



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

# **ANÁLISIS COMPARATIVO DE CÉLULAS HEK293 EN CULTIVO Y PRODUCCIÓN DE ADENOVIRUS**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO

**ADRIANA FRANCISCA LÓPEZ CASTRO**

**PROFESOR GUÍA**

ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN**

JUAN ASENJO DE LEUZE

BARBARA ANDREWS FARROW

SANTIAGO DE CHILE

ABRIL 2010

## Resumen

El avance en la investigación en terapia génica durante los últimos años ha generado interés en la construcción y producción de vectores virales, siendo actualmente los adenovirus los más utilizados en ensayos clínicos de terapia génica. Para satisfacer la demanda de estos vectores, es necesaria su producción a gran escala. Debido a esto, la caracterización del crecimiento de las células de riñón de embrión humano (HEK293) es de gran importancia para la identificación de factores que permitan la optimización de las condiciones de producción y una mejora en el rendimiento en la producción de adenovirus.

En este trabajo se realizó una comparación del estado metabólico y del nivel de proteínas para cultivos de células HEK293 durante el crecimiento y producción de adenovirus.

Se determinaron los parámetros de crecimiento para células creciendo adheridas en medio suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y para células adaptadas a crecer en un medio bajo en suero, suplementado con 0,5% de SFB, 40 [mg/L] de albúmina de suero bovino (BSA) e intralípidos al 0,01 [%v/v]. Las células adaptadas a crecer en el medio bajo en suero alcanzaron una concentración celular de  $2 \times 10^6$  [cel/mL], comparable al caso base, logrando un crecimiento uniforme usando placas cebadas. En el caso de células creciendo adheridas, se observó que al consumirse completamente la glucosa éstas comenzaban a consumir lactato como fuente alternativa de carbono. Esto significó una extensión en la mantención del cultivo tanto en medio bajo en suero como en medio suplementado con 10% de SFB.

Se adaptaron células a crecer en suspensión en spinners con medio bajo en suero suplementado con Pluronic F-68 y antiaglomerante, alcanzando una concentración de  $1 \times 10^6$  [cel/mL]. Esta concentración es un 48% inferior a la obtenida creciendo adheridas, presentando además tasas de consumo de glucosa y producción de lactato un 71% y 76% menores, respectivamente.

Durante la producción de adenovirus se registraron mayores tasas de consumo de glucosa y producción de lactato que las alcanzadas en el crecimiento, sin presentar un aumento de biomasa. Esto indica un cambio en el metabolismo celular durante la producción de adenovirus. Al mismo tiempo se observó una disminución de la viabilidad celular producto de la acción lítica del adenovirus. La mayor producción de virus se alcanzó en células creciendo adheridas en medio con 10% de SFB con un título de  $1,6 \times 10^{13}$  [pfu/mL] a las 48 [hpi].

A través de un ensayo de ELISA intracelular se cuantificaron enzimas claves del metabolismo del carbono, siendo las enzimas estudiadas: *Fosfofructoquinasa* (PFK), *Piruvato deshidrogenasa* (PDH), *Lactato deshidrogenasa* (LDH), y  *$\alpha$ -Ketoglutarato deshidrogenasa* ( $\alpha$ -KGD). Se comparó la cantidad de enzimas entre células creciendo en medio suplementado con 10% y 0,5% de SFB, tanto para el estado de crecimiento como para la producción de adenovirus. Se obtuvo diferencias significativas sólo en caso de la LDH, siendo el nivel de esta enzima mayor durante el crecimiento en el cultivo suplementado con 10% de SFB, siendo también el nivel de LDH mayor en la producción de adenovirus en comparación al crecimiento con 0,5% de SFB. Estos resultados fueron contrastados con los obtenidos a través del Análisis de Flujo Metabólico (MFA), para las vías en que participan dichas enzimas, encontrando una concordancia en el comportamiento en las condiciones comparadas, ya que el aumento en la producción de lactato en el crecimiento en medio con 10% de SFB responde a una mayor cantidad de LDH. En la producción de adenovirus el aumento del lactato sería producto de la lisis celular y no de un aumento de la LDH.

Finalmente los resultados obtenidos permitirán un mejor entendimiento del comportamiento de células HEK293, y de sus requerimientos nutricionales en cultivo y producción de adenovirus.

## Agradecimientos

A mis padres, por insistir en tener una niñita

A mi tía Pele por su amor a las cosas vivas, incluida su sobrina

A mis hermanos Iván y Claudio, por enseñarme a cambiar la rueda del auto, jugar paletas, cómo sobrevivir a un ataque de cosquillas y otras cosas importantes

A mis amigas del colegio, Vero, Sando, Lore, Villa por creer siempre en mí y darme parte de los momentos más cómicos de mi vida

A mis amigos de la U, Rafa, Carlos, Tadashi, por estar conmigo todos estos años y en especial esos primeros años en que todo se veía tan lejano

A Jaime que desde primer año ha tratado de evangelizarme sin lograrlo

A mis compañeros de carrera por acompañarme estos últimos años: Marce, Ale, Jano, Mary, Cata, Nonoy, Carola, Maurice. En especial a Chicho por darme su apoyo, compañía y contarme chistes para sobrevivir esas eternas noches de escritura

A Sergio por toda la ayuda prestada durante la memoria, sin su ayuda no habría tenido ni células con las que trabajar, y por tener un bigote gracioso, grande bonsái

A Camila por ser mi guía y compañera en el solitario laboratorio de cultivo

A mis profesores Dra. Ziomara Gerdtzen, Dra. Barbara Andrews y Dr. Juan Asenjo, por permitirme trabajar en el laboratorio, por su ayuda y comprensión

A la Dra. Casilda Mura por la ayuda, consejos y apoyo que me entregó en este tiempo

Al Instituto de Dinámica Celular y Biotecnología por hacer posible la realización de este trabajo

A los valientes que hacen sus tesis y memorias en el laboratorio, ánimo!

A Ana, por los buenos tiempos

A Mónica, no sé por qué, pero debo nombrarla

A Yigo por quererme, apoyarme y soportarme todos estos años, y ser un hogar para mí

## Abreviaturas

Abreviatura	Significado
<b><math>\alpha</math>-KGD</b>	$\alpha$ -Ketoglutarato deshidrogenasa
<b>APO</b>	Apotransferrina
<b>ATCC</b>	Colección Americana de cultivos tipo
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>GMP</b>	Buenas prácticas de manufactura (del inglés <i>Good manufacturing practice</i> )
<b>HEK293</b>	Línea celular de riñón de embrión humano
<b>hpi</b>	Horas post-infección
<b>ILip</b>	Intralípidos
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>MOI</b>	Multiplicidad de Infección (del inglés <i>Multiplicity of infection</i> )
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino (de inglés <i>Phosphate buffered saline</i> )
<b>PFK</b>	Fosfofructoquinasa (del inglés <i>Phosphofructokinase</i> )
<b>pfu</b>	Unidades formadoras de placa (del inglés <i>plaque-forming unit</i> )
<b>PDH</b>	Piruvato deshidrogenasa
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>T-25</b>	t-flask de 25 [cm <sup>2</sup> ] de superficie
<b>T-75</b>	t-flask de 75 [cm <sup>2</sup> ] de superficie
<b>TCA</b>	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

## Índice de contenidos

Resumen .....	ii
Agradecimientos.....	ii
Abreviaturas .....	iii
Índice de contenidos .....	v
Índice de figuras .....	viii
Índice de tablas.....	x
1. Introducción .....	1
1.1. Antecedentes generales .....	1
1.2. Marco teórico .....	3
1.2.1. Cultivo celular .....	3
1.2.2. Cultivo de células animales .....	5
1.2.3. Producción de Adenovirus.....	8
1.2.4. Medios de cultivo .....	11
1.2.5. Metabolismo celular.....	13
1.3. Descripción del proyecto y justificación .....	16
1.4. Objetivos .....	18
1.4.1. Objetivos generales .....	18
1.4.2. Objetivos específicos .....	18
1.5. Alcances .....	19
2. Materiales y Métodos .....	20
2.1. Materiales .....	20
2.1.1. Células.....	20
2.1.2. Adenovirus.....	20
2.1.3. Medio de cultivo.....	20

