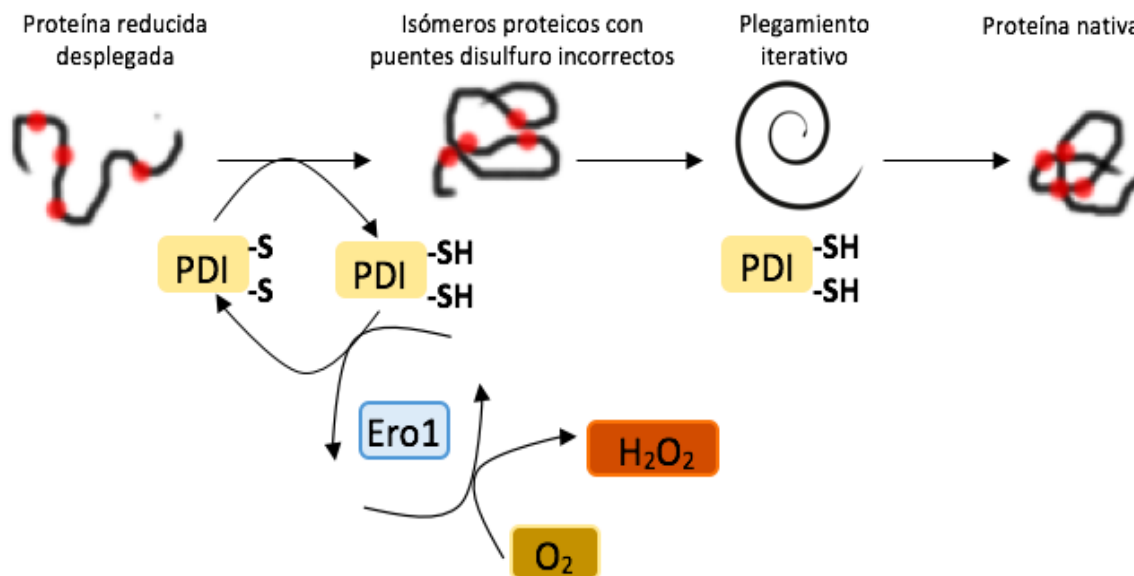


## ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL POTENCIAL REDOX

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa que, en la mayoría de los casos, está relacionada con mutaciones en la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1) (Atkin *et al.*, 2008; Ezzi *et al.*, 2007; Laurindo *et al.*, 2012). La SOD1 tiene un alto poder antioxidante, pues cataliza la conversión de superóxido a

oxígeno y peróxido (Getzoff *et al.*, 1983; Fridovich, 1995).

En estudios recientes se ha encontrado que las mutaciones adquiridas no siempre ocasionan la disminución de la actividad catalítica, sino por el contrario, generan nuevas propiedades catalíticas que incrementan la producción de radicales tóxicos, como en el caso de la actividad de



**Fig. 1.** Ejemplo del mecanismo formación de puentes disulfuro durante el plegamiento de proteínas. El proceso empieza con el péptido completamente reducido. La disulfuro isomerasa (PDI) oxidada cataliza la formación de puentes disulfuro entre las cisteínas. Los puentes disulfuro se forman de manera iterativa hasta que se obtiene el plegamiento funcional más estable, el que corresponde a la forma nativa de la proteína. Nótese que la presencia de oxidantes es necesaria para la regeneración de la PDI. La regeneración de la PDI puede ocurrir a través de reacciones catalizadas por enzimas, por ejemplo la Ero1, o a través de reacciones no enzimáticas.

SOD1/ $H_2O_2$  dependiente de bicarbonato, que cataliza la oxidación de tocoferoles y lípidos insaturados (Goss *et al.*, 1999). Más aún, nuevos estudios mostraron que los radicales generados por la SOD mutante ocasionan la oxidación, inactivación y agregación de PDI, provocando la pérdida del control de calidad durante el plegamiento de proteínas en el

retículo endoplásmico y la formación de cuerpos de inclusión en neuronas motoras (Iqbal *et al.*, 2014; Karademir *et al.*, 2015).