2.1.4.	Reactivos adicionales para suplementación del medio de cultivo .....	21
2.2.	Métodos.....	22
2.2.1.	Metodología general .....	22
2.2.2.	Descongelamiento de células HEK293 .....	24
2.2.3.	Desarrollo de Banco de células HEK293 .....	24
2.2.4.	Caracterización del estado metabólico de células creciendo adheridas con 10% SFB (caso base).....	24
2.2.5.	Adaptación a crecimiento en medio bajo en SFB.....	25
2.2.6.	Implementación de placas cebadas para células creciendo adheridas con medio bajo en SFB.....	26
2.2.7.	Adaptación a crecimiento en suspensión en Spinner .....	26
2.2.8.	Caracterización de células creciendo en suspensión en Spinner .....	27
2.2.9.	Amplificación de Adenovirus.....	27
2.2.10.	Titulación del stock de Adenovirus.....	28
2.2.11.	Infección de cultivo adaptado a suspensión.....	28
2.2.12.	Medición de Niveles de Proteínas Intracelulares .....	29
2.2.13.	Análisis estadístico .....	29
3.	Resultados y Discusión .....	30
3.1.	Desarrollo de Banco de células HEK293 .....	30
3.2.	Estado metabólico células creciendo adheridas al 10% SFB .....	30
3.3.	Adaptación a cultivo libre de suero .....	33
3.4.	Cultivo en placas cebadas de células creciendo adheridas en medio bajo en suero.....	34
3.5.	Estado metabólico células creciendo adheridas con 0,5% SFB .....	36
3.6.	Adaptación a crecimiento en suspensión.....	40
3.7.	Estado metabólico células creciendo en suspensión con 0,5% SFB.....	43
3.8.	Amplificación de Adenovirus .....	46
3.9.	Caracterización de infección de cultivos creciendo en adhesión.....	47

3.10.	Infección de cultivo en suspensión .....	55
3.11.	Medición de Niveles de Enzimas claves del metabolismo del carbono.....	58
4.	Conclusiones.....	64
5.	Referencias .....	66
6.	Anexos.....	68
6.1.	Protocolos .....	68
6.1.1.	Preparación de reactivos y suplementos utilizados.....	68
6.1.2.	Protocolo de descongelamiento de células desde nitrógeno líquido.....	71
6.1.3.	Protocolo de pasaje celular (subcultivo) .....	71
6.1.4.	Protocolo de congelamiento celular .....	73
6.1.5.	Protocolo de cálculo de concentración celular y viabilidad para células creciendo adheridas.....	73
6.1.6.	Protocolo placas cebadas .....	74
6.1.7.	Protocolo de subcultivo de células en suspensión.....	75
6.1.8.	Protocolo de cálculo de concentración celular y viabilidad para células creciendo en suspensión.....	76
6.1.9.	Protocolo Propagación de Adenovirus (protocolo modificado por C. Mura PhD)..	77
6.1.10.	Titulación.....	78
6.1.11.	Protocolo de infección en T-25.....	79
6.1.12.	Protocolo de infección para células en suspensión.....	79
6.1.13.	Protocolo de cuantificación de Glucosa. ....	80
6.1.14.	Protocolo de cuantificación de Lactato. ....	80
6.1.15.	Protocolo medición proteínas intracelulares .....	81

## Índice de figuras

Figura 1: Métodos de cultivo.....	7
Figura 2: Esquema de la replicación adenoviral .....	8
Figura 3: Distintos tipos de vectores adenovirales.....	9
Figura 4: Resumen de la metodología utilizada en el trabajo experimental. ....	22
Figura 5: Curva de crecimiento de células HEK293 creciendo adheridas en medio al 10% SFB... 30	
Figura 6: Perfiles de Glucosa y Lactato de células HEK293 creciendo adheridas en medio al 10% SFB. ....	31
Figura 7: A: Tasas específicas de consumo de glucosa y de producción de lactato. B: Razón entre la tasa de producción de lactato y la tasa de consumo de glucosa para células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado al 10% SFB. ....	32
Figura 8: Comparación del crecimiento de células HEK293 en medio bajo en suero en placas cebadas versus sin tratamiento.....	34
Figura 9: Curva de crecimiento de células HEK293 creciendo adheridas en medio al 0,5% SFB.. 36	
Figura 10: Perfiles de Glucosa y Lactato de células HEK293 creciendo adheridas en medio con 0,5% SFB .....	37
Figura 11: A: Tasas específicas de consumo de glucosa y de producción de lactato. B: Razón entre la tasa de producción de lactato y la tasa de consumo de glucosa para células HEK293 creciendo adheridas en medio bajo en suero.....	38
Figura 12: Prueba de adición de suplementos a cultivo en suspensión en spinner con 0,5% de SFB. ....	41
Figura 13: Curva de crecimiento de células HEK293 creciendo en suspensión en spinner en medio al 0,5% SFB.....	43
Figura 14: Perfiles de Glucosa y Lactato de células HEK293 creciendo en suspensión en spinner en medio bajo en suero.....	44



Figura 15: A: Tasas específicas de consumo de glucosa y de producción de lactato. B: Razón entre la tasa de producción de lactato y la tasa de consumo de glucosa para células HEK293 creciendo en suspensión en spinner en medio bajo en suero.....	45
Figura 16: Curva de infección de células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado con 10% SFB. La infección se realizó a las 72 horas de cultivo. ....	47
Figura 17: Perfiles de glucosa y lactato para infección de células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado con 10% SFB. ....	48
Figura 18: A: Tasas específicas de consumo de glucosa y de producción de lactato. B: Razón entre la tasa de producción de lactato y la tasa de consumo de glucosa para infección células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado al 10% SFB.....	49
Figura 19: Curva de producción de adenovirus en células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado al 10% SFB. ....	50
Figura 20: Curva de infección de células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado con 0,5% SFB.....	51
Figura 21: Perfil de glucosa y lactato para infección de células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado con 0,5% SFB. ....	52
Figura 22: A: Tasas específicas de consumo de glucosa y de producción de lactato. B: Razón entre la tasa de producción de lactato y la tasa de consumo de glucosa para infección de células HEK293 creciendo adheridas en medio bajo en suero. ....	52
Figura 23: Curva de producción de adenovirus en células HEK293 creciendo adheridas en medio bajo en suero. ....	54
Figura 24: Curva de infección de células HEK293 creciendo en suspensión en spinner con medio suplementado con 0,5% SFB. ....	55
Figura 25: Perfil de glucosa y lactato para infección de células HEK293 creciendo en suspensión en spinner en medio suplementado con 0,5% SFB. ....	56
Figura 26: A: Tasas específicas de consumo de glucosa y de producción de lactato. B: Razón entre la tasa de producción de lactato y la tasa de consumo de glucosa para infección de células HEK293 creciendo en suspensión en spinner en medio bajo en suero. ....	56

Figura 27: Comparación de niveles de enzima para células creciendo en medio suplementado al 0,5% SFB y 10% SFB .....	59
Figura 28: Comparación flujo de carbono entre células creciendo en medio libre de suero y a 10% SFB. ....	59
Figura 29: Análisis de Flujo de Metabólico para células en estado de crecimiento y en producción de Adenovirus cultivadas en spinner en medio 0% SFB.....	61
Figura 30: Comparación de enzimas para células en medio suplementado al 0,5% SFB en crecimiento y en producción de Adenovirus.....	62
Figura 31: Comparación flujo de carbono para células en medio libre de suero en crecimiento y en producción de Adenovirus.....	63

## Índice de tablas

Tabla 1: Compuestos utilizados en la formulación de medio libre de suero y su función.....	12
Tabla 2: Formulación medio 2.0. ....	20
Tabla 3: Resumen parámetros y resultados obtenidos para células creciendo adheridas.....	39
Tabla 4: Resultados titulación adenovirus. ....	46
Tabla 5: Resumen cuantificación producción adenovirus en células HEK293. ....	53
Tabla 6: Resumen parámetros y resultados obtenidos para la producción de adenovirus en células creciendo en suspensión. ....	57
Tabla 7: Diluciones de Anticuerpo primario utilizadas.....	58

## 1. Introducción

### 1.1. Antecedentes generales

Los avances en ciencia, tecnología y el desarrollo de enfoques multidisciplinarios tales como la biotecnología han repercutido en distintas áreas como la agricultura, minería, industria alimentaria, acuicultura, tratamiento de efluentes industriales y domiciliarios, biorremediación y muchas otras. Dentro de ellas, una de las áreas en que ha tenido un mayor impacto para la calidad de vida de la población es la medicina, realizando importantes aportes tanto en el diagnóstico de enfermedades, como en la industria farmacéutica, en el desarrollo de proteínas recombinantes, vacunas más seguras, producción de antibióticos, terapias regenerativas y terapia génica.

La terapia génica es una potencial arma para combatir enfermedades, ya sean estas hereditarias o adquiridas, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares o incluso infecciosas, siendo la terapia contra el cáncer una de las aplicaciones más estudiada [1, 2].

La terapia génica se define como la administración de material genético, por lo general genes funcionales, con el fin de modificar o manipular la expresión de ciertos genes, complementando deficiencias genéticas o expresando un fenotipo deseado (por ejemplo, apoptosis en células cancerosas) que presenta propiedades terapéuticas [3].

Para introducir el gen terapéutico en las células del paciente es necesario un vector que lo transporte. Actualmente los adenovirus son los vectores más usados, estando presentes en el 23,9% de las investigaciones y ensayos clínicos de terapia génica que se realizan a la fecha<sup>1</sup>.

Entre las ventajas de los adenovirus se encuentra que aceptan fragmentos de DNA extensos, de alrededor de 7,5 kb, infectando células que se encuentran en división así como también las que no se están dividiendo. Otra de sus ventajas es que no integran su genoma a la célula huésped, como sucede en el caso de los retrovirus los cuales además del nuevo gen integran su material

---

<sup>1</sup> <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>, actualizado Diciembre 2009.

genético en los cromosomas del individuo tratado, infectando sólo células en división, siendo el segundo vector más usado, en 20,8% de los ensayos clínicos.

Las células HEK293 corresponden a una línea celular obtenida a partir de células embrionarias de riñón humano, las cuales cuentan con el gen adenoviral E1 integrado en su genoma. Debido a esto las células son complementarias con los adenovirus utilizados en terapia génica, ya que estos carecen de dicho gen, el cual es esencial para la replicación del virus [4].

Para satisfacer la demanda de estos vectores, es necesaria su producción a gran escala, ya que se necesitan del orden de  $1 \times 10^{12}$ - $1 \times 10^{13}$  [pfu] para infectar un tejido. Suponiendo que se logra purificar  $10^{11}$  [pfu/L], se necesitarían cultivos de 10-100 [L] para lograrlo [5]. Por lo que la caracterización de los cultivos y la identificación de parámetros relevantes, que permitan desarrollar medios y condiciones de cultivo óptimas para las distintas etapas de crecimiento y producción de adenovirus, es de vital importancia para alcanzar dicho propósito.

Entre los factores estudiados en la literatura se encuentra la producción de metabolitos secundarios y la acumulación de éstos, algunos de los cuales tienen efectos inhibitorios sobre el crecimiento y/o la producción de adenovirus. Para lo cual se ha caracterizado el estado metabólico de las células y se han utilizado herramientas como el análisis de flujos metabólicos, con el fin de determinar los requerimientos nutricionales de éstas y satisfacerlos limitando la formación de subproductos.

Se han comparado además distintas formas de cultivo en suspensión y utilizando microcarriers, operados de modo batch, fed-batch y en perfusión para obtener una mayor productividad de cultivos [6, 7].

Otro aspecto a considerar para la producción de adenovirus y el aumento de la productividad, es la fase de crecimiento en la cual se encuentran las células al momento de infectar y la concentración celular en dicho momento. Siendo mayor la producción de adenovirus cuando las células son infectadas en la fase S de crecimiento [8]. Mientras que la productividad disminuye al infectar las células cuando se encuentran a una concentración sobre  $1 \times 10^6$  [cel/mL], debido al llamado “efecto de densidad celular”, usualmente atribuido a la limitación de nutrientes y/o a la acumulación de subproductos, por lo que se recomienda el cambio de medio durante la infección con adenovirus o la adición de glucosa y aminoácidos [9, 10, 11].

## 1.2. Marco teórico

### 1.2.1. Cultivo celular

El cultivo celular es el proceso por el cual células procariontes, eucariontes o de plantas se cultivan y crecen bajo condiciones controladas. En la práctica el término “cultivo celular” hace referencia al cultivo de células derivadas de eucariontes pluricelulares, en especial de células animales. El proceso de cultivo permite que las células se comporten como entidades independientes, más parecido a un microorganismo como bacterias u hongos. Siendo las células capaces de dividirse, aumentar su tamaño y, en el caso de cultivo batch, seguir creciendo hasta ser limitadas por alguna variable del cultivo, como el agotamiento de un nutriente.

Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido y su grado de diferenciación, o de su capacidad de proliferación y del tiempo de su duración se distinguen los siguientes tipos de cultivo:

**Cultivo de órganos:** Cultivo de tejido íntegro que retiene las propiedades histológicas del tejido in vivo, manteniendo parcialmente su organización tridimensional. Los diferentes tipos de células que componen el órgano se mantienen en su forma diferenciada, constituyendo una buena réplica del órgano original. Pero, sin embargo, generalmente no permite la propagación, ya que el crecimiento de células se produce únicamente en la periferia. Además este tipo de cultivo es difícil de mantener durante un tiempo prolongado debido a las diferencias de crecimiento de los distintos tipos celulares que constituyen el órgano, por lo que para repetir el experimento se necesita nuevo material, produciendo una alta heterogeneidad de las muestras.

**Explantos primarios:** Constituidos por fragmentos de tejidos u órganos que se adhieren a una superficie, proliferando las células más periféricas del explante. El cultivo se denomina primario cuando las células o tejidos provenientes de un ser vivo crecen sin haber pasado previamente por una fase de crecimiento *in vitro*. Un cultivo se denomina cultivo secundario cuando procede de una fase previa de crecimiento *in vitro*.

**Cultivo Celular:** Cultivo de células derivado de células desagregadas mediante métodos mecánicos, químicos o enzimáticos y que han sido aisladas de un tejido donante, un cultivo primario, o de una línea celular. Las células crecen en suspensión o adheridas a una superficie. Generalmente son cultivos que contienen un único tipo de célula y éstas suelen ser homogéneas genéticamente al predominar las células con mayor tasa de crecimiento. Es el tipo

de cultivo más utilizado en la actualidad debido a su capacidad de propagación, es decir de crecimiento mantenido, como por su reproducibilidad.