## ENVEJECIMIENTO RELACIONADO CON POTENCIAL REDOX

Otra relación interesante entre el potencial redox y la salud, es con la longevidad y el envejecimiento. La teoría del envejecimiento

Basada en radicales libres (FRTA, por sus siglas en Inglés “*Free Radical Theory of Aging*”) fue propuesta por Harman en 1956, quien publicó en 1993 una hipótesis sobre el origen de la demencia senil en relación con la disfunción celular y la acumulación de ERO en el cerebro, desde entonces, se han acumulado estudios que refuerzan o rechazan esta teoría. Por ejemplo, en un estudio realizado por Rebrin & Sohal (2004), en el que compararon la concentración de GSH/GSSG total y mitocondrial, además de proteína reactiva a sulfidrilos en hígado, cerebro, riñón, músculo esquelético y corazón, de dos cepas de ratones de distinta esperanza de vida, encontró que la proporción de GSH con respecto a GSSG, fue 32, 50 y 21% mayor en mitocondria de hígado, cerebro y músculo esquelético en ratones de esperanza de vida larga (C57BL/6) que en ratones de vida corta (SAM), de igual forma, la diferencia en cantidad de proteína reactiva a sulfidrilos fue significativamente mayor en tejido de hígado, riñón, corazón y músculo esquelético de ratones C57BL/6 que en ratones SAM. Se destaca la particularidad de que el tejido de ratones longevos está en condiciones más reductoras que el tejido de ratones con vida corta y curiosamente estos últimos muestran menor capacidad reductora por su baja concentración de proteína reactiva a sulfidrilos. No obstante esto no indica con seguridad que el envejecimiento sea una consecuencia del estado de oxidación celular, pues no es posible distinguir causa de efecto. Otros estudios han demostrado

que no existe relación entre la capacidad de mantener un ambiente mitocondrial reductor y la longevidad, sobre todo en organismos pequeños como la mosca *Drosophila* (Miwa et al, 2004) y el gusano *Caenorhabditis elegans* (Clancy & Birdsall, 2013; Ranjan et al., 2013). También se ha buscado explicar mediante esta teoría la diferencia de longevidad entre el género femenino y el masculino en una misma especie (Magnani & Accorsi, 1993) y se ha propuesto la idea de que el nivel de estrógeno pudiese influir la capacidad reductora de la mitocondria. Sin embargo, no se observó diferencia en la longevidad de ratones C57BL/6 machos o hembras y no hay diferencia significativa entre los niveles de ERO mitocondriales (Sanz et al. 2006). Otras investigaciones han mostrado que la capacidad de mantener un potencial redox mitocondrial reductor en hembras es mayor al tener un alto nivel de expresión, así como de actividad, de las enzimas glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa (Borrás et al., 2003). Se ha observado un importante incremento en las mutaciones del ADN mitocondrial en animales con vida corta, resultando en proteínas de la cadena respiratoria con función alterada. El mal funcionamiento de la cadena respiratoria resulta en la sobreproducción de ERO (Payne & Chinnery, 2015; Krishnan et al., 2008; Ritcher, 1995). Queda por responderse la pregunta: ¿qué es lo que propicia una menor vulnerabilidad a la mutación en el DNA mitocondrial de organismos longevos?.



# Artículos

## EFFECTO DEL POTENCIAL REDOX EN CULTIVOS CELULARES

El potencial redox en cultivos (PRC) celulares se refiere al balance entre las especies óxido-reductoras en el medio de cultivo, estas especies redox pueden ser moléculas producidas por la célula o adicionadas al reactor, como O<sub>2</sub>, DTT, glutatión, etc. Como se muestra en la tabla I, existen estudios con el interés de determinar el efecto del potencial redox sobre la

productividad y la calidad del producto en biorreactores, ésto representa una ventaja para el control de cultivos, pues el potencial redox es un parámetro relativamente fácil de medir en línea, que se ha propuesto para seguir cambios en tiempo real de otras variables que estén relacionadas como el crecimiento celular (Lin *et al.*, 2010), viabilidad (Pluschkell & Flickinger, 1996; Eyer & Henzle, 1995) y metabolismo (Higareda *et al.*, 1997).

**Tabla I.** Cultivos bajo control de PRC y su efecto en la producción.

Tipo de cultivo	Control de PRC	Efecto en el cultivo	Referencia
Quimiostato con aguas residuales (sintética) de composición conocida, alta en glucosa, K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y NaHCO <sub>3</sub> , para la producción de biogas.	Dosificación de O <sub>2</sub> usando PR, controlado de -230 a -180mV, 50 y 100mV por encima del PR natural, respectivamente.	Durante la oxigenación a PR controlado, los sulfuros disueltos y gaseosos fueron completamente eliminados, lo que resultó en mayor producción de metano.	Khanal & Huang, 2002.
Reactor en lote secuencial para la remoción de amonio en aguas residuales de soya.	Control de aeración mediante PR. Correlación entre potencial redox y degradación de materia orgánica y oxidación de amonio.	Control de acumulación de nitrógeno en tiempo real, usando PR y pH. Disminución del amonio al 95%, como resultado de aeración controlada.	Gao <i>et al.</i> , 2007
Fermentación de <i>Candida tropicalis</i> para la producción de xilitol a partir de D-xilosa durante limitación de oxígeno.	Control de aeración y alimentación de glucosa mediante monitoreo de PR.	La máxima producción de xilitol se obtuvo a -180mV y una tasa de aeración de 0.21 min <sup>-1</sup>	Sheu <i>et al.</i> , 2003.
Reactor en lote secuencial, alimentado dos veces, para la	Monitoreo en un rango de 0 a -500mV. Correlación entre	Indicador de nitrificación y desnitrificación del cultivo. La concentración mínima	Han <i>et al.</i> , 2008

# Artículos

desnitrificación de estiércol de puerco.	presencia de $\text{NO}_3^- \cdot \text{N}$ y PR.	de $\text{NO}_3^- \cdot \text{N}$ se encuentra entre -320 a -412mV (máxima desnitrificación).	
Fermentación en lote con <i>Actinobacillus succinogenes</i> NJ113 para la producción de ácido succínico.	Comparación de PR constante en cinco niveles: -100, -300, -350, -400 y -450mV con la adición de ferrocianuro de potasio ( $1\text{g L}^{-1}$ ) y/o ditiotreitól ( $1\text{g L}^{-1}$ ).	Se encontró que cuando el PR fue de -350mV, la productividad aumentó un 66%, dado que disminuye la fuga de sustrato hacia la formación de compuestos sin interés para la producción.	Li <i>et al.</i> , 2010
Cultivo en lote de hibridomas produciendo un anticuerpo monoclonal (AcM).	Control del PRC entre -130 y 70 mV utilizando mezclas de oxígeno y nitrógeno.	Las condiciones reductoras resultaron en mayor producción de AcM y concentración celular. La mayor velocidad de producción del AcM a PRC intermedios. PRC oxidantes indujeron apoptosis.	Meneses-Acosta <i>et al.</i> , 2012

Sabiendo que el potencial redox en el cultivo es resultado del balance entre diversos pares redox, Higareda *et al.* (1997) monitorearon el oxígeno disuelto (OD), pH y potencial redox de cultivos en lote de células de hibridoma murino, para la producción de un anticuerpo monoclonal. Encontraron distintos patrones de cambio de las tres variables cuando el cultivo se encontraba bajo limitación de glucosa (Glc) o glutamina (Gln), a diferencia de un cultivo con suficiente sustrato en el que hubo cambios relacionados a eventos operacionales. Ellos proponen dos ecuaciones para predecir el PRC con base en la especie redox  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ , (fácilmente cuantificable por pH gracias al peróxido de hidrógeno), cuando OD

es constante y cuando pH es constante. Sin embargo, es probable encontrar un comportamiento que no se ajuste las ecuaciones propuestas, lo cual denota que existen otras moléculas oxidantes y/o reductoras secretadas por las células que dominan en el cultivo, como en el caso de la limitación de Glc y Gln, sustratos importantes en el metabolismo celular, para los cuales valdría la pena ajustar un modelo especial, como lo destacan Lee *et al.* (1998). Estos modelos son valiosos al ser implementados como estrategia de control, para encontrar variaciones metabólicas en el cultivo que pudieran afectar la producción.

## CONCLUSIONES

La medición del potencial redox en sistemas biológicos permite obtener información sobre el metabolismo celular, su estado energético e incluso predecir la viabilidad o longevidad. El surgimiento de nuevas tecnologías que nos permiten darle seguimiento a la evolución del potencial redox celular en tiempo real permiten entender los procesos celulares y como dependen del balance redox. Quedan aún muchas preguntas por responder, pues en la mayoría de las situaciones es difícil determinar si el potencial redox y la acumulación de ERO son los responsables de algún evento celular, o por el contrario, consecuencia de ese evento. Este campo seguirá siendo un importante tema de estudio que permitirá un mayor entendimiento de un amplio rango de eventos celulares e incluso a nivel orgánico. La biotecnología se beneficiará de este conocimiento al poder obtener productos en mayor cantidad y calidad a través del mayor entendimiento de los fenómenos redox que los rigen.