Existen múltiples aplicaciones en las cuales son utilizados los cultivos de células animales, debido a las ventajas que presentan sobre otro tipo de cultivos, como es la consistencia y reproducibilidad de los resultados que pueden ser obtenidos. Aunque también presentan desventajas, a causa de su larga duración y de la adaptación a diferentes condiciones de cultivo (por ejemplo, diferentes nutrientes, temperatura, concentración de sales, etc.), por lo que ciertas características celulares pueden cambiar con el tiempo.

Dentro de las posibles aplicaciones se encuentran las siguientes:

- Investigación de la fisiología o bioquímica normal de células. Para ser utilizado en estudios del metabolismo celular.
- Para probar el efecto de variados compuestos químicos o drogas en tipos de células específicos (por ejemplo, células normales o cancerosas).
- Para estudiar la combinación de una variedad de tipos celulares para generar tejidos artificiales, por ejemplo piel artificial. La generación de tejido artificial es una emergente y muy estudiada área de la biotecnología, conocida como “ingeniería de tejidos”.
- Síntesis de valiosos compuestos biológicos en cultivos a gran escala. El amplio rango de productos biológicos incluye proteínas específicas o de virus que requieren de células animales para su propagación. Por ejemplo, proteínas terapéuticas pueden ser sintetizadas en grandes cantidades creciendo células genéticamente modificadas en cultivos a gran escala. El número de dichos compuestos biológicos de interés comercial se ha incrementado rápidamente en la última década y ha llevado al actual incremento del interés en la tecnología de cultivo celular.

La importancia del uso de células animales en la producción de proteínas recombinantes es que éstas realizan las modificaciones post-traduccionales en las proteínas (glicosilación, fosforilación, acetilación, formación de uniones disulfuro, entre otras), las cuales permiten su correcto plegamiento y funcionalidad. Estas modificaciones no son realizadas por los sistemas microbianos, en donde además se presenta el problema de que las proteínas son producidas desnaturalizadas formando cuerpos de inclusión, dificultando su separación y añadiendo etapas posteriores de renaturación.

### 1.2.2. Cultivo de células animales

El cultivo de células animales fue concebido a comienzos del siglo XX como un método para estudiar el comportamiento de células animales libre de variaciones sistémicas producidas *in vivo* bajo condiciones normales y/o bajo el estrés de un experimentos [12].

El desarrollo del cultivo de células de vertebrados se inició con las observaciones de Wilhelm Roux, quien en 1885 logró cultivar células de embrión de pollo en solución salina durante unos días. Posteriormente en 1907, Ross Harrison cultivó tejido nervioso de rana, mostrando que las funciones celulares normales pueden continuar *in vitro*. Debido a esto 1907 se considera como el año que marca el comienzo del cultivo celular [13].

En 1910 Burrows introduce la utilización de plasma de pollo, reemplazando a la solución salina. Posteriormente Carrel en 1912, aplicó esta técnica, mostrando que las células pueden crecer por largos periodos de tiempo si el cultivo se alimenta regularmente bajo condiciones de asepsia.

Durante las siguientes cuatro décadas, el progreso del cultivo de células estuvo limitado debido al estricto control de esterilidad necesario. El desarrollo de antibióticos a finales de la década de los 40s fue de gran ayuda. La adición de antibióticos facilitó la manipulación de medios de cultivo complejos no definidos. Al mismo tiempo, se llevó a cabo el desarrollo de técnicas estériles. Durante la siguiente década, grandes progresos se realizaron dirigidos hacia el cultivo masivo de células animales y los procesos de producción.

En 1952, George Gey estableció la primera línea celular derivada de un carcinoma cervical de origen humano, la cual fue nombrado HeLa (el nombre de la paciente era Henrietta Lacks).

En la segunda mitad del siglo XX una serie de innovaciones como el desarrollo de medios de cultivo (Eagle, 1955), las técnicas de tripsinización para el pasaje de células (Moscona y Moscona, 1952) y la suplementación del medio con suero fetal bovino, permitieron el desarrollo y establecimiento de los cultivos de células animales.

El descubrimiento de mayor importancia hacia el cultivo a gran escala fue realizado por Earle y Eagle, quienes hicieron un análisis extensivo de los requerimientos de células *in vitro*. En 1955, Eagle reportó un medio químicamente definido conocido como EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium), el cual podía reemplazar los fluidos biológicos usados hasta ese momento.

Sin embargo, los requerimientos celulares para el crecimiento no eran alcanzados hasta la adición de 5% a 10% de suero sanguíneo. El suero proveniente de animales jóvenes o de fetos se descubrió que eran particularmente eficaces.

El empleo de técnicas de fusión celular (Barski, 1960; Littlefield, 1964) estableció las bases de la genética de células somáticas para el análisis de especies animales (incluyendo al hombre). Mientras que en los años 70, con el desarrollo de la tecnología del ADN, se empezaron a utilizar células animales como vehículos de expresión para proteínas recombinantes. En 1975 Kohler y Milstein generaron los primeros anticuerpos monoclonales, lo cual ha sido de importancia para estudios en inmunología y su aplicación a nivel terapéutico.

En 1976 Sato y colaboradores publicaron sus trabajos en los que demuestran que las diferentes líneas celulares requieren mezclas distintas de hormonas y factores de crecimiento para crecer en medios libres de suero.



### 1.2.2.1. Métodos de cultivo

De acuerdo a su capacidad de adherencia las células pueden ser cultivadas de dos formas:

**Células adherentes:** crecen adheridas a un sustrato sólido formando una monocapa. Existen distintos recipientes para el cultivo de este tipo de células, ejemplo de ello son las placas de Petri, frascos para el cultivo de tejido (t-flasks; T-25, T-75), entre otros, que pueden ser de plástico o de vidrio previamente tratado y su desprendimiento para transferirlas a superficies mayores se realizan con agentes proteolíticos como la tripsina, o de forma mecánica con el uso de rastrillo. También se puede utilizar botellas en rotación (roller bottles), microcarries y reactores de fibra hueca, los cuales incrementan la relación entre área y volumen.

**Células en suspensión:** células hematopoyéticas, células cancerígenas y células dependientes de anclaje que han sido previamente adaptadas a crecer en suspensión. Se crecen en medio líquido en spinner flask, shaker flask y reactores que permiten monitorear y controlar las variables de cultivo.

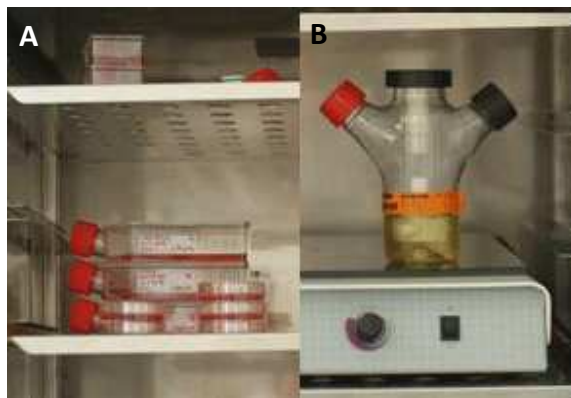


Figura 1: Métodos de cultivo. A) Células en adhesión creciendo en T-75 y placas de Petri. B) Células en suspensión creciendo en spinner.

### 1.2.3. Producción de Adenovirus

Los adenovirus son los vectores virales más usados en la actualidad, estando presentes en el 23,9% de las investigaciones y ensayos clínicos de terapia génica que se realizan a la fecha.

En 1953 Rowe describió por primera vez al adenovirus, mientras intentaban establecer cultivos celulares de amígdalas y tejido adenoideo. Rowe reconoció que un agente transmisible estaba destruyendo a las células epiteliales. Este causa enfermedades del tracto respiratorio, sin embargo dependiendo del serotipo infectante, puede causar otras enfermedades como gastroenteritis, conjuntivitis, cistitis, hepatitis y sarpullido.