## AGRADECIMIENTOS

Financiamiento PAPIIT UNAM IT200315 e IT201214. FJZB es alumna del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y recibe beca del CONACYT 384123. Agradezco a Shirley Ainsworth, Omar Arriaga, Javier Peza Villa y Alexa Milley Gómez Restrepo, responsables de poner a nuestra disposición los recursos de información científica y tecnológica del acervo institucional.

## REFERENCIAS

- Anderson M (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Method. Enzymol.* 113: 548-555.
- Anfinsen C (1962) Some observations on the basic principles of design in protein molecules. *Comp. Biochem. Physiol.* 4: 229-240.
- Atkin J, Farg M, Walker A, McLean C, Tomas D & Horne M (2008) Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 30: 400–407.
- Austin C, Wen X, Gazzard L, Nelson C, Scheller R & Scales S (2005) Oxidizing potential of endosomes and lysosomes limits intracellular cleavage of disulfide-based antibody–drug conjugates, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (50): 17987–17992.
- Ayer A, Gourlay C & Dawes I (2014) Cellular redox homeostasis, reactive oxygen species and replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.* 14: 60–72.
- Borrás C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó F & Viña J (2003) Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biol. Med.* 34(5): 546–552.
- Brookes P, Yoon Y, Robotham J, Anders M, Sheu S, (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle, *Am. J. Physiol.- Cell Ph.* 287: C817–C833.

- Cai J & Jones D (1998) Superoxide in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273: 11401-11404.
- Clancy D & Birdsall J (2013) Flies, worms and the Free Radical Theory of ageing. *Aging Res. Rev.* 12(1): 404-412.
- Commoner B, Townsend J & Pake G (1954) Radicals in biological materials. *Nature* 4432: 689-691.
- Crane F, Sun I & Sun E (1993) The essential functions of coenzyme Q. *Clin. Investig.* 71: S55- S59.
- Edman J, Ellis L, Blacher R, Roth R & Rutter W (1985) Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature* 317: 267-270.
- Eyer K & Heinzle E (1995). On-line estimation of viable cells in a hybridoma culture at various DO levels using ATP balancing in redox potential measurement. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 277-283.
- Ezzi S, Urushitani M & Julien J (2007) Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *J. Neurochem.* 102: 170-178.
- Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112.
- Foyer C, Theodoulou F & Derlot S (2002) The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants, *Trends Plant Sci.* 6(10): 486-492.
- Gao D, Peng Y, Liang H & Wang P (2007) Using oxidation-reduction potential (ORP) and pH value for process control of shortcut nitrification-denitrification. *J. Environ. Sci. Heal. A* A38(12): 2933-2942.
- García-Giménez J, Markovic J, Dasí F, Queval G, Schnaubelt D, Foyer C & Pallardó F (2013) Nuclear glutathione. *Biochim. Biophys. Acta* 1830: 3304-3316.
- Getzoff E, Tainer J, Weiner P, Kollman P, Richardson J & Richardson D (1983) Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* 306: 287-290.
- Go YM & Jones D (2008) Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1780: 1273-1290.
- Görlach A, Bertram K, Hudecova S & Krizanova O (2015) Calcium and ROS: A mutual interplay, *Redox Biol.* 6: 260-271.
- Goss S, Singh R & Kalyanaraman B (1999) Bicarbonate Enhances the Peroxidase Activity of Cu,Zn-Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* 274: 28233-28239.
- Han Z, Wu W, Zhu J & Chen Y (2008) Oxidation-reduction potential and pH for optimization of nitrogen removal in a twice-fed sequencing batch reactor treating pig slurry. *Biosyst. Eng.* 99: 273-281.
- Hanson G, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi R, Tsien R & Remington J (2004) Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicator. *J. Biol. Chem.* 279: 13044-13053.
- Harman D (1956) Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11: 298-300.
- Harman D (1993) Free radical theory of aging: a hypothesis on pathogenesis of senile

- dementia of the Alzheimer's type. *Age* 16: 23-30.
- Higareda AE, Possani LD & Ramírez OT (1997) The Use of Culture Redox Potential and Oxygen Uptake Rate for Assessing Glucose and Glutamine Depletion in Hybridoma Cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 56: 555-563.
- Hudson D, Gannon S & Thorpe C (2014) Oxidative protein folding: From thiol-disulfide exchange reactions to the redox poise of the endoplasmic reticulum. *Free Rad. Biol. Med.* 80: 171-182.
- Hutter D, Till B & Greene J (1997). Redox State Changes in Density-Dependent Regulation of Proliferation. *Exp. Cell Res.* 232: 435-438.
- Hyun D, Lee M, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Halliwell B & Jenner P (2002) Effect of wild-type or mutant parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome, *J. Biol. Chem.* 277: 28572-28577.
- Hwang C, Sinskey A, Lodish H (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257: 1496-1502.
- Iqbal A, Paviani V, Moretti A, Laurindo F & Augusto O (2014) Oxidation, inactivation and aggregation of protein disulfide isomerase promoted by the bicarbonate-dependent peroxidase activity of human superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 557: 72-81.
- Jiang Z, Hu Z, Zeng L, Lu W, Zhang H, Li T & Xiao H (2011) The role of the Golgi apparatus in oxidative stress: is this organelle less significant than mitochondria? *Free Rad. Biol. Med.* 50: 907-917.
- Karademir B, Corek C & Ozer N (2015) Endoplasmic reticulum stress and proteasomal system in amyotrophic lateral sclerosis. *Free Rad. Biol. Med.* 88: 42-50.
- Karplus P & Shulz G (1989) Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: substrate crystal structures at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 210: 163-180.
- Kalinina E V, Chernow N & Novichkova E (2014) Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox dependent processes. *Biochemistry* 79: 1562-1583.
- Kemp M, Go YM & Jones D (2007) Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: A perspective on redox systems biology. *Free Rad. Biol. Med.* 44: 921-937.
- Khanal S & Huang, J (2002) ORP-based oxygenation for sulfide control in anaerobic treatment of high-sulfate wastewater. *Water Res.* 37: 2053-2062.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Mizuno Y, & Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism, *Nature.* 392: 605-608.
- Kolossov V, Hanafin W, Beaudoin J, Bica D, DiLiberto S, Kenis P & Gaskins H (2014) Inhibition of glutathione synthesis distinctly alters mitochondrial and cytosolic redox poise, *Exp. Biol. Med.* 239: 394-403.

# Artículos

- Kolossov V, Beaudoin J, Ponnuraj N, DiLiberto S, Hanafin W, Kenis P & Gaskins H (2015) Thiol-based antioxidants elicit mitochondrial oxidation via respiratory complex III. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 309: C81-C91.
- Kosower N, Kosower E & Wertheim B (1969) Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 37: 593-596.
- Krishnan K, Reeve A, Samuels D, Chinner P, Blackwood J, Taylor R, Wanrooij S, Spelbrink J, Lightowlers R & Turnbull D (2008). What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat. Genet.* 40(3): 275-279.
- Kurz T, Eaton J & Brunk U (2010) Redox Activity Within the Lysosomal Compartment: Implications for Aging and Apoptosis, *Antioxid. Redox Signal.* 13: 511-523.
- Laurindo F, Pescatore L & Fernandes D (2012) Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Rad. Biol. Med.* 52: 1954–1969.
- Lee T, Chang Y, Chung B & Park Y (1998) Correlation of redox potential with state variables in cultures under controlled dissolved oxygen concentration and pH. *Biotechnol. Prog.* 14: 959-962.
- Li J, Jiang M, Chen K, Ye Q, Shang L, Wei P, Ying H & Chang H (2010) Effect of redox potential regulation on succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33:911–920.
- Lin Y, Chien W & Duan K (2010) Correlations between reduction–oxidation potential profiles and growth patterns of *Saccharomyces cerevisiae* during very-high-gravity fermentation. *Process Biochem.* 45: 765–770.
- Magnani M & Accorsi A (1993) The female longevity phenomenon. Hypotheses on some molecular and cell biology aspects. *Mech. Ageing Dev.* 72: 89-95.
- Maroz A, Anderson R, Smith R & Murphy M (2009) Reactivity of ubiquinone and ubiquinol with superoxide and the hydroperoxyl radical: implications for in vivo antioxidant activity. *Free Rad. Biol. Med.* 46:105–109.
- Meneses-Acosta A, Gómez A & Ramírez OT (2012) Control of redox potential in hybridoma cultures: effects on MAb production, metabolism and apoptosis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39: 1189-1198.
- Mesecke N, Spang A, Deponte M & Herrmann J (2008) A Novel Group of Glutaredoxins in the cis-Golgi Critical for Oxidative Stress Resistance. *Mol. Biol. Cell* 19: 2673–2680.
- Miwa S, Riyahi K, Partridge L & Brand M (2004) Lack of correlation between mitochondrial reactive oxygen species production and life span in *Drosophila*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019: 388-391.
- Nyquist S, Barr R & Morré D (1970) Ubiquinone from rat liver Golgi apparatus fractions. *Biochim. Biophys. Acta.* 208: 532-534.
- Okumura M, Kadokura H & Inaba K (2015) Structures and functions of protein disulfide isomerase family members involved in proteostasis in the endoplasmic reticulum. *Free Rad. Biol. Med.* 83: 314-322.
- Payne B & Chinnery P (2015) Mitochondrial