El adenovirus es un virus que se caracteriza por no poseer cubierta externa. Se compone de una cápside icosaédrica constituida por 252 capsómeros, (240 capsómeros hexagonales o hexonas y 12 capsómeros pentagonales o pentonas) y a partir de la base de las pentonas se proyectan fibras. Poseen un núcleo que contiene el genoma lineal de doble hebra y 4 proteínas internas que estabilizan el material genético. La infección comienza con la unión de las fibras pentonas a un receptor celular CAR (del inglés *coxsackievirus and adenovirus receptor*), seguido por la interacción de la base pentona con las proteínas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$  de la familia de las integrinas. Después de la endocitosis mediada por receptor, el virus escapa del compartimiento endosomal hacia el citosol alcanzando el núcleo, comenzando la transcripción y la replicación viral [14].

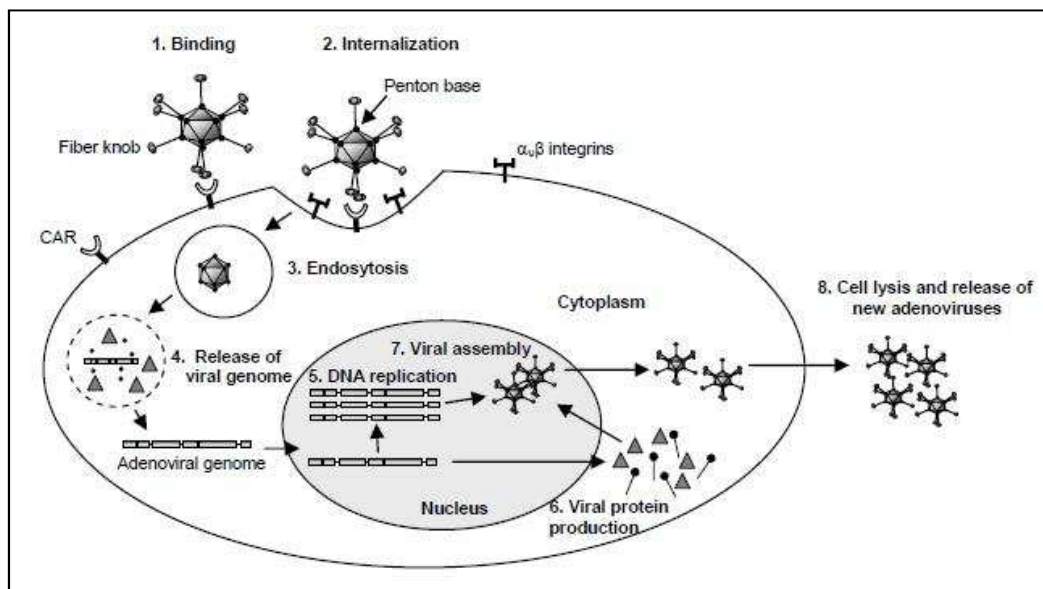


Figura 2: Esquema de la replicación adenoviral [15].

El genoma adenoviral tiene un largo aproximado de 36 kb, desarrollándose a lo largo de los años varios métodos para manipular el genoma viral. Actualmente tres tipos de vectores adenovirales se encuentran en desarrollo para su utilización en terapia génica (ver Figura 3).

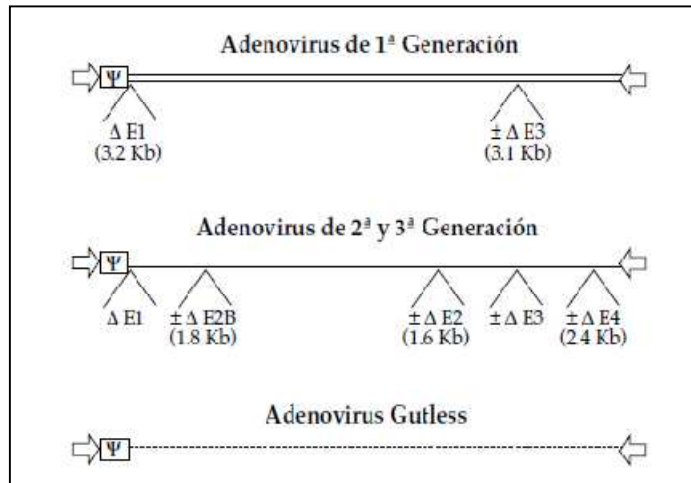


Figura 3: Distintos tipos de vectores adenovirales. Las flechas representan los ITRs y Ψ la secuencia de encapsidación. Modificado de [16].

Los vectores de primera generación tienen deletionadas las regiones E1 y/o E3, pudiendo albergar genes de hasta 7-8 kb en el caso de los vectores a los cuales se les han deletado ambas regiones, siendo hasta hoy los más utilizados en terapia génica. La región E1 codifica proteínas necesarias para la expresión de otros genes tempranos o tardíos. Ya que los productos de E1 son necesarios para el crecimiento del virus, estos deben ser provistos *in trans* en líneas celulares específicas, tales como HEK293 o PER.C6®. Mientras que la región E3 codifica productos que contrarrestan los mecanismos de defensa del hospedero; estos productos no son esenciales para la replicación *in vitro* del adenovirus, por lo que no es necesario utilizar líneas celulares que complementen dicha deficiencia [16]. Para producir los vectores adenovirales es entonces necesario el uso de células empaquetadoras que sean complementarias con el virus, es por eso que se utiliza la línea celular complementaria HEK293.

Los vectores de segunda generación se caracterizan por tener además deletionadas o inactivadas las regiones E2 y/o E4, permitiendo la inserción de genes de 14 kb. Para su

producción se requieren líneas celulares complementarias más sofisticadas, sin alcanzar títulos virales tan altos como en el caso de los vectores de primera generación [17].

Existen además vectores llamados *gutless* o *helper* dependientes, en los cuales el genoma del vector carece de todos los genes virales, conservando sólo las secuencias de los ITR (del inglés, *inverted terminal repeat*) y la secuencia de encapsidación, permitiendo transportar material genético exógeno de hasta 37 kb . Sin embargo, la construcción y producción de estos adenovirus requiere de un adenovirus *helper* que aporte las proteínas virales necesarias *in trans*, el cual debe ser posteriormente separado del vector. La producción es más laboriosa y costosa en comparación a los adenovirus de primera y segunda generación, siendo difícil producir títulos altos de virus y su genoma es, a menudo, inestable.

En general, tres factores determinan la eficiencia de la producción de vectores adenovirales: la naturaleza del vector, la línea celular complementaria usada para la propagación del vector, y el proceso de producción [18]. El efecto de parámetros del proceso, tales como temperatura, pH y pCO<sub>2</sub>, composición del medio y concentración de suero, concentración de células al momento de infección y el modo de operación del cultivo en producción, han sido también reportados extensivamente [19, 20].

Para llevar a cabo ensayos preclínicos y clínicos se requieren adenovirus a altos títulos, junto con la obtención de vectores con una alta pureza. Es necesario además el uso de “buenas prácticas de manufactura” (GMP, *Good Manufacturing Practices*) en la preparación y el testeo de estos vectores adenovirales para su potencial uso terapéutico [21].

#### **1.2.4. Medios de cultivo**

El medio de cultivo provee de nutrientes esenciales, los cuales son incorporados por las células en división. Los componentes básicos del medio son aminoácidos, ácidos grasos, carbohidratos, sales inorgánicas, hormonas, factores de crecimiento, elementos traza, vitaminas y cofactores, todos ellos disueltos en agua. Otros iones y moléculas son necesarios para mantener un ambiente apropiado para las células, como es el caso del bicarbonato, el cual puede ser usado como una fuente de carbonato y también para mantener el pH apropiado y la osmolaridad, actuando como tampón [12, 22].