# Artículos

- dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *Biochim. Biophys. Acta* 1847: 1347–1353.
- Pluschkell S & Fickinger M (1996) Improved methods for investigating the external redox potential in hybridoma cell culture. *Cytotechnol.* 19: 11-26.
- Ranjan M, Gruber J, Ng L & Halliwell B (2013) Repression of the mitochondrial peroxiredoxin antioxidant system does not shorten life span but causes reduced fitness in *Caenorhabditis elegans*. *Free Rad. Bio. Med.* 63: 381-389.
- Rebrin I & Sohal R (2004). Comparison of thiol redox state of mitochondria and homogenates of various tissues between two strains of mice with different longevities. *Exp. Gerontol.* 39: 1513–1519.
- Rigobello M, Folda A, Scutari G & Bindoli A (2005) The modulation of thiol redox state affects the production and metabolism of hydrogen peroxide by heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 441: 112–122.
- Ritcher C (1995) Oxidative Damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int. J. Biochem. Cell B.* 27(7): 647-653.
- Rosenwasser S, Rot I, Meyer A, Feldman L, Jiang K & Friedman H (2010) A fluorometer-based method for monitoring oxidation of redox-sensitive GFP (roGFP) during development and extended dark stress *Physiol. Plantarum* 138: 493–502.
- Sanz A, Hiona A, Kujoth G, Seo A, Hofer T, Kouwenhoven E, Kalani R, Prolla T, Barja G & Leeuwenburgh C (2006) Evaluation of sex differences on mitochondrial bioenergetics and apoptosis in mice. *Exp. Gerontol.* 42: 173–182
- Scialo F, Mallikarjun V, Stefanatos R & Sanz A (2013). Regulation of Lifespan by the Mitochondrial Electron Transport Chain: Reactive Oxygen Species-Dependent and Reactive Oxygen Species-Independent Mechanisms. *Antiox. Redox Signal.* 19: 1953-1969.
- Schwarzländer M, Fricker M, Müller C, Marty L, Brach T, Novak J, Sweetlove L, Hell R & Meyer A (2008) Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells, *J. Microsc.* 231: 299–316.
- Sheu D, Duan K, Jou S, Chen Y & Chen C (2003) Production of xylitol from *Candida tropicalis* by using an oxidation-reduction potential-stat controlled fermentation. *Biotechnol. Let.* 25: 2065–2069.
- Sies H (1982) Metabolic Compartmentation. Academic Press, Toronto pp. 205–231.
- Siegel G, Ermilov E, Pries A, Winkler K, Schmidt A, Ringstad L, Malmsten M & Lindman B (2014) .significance of lipid peroxidation in cardiovascular disease. *Colloid. Surface. A.* 442: 173–180.
- Thorpe C, Hooper K, Rajee S, Glynn N, Burnside J, Turi G & Coppock D (2002) Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Arch. Biochem. Biophys.* 405: 1–12.
- Vanoevelen J, Dode L, Baelen K, Fairclough R, Missiaen L, Raeymaekers L & Wuytack F (2005) The Secretory Pathway Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-ATPase 2 Is a Golgi-localized Pump with High Affinity for Ca<sup>2+</sup> Ions. *J. Biol. Chem.* 280: 22800–22808.