Además suelen agregarse antibióticos y antimicóticos al medio para impedir la contaminación con microorganismos. Los más utilizados son penicilina, estreptomicina, gentamicina, fungizona y anfotericina-B.

La selección del medio de cultivo a utilizar dependerá del tipo de línea celular que se desea crecer, la aplicación para la cual serán utilizadas y las características del producto a producir.

En cultivos celulares, el suero es utilizado como suplemento del medio de cultivo, ya que aporta diversos nutrientes, factores de crecimiento y de adhesión, hormonas y proteínas a las células [12], componentes esenciales para la proliferación celular. Sin embargo, el suero posee una composición indefinida y varía de un batch a otro. Esto conlleva dificultades en la reproducibilidad de experimentos a pequeña escala y en la mantención del rendimiento de células y su productividad a gran escala. A lo que se suma el alto costo del suero, la posible presencia de contaminantes, dificultosos procesos de separación y purificación del producto, los cuales son de particular cuidado cuando el producto final será utilizado en una terapia inyectable [23]. Debido a esto, se han realizado numerosos intentos de desarrollar medios sin suero que permitan el crecimiento de células in vitro [24]. Encontrándose disponible en el mercado varios definidos, libres de suero o en algunos casos libres de proteínas.

Estos medios de cultivos no son universales, debido a que distintas líneas celulares presentan perfiles metabólicos diferentes. Requiriendo composiciones distintas del medio dependiendo de la línea celular, el modo de cultivo y las condiciones de cultivo a ser utilizadas [25].

El uso de medios libres de suero es de importancia para la producción de adenovirus con la mínima cantidad de contaminantes, los cuales introducen en el sistema agentes que pueden

causar inmunogenicidad y citotoxicidad, que dificultan su posterior purificación para poder ser usados en terapia génica [10, 26].

Los factores esenciales en el suero incluyen:

- 1) Factores de adhesión (fibronectina)
- 2) Péptidos (insulina, PDGF, TGF- $\beta$ , que regulan el crecimiento y diferenciación)
- 3) Nutrientes esenciales (minerales, vitaminas, ácidos grasos, metabolitos intermediarios)
- 4) Hormonas (insulina, hidrocortisona, estrógeno, triiodotironina, que regulan el transporte de membrana, estado fenotípico y la constitución de la superficie celular)

Aunque algunos de estos son provistos en la formulación de medio libre de suero, otros no lo son y requieren ser adicionados y optimizados.

A medida que se disminuye el porcentaje de suero suplementado al medio, se agregan nuevos suplementos con el fin de aportar los nutrientes necesarios para garantizar el crecimiento de las células en esta nueva condición.

En la tabla a continuación, se presentan algunos de los compuestos utilizados en la formulación de medios libres de suero y su función [12, 27].

**Tabla 1: Compuestos utilizados en la formulación de medio libre de suero y su función.**

Compuesto	Función
<b>Bicarbonato de sodio</b>	Tampón
<b>Acido ascórbico</b>	Antioxidante biológico
<b>Putrescina</b>	Factor de crecimiento
<b>Pluronic F68</b>	Surfactante, da protección ante esfuerzos de corte
<b>Etanolamina</b>	Composición membrana plasmática
<b>Selenito de sodio</b>	Micronutriente, cofactor de enzimas dependientes de selenito
<b>Mercaptoetanol</b>	Antioxidante biológico
<b>Apotransferrina</b>	Minerales, elementos traza, transportador de hierro, mitógeno
<b>Penicilina/Estreptomicina</b>	Antibacteriano
<b>BSA</b>	Proteínas
<b>Intralipidos</b>	Lípidos, formación de membrana celular
<b>Dexametasona</b>	Hormona, glucocorticoide
<b>Insulina</b>	Hormona, transporte de glucosa
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento

### 1.2.5. Metabolismo celular

El metabolismo es el conjunto de reacciones bioquímicas y procesos fisicoquímicos que ocurren en una célula y en el organismo, en los cuales se consume y se genera energía.

El metabolismo se caracteriza por una actividad celular altamente coordinada, en la cual una serie de reacciones mediadas por enzimas (agrupadas en vías metabólicas), cooperan para obtener energía química degradando nutrientes ricos en energía desde el medio ambiente; convirtiendo nutrientes en componentes de la célula, tales como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos; y sintetizando y degradando biomoléculas requeridas para funciones celulares especializadas, como lípidos de membrana, mensajes intracelulares y pigmentos [28].

Tomando esto en cuenta, el metabolismo puede ser dividido en dos procesos conjuntos: catabolismo y anabolismo. Las reacciones catabólicas producen energía, ejemplo de ello es la glicólisis, en donde a partir de la degradación de compuestos como la glucosa se obtiene la liberación de la energía presente en sus enlaces químicos. Por otra parte están las reacciones anabólicas o de biosíntesis, las cuales utilizan dicha energía liberada para formar enlaces químicos y formar moléculas y precursores de macromoléculas de la célula, llamados metabolitos.

En las vías metabólicas el flujo se regula mediante la disponibilidad de un sustrato o de un metabolito intermediario, o mediante la regulación de la actividad (o cantidad) de una de las enzimas de la vía metabólica. Existiendo enzimas que pueden tener varios mecanismos de regulación, los cuales responden a estímulos diferentes (ambientales, necesidades celulares, o según señales de otras células).

Como se mencionó previamente, las reacciones catabólicas producen metabolitos necesarios para la biosíntesis, generándose además energía libre de Gibbs, principalmente en forma de ATP, el cual es utilizado como energía en para otras reacciones celulares, tales como biosíntesis, polimerización y reacciones de ensamble. Adicionalmente hay producción de poder reductor, principalmente en forma de de NADPH y NADH, cofactores requeridos en reacciones de biosíntesis [29].

El catabolismo de azúcares comienza con la glicólisis, vía en la cual se obtiene como producto final piruvato. El piruvato es luego utilizado en las vías fermentativas, vías anapleiróticas, vías de

transaminación para la formación de aminoácidos, el ciclo de de los ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA), u otras rutas metabólicas.

La vía metabólica de la glicólisis comprende 10 reacciones, tres de las cuales involucran un cambio en la energía libre ( $\Delta G$ ) negativo, por lo cual son en esencia reacciones irreversibles. Las reacciones corresponden a: fosforilación de la glucosa, fosforilación de la fructosa-6-fosfato y la transferencia de fosfato desde fosfoenolpiruvato a ADP. Siendo las enzimas responsables de catalizar estas tres reacciones: *hexoquinasa*, *fosfofructoquinasa* y *piruvato quinasa*, respectivamente. Por lo general, enzimas que catalizan reacciones esencialmente irreversibles son potenciales puntos de control regulatorio en las vías metabólicas.

La *hexoquinasa* cataliza la primera reacción de la glicólisis, participando en la conversión de glucosa en glucosa-6-fosfato. Sin embargo no es el principal punto de control en la glicólisis, debido a que grandes cantidades de glucosa-6-fosfato ingresan a la vía a partir de la degradación de glucógeno, por lo que la acción de la *hexoquinasa* no es necesaria.

La *fosfofructoquinasa* (PFK) es una enzima regulatoria, una de las más complejas que se conocen. Media la conversión de la fructosa-6-fosfato en fructosa-1,6-bifosfato. Siendo el mayor punto de regulación en la glicólisis, presentando regulación alostérica. La actividad de PFK-1 se incrementa cada vez que el suministro de ATP se agota o cuando el ADP y AMP (subproductos del ATP) se encuentran en exceso.

La reacción final de la glicólisis es catalizada por la piruvato quinasa, enzima altamente regulada. La reacción es altamente exergónica, conservándose la alta energía del fosfato del fosfoenolpiruvato en forma de ATP. La regulación de la piruvato quinasa es importante para la vía reversa de la glicólisis, cuando el ATP se encuentra en exceso, activando la gluconeogénesis. Debido a esto, la reacción mediada por esta enzima no es un punto principal de control en la glicólisis.

El piruvato obtenido en la glicólisis, puede ser luego utilizado en distintas rutas dependiendo del estado redox y el estado energético de las células. En condiciones aeróbicas la mayor parte del piruvato ingresa al ciclo TCA como acetil-CoA luego de la oxidación mediada por la enzima *piruvato deshidrogenasa*. Sin embargo, bajo condiciones con limitación de oxígeno el piruvato puede ser convertido en productos metabólicos tales como ácido láctico, ácido acético y etanol a través de las vías fermentativas. La vía fermentativa más simple corresponde a la conversión de piruvato en lactato por la enzima *lactato deshidrogenasa*.



En el ciclo TCA, también llamado Ciclo de Krebs, se produce la oxidación completa de carbohidratos, ácidos grasos, aminoácidos y proteínas, produciendo  $\text{CO}_2$  y liberando energía en forma de poder reductor y ATP. Debido a que en el ciclo se producen metabolitos intermediarios que son precursores para la biosíntesis de biomoléculas, se le considera como una vía anfibólica, ya que es catabólica y anabólica al mismo tiempo. Siendo  $\alpha$ -ketoglutarato y oxaloacetato metabolitos precursores para la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos.

Los principales puntos regulatorios en el ciclo TCA son la *citrato sintetasa*, *isocitrato deshidrogenasa* y  *$\alpha$ -ketoglutarato deshidrogenasa*, las cuales catalizan las tres primeras reacciones del ciclo, en donde la actividad de estas tres enzimas está favorecida por un nivel bajo en la razón  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  y se inhibe por altas concentraciones de ATP. Se incluye además la piruvato deshidrogenasa como enzima regulatoria ya que media la conversión del piruvato a acetil-CoA, el cual ingresa al ciclo TCA.

### **1.3. Descripción del proyecto y justificación**

La terapia génica ha emergido como una promisorio estrategia para combatir enfermedades hereditarias así como también adquiridas, dedicando gran parte de sus esfuerzos en el desarrollo de técnicas para combatir el cáncer.

Para llevar a cabo la inserción o corrección de un gen específico se necesita de un vector que introduzca dicho material genético en las células del paciente, siendo los adenovirus el vector más utilizado actualmente en estudios y ensayos clínicos.

Los vectores adenovirales utilizados tienen delecionadas ciertas regiones de su genoma, de forma de proporcionar espacio para la inserción de genes de interés, así como también para impedir su replicación en células normales. Entre estos vectores se encuentran los adenovirus Ad5, los cuales tienen delecionada la región E1 y E3.

Las células HEK293 corresponden a una línea celular empaquetadora complementaria con los vectores adenovirales Ad5, ya que dichas células poseen integrado en su genoma los genes necesarios para la replicación del adenovirus, permitiendo su amplificación.

Este trabajo consistió en la adaptación de células HEK293 para que crezcan en suspensión y en medio de cultivo libre de suero fetal bovino, para luego realizar un análisis metabólico comparativo de cultivos batch durante su crecimiento y en la producción de adenovirus, con el fin de identificar factores relevantes en la productividad de cultivos.

Además se cuantificaron enzimas relevantes en el metabolismo celular, para los estados de crecimiento y producción de adenovirus, lo cual será comparado con los resultados del análisis de flujo metabólico para las mismas condiciones extraídos de un trabajo previo.

De la comparación de cultivos a nivel metabólico y del nivel de enzimas se espera identificar factores relevantes para la productividad de cultivos.

El éxito de este estudio permitiría optimizar la producción y rendimiento del cultivo de adenovirus, con miras de obtener información para la producción a gran escala de estos vectores virales, aspectos que son de importancia para lograr los títulos de vectores adenovirales requeridos para la realización de ensayos clínicos fase I, II y III, y finalmente para su comercialización.

El presente trabajo de memoria de título fue desarrollado en laboratorio de cultivo de células del Centro de Excelencia Académica en Ingeniería Bioquímica y Biotecnología (CIBYB), con el apoyo del Instituto Milenio de Dinámica Celular y Biotecnología (ICDB), bajo la dirección de la Dra. Ziomara Gerdtzen.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivos generales**

Comparación metabólica y del nivel de proteínas de cultivos en estado de crecimiento y producción de adenovirus.

Comparación de resultados experimentales con análisis teórico.

### **1.4.2. Objetivos específicos**

- Desarrollo de Banco de células de trabajo.
- Adaptación de células a medio libre de suero.
- Cultivo de células en suspensión.
- Caracterización del estado metabólico de células HEK293 en crecimiento y producción de adenovirus.
- Cuantificación de enzimas que intervienen en el metabolismo celular en crecimiento y producción de adenovirus

## **1.5. Alcances**

Se siguió el crecimiento de células HEK293 creciendo adheridas, así como también en suspensión (en spinners), realizando conteo de células, viabilidad, y calculando las tasas de consumo de glucosa y de producción de lactato, caracterizando de esta forma su estado metabólico. En una segunda etapa las células fueron infectadas, caracterizándose el estado metabólico durante la producción de adenovirus.

Por otro lado se realizó la cuantificación de los niveles de enzimas relevantes en el metabolismo celular, para los estados de crecimiento y producción de adenovirus, siendo comparados dichos resultados con los extraídos del análisis de flujo metabólico para las mismas condiciones realizado en un trabajo anterior, de manera de confirmar dichos resultados e identificar factores nutricionales o metabólicos relevantes para la productividad de cultivos [25].

Además durante este trabajo fue diseñado e implementado un protocolo para el crecimiento de células en bajo suero utilizando placas cebadas.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Células

Las células utilizadas en este trabajo corresponden a células empaquetadoras HEK293 (ATCC CRL-1573), derivadas de células embrionarias de riñón humano.

#### 2.1.2. Adenovirus

El adenovirus utilizado es un Adenovirus humano tipo 5 (Ad5) que contiene incorporado en su genoma el gen reportero de la  $\beta$ -Galactosidasa (Ad-LacZ). Este adenovirus recombinante fue donado por el Laboratorio de Farmacoterapia Génica de la Universidad de Chile.

#### 2.1.3. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado se denomina medio 2.0 y se compone principalmente de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) alto en glucosa (4,5 [g/L]) y F12 (Nutrient Mixture powder) en proporción 1:1, junto a una serie de compuestos que se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2: Formulación medio 2.0.

Compuesto	Concentración	Marca
DMEM (alto en glucosa)	1 sobre	Gibco
F12	1 sobre	Gibco
Bicarbonato de sodio	2,44 [g/L]	Sigma
Acido ascórbico	20 [mg/L]	Sigma
Putrescina	1 [mg/L]	Sigma
Pluronic F68	0,02% [p/v]	Sigma
Etanolamina	0,01% [v/v]	Sigma
Selenito de sodio	5 [μg/L]	Sigma
Mercaptoetanol	1,65 [μL/L]	Sigma
Apotransferrina	5 [mg/L]	Calbiochem
Penicilina/Estreptomicina	50 [U/mL] /50 [μg/mL]	Gibco

El medio contiene rojo fenol como indicador de pH. Se ajusta a pH 7,0 con la adición de HCl o NaOH según corresponda.

En el caso base este medio se encuentra suplementado con 10% [v/v] de suero fetal bovino.

#### **2.1.4. Reactivos adicionales para suplementación del medio de cultivo**

El medio utilizado para el caso base se suplementó con 10% de suero fetal bovino (Hyclone).

Para la reducción de suero se probaron los siguientes reactivos: Albúmina de suero bovino (BSA) a 40 [mg/L], Intralípidos al 0,01 [%v/v], y Dexametasona 3 [mg/L], todos los anteriores de Sigma.

Para el crecimiento en suspensión se utilizó 1 [μL/mL] de solución Antiaglomerante (*Anti-Clumping Agent*, Gibco). Se probaron además Piruvato de sodio a 1x (*MEM Sodium Pyruvate Solution 100 mM (100X) liquid*, Gibco), Concentrado de aminoácidos a 1x (*MEM Amino Acids Solution (50X) liquid*, Gibco)

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Metodología general

La metodología general seguida durante el trabajo de memoria de título fue la que se presenta a continuación:

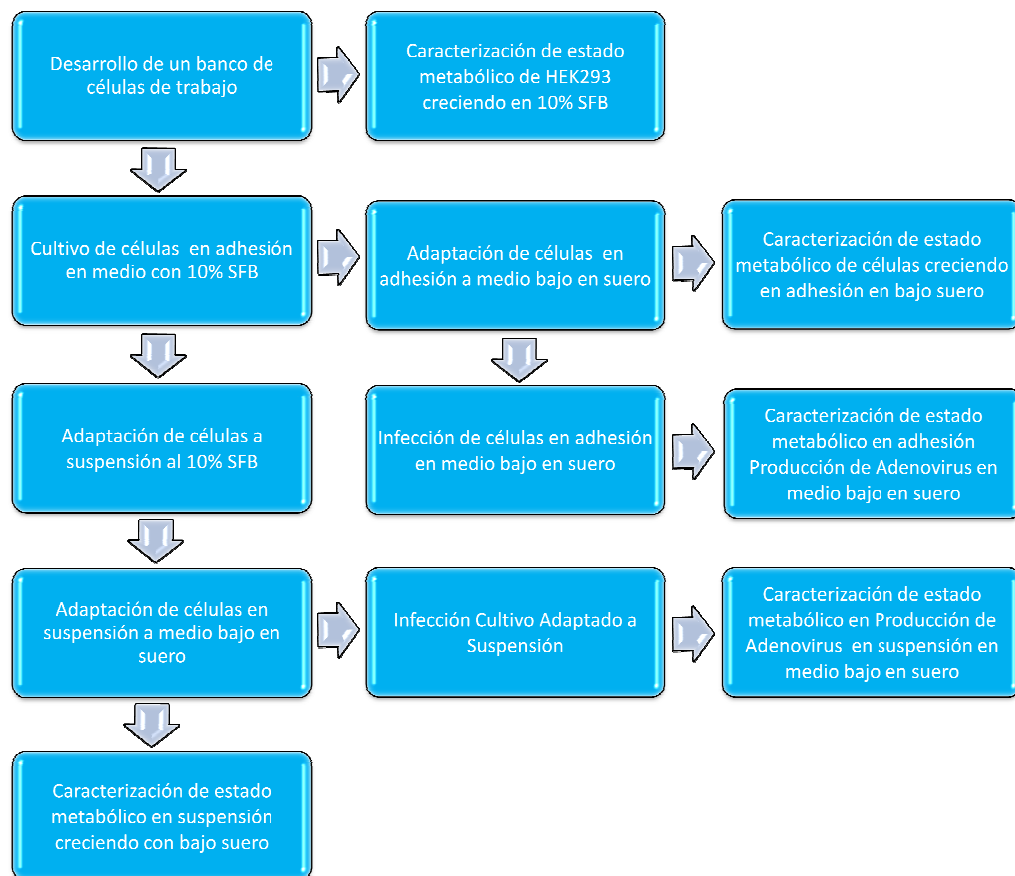


Figura 4: Resumen de la metodología utilizada en el trabajo experimental.

Se comenzó descongelando células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado al 10% de SFB. A partir de éstas se generó un banco de células de trabajo. Se realizó la caracterización del crecimiento de las células y de su estado metabólico, a través de la medición de glucosa y lactato.



Posteriormente las células fueron adaptadas a crecer en adhesión en un medio bajo en suero (0,5% de SFB) con la adición de suplementos adicionales, realizándose luego la caracterización del estado metabólico de dichas células.

También se realizó a la adaptación de células HEK293 a crecer en suspensión en spinner en medio suplementado con 10% de SFB con la adición de un agente antiaglomerante y el aumento de concentración de Pluronic F-68 para proteger de los esfuerzos de corte. Una vez logrado esto se adaptó a las células a crecer en el medio bajo en suero utilizado anteriormente en el crecimiento en adherencia, caracterizándose luego su estado metabólico en el crecimiento en suspensión.

Posteriormente células creciendo en adherencia en medio con 10% y 0,5% de SFB, y creciendo en suspensión en medio con 0,5% de SFB fueron infectadas con adenovirus y se caracterizó su estado metabólico en la producción de adenovirus.

La eliminación del suero responde a la necesidad de diseñar medios definidos para el cultivo celular, ya que éste, además de subir los costos de producción, agrega variabilidad al sistema, pudiendo también introducir contaminantes al cultivo. Además de dificultar la posterior separación y purificación del adenovirus. Mientras que la adaptación de células a crecer en suspensión permitiría el escalamiento del proceso, en vías a una producción a gran escala de células para la obtención de grandes cantidades de vectores adenovirales para uso terapéutico.

### **2.2.2. Descongelamiento de células HEK293**

Se descongelaron células HEK293 almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ver Anexo 6.1.2). Luego se realizó un primer pasaje a las células (ver Anexo 6.1.3) y se comenzó el desarrollo de un Banco de células.

### **2.2.3. Desarrollo de Banco de células HEK293**

Se desarrolló un banco de células de trabajo, para ello se realizaron cultivos sucesivos de células HEK293 en t-flask de  $75\text{ cm}^2$  de área (T-75). Se comenzó con una T-75 y al llegar esta a un 80% de confluencia se realiza un pasaje celular, dividiendo la cantidad de células recolectadas en tres y agregándolas a dos T-75 nuevas (pasaje 1:3). Luego de 2 días se realiza otro pasaje 1:3 para las tres T-75 y el excedente de células se congelaron. Esto se realizó durante 6 pasajes, conformando así el banco de células de trabajo.

### **2.2.4. Caracterización del estado metabólico de células creciendo adheridas con 10% SFB (caso base)**

Para la caracterización del estado metabólico de células HEK293 creciendo adheridas, se siguió su crecimiento durante 10 días, tiempo tras el cual las células ya han llegado a la fase estacionaria de crecimiento. Para esto se utilizaron 20 placas de Petri de 60 [mm] de diámetro para su monitoreo por duplicado cada 24 hrs.

Las placas fueron inoculadas con 5 [mL] de células a una concentración de  $0,25 \times 10^6$  [cel/ml] ( $0,5 \times 10^5$  [cel/cm<sup>2</sup>]), luego cada 24 horas a 2 placas se les extraía una muestra del medio para medir la concentración de glucosa y lactato, y las células eran despegadas para medir la concentración celular y la viabilidad.

Para cada muestra se determinaron la concentración celular y viabilidad (ver Anexo 6.1.5), junto con la cuantificación de glucosa y lactato en el medio de cultivo (ver Anexos 6.1.13 y 6.1.14).

A partir de los resultados obtenidos se calcularon parámetros cinéticos tales como la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), que corresponde a la pendiente de la curva de crecimiento en función del tiempo, y la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), correspondiente a la velocidad específica en la fase exponencial del crecimiento. Además se calculó el tiempo de duplicación de

las células ( $t_d$ ), el consumo específico de glucosa ( $q_{Gluc}$ ) y la producción específica de lactato ( $q_{Lac}$ ). Las ecuaciones<sup>2</sup> utilizadas en el cálculo son las siguientes:

$$X_v = X \times V \quad (1)$$

$$\mu = \left( \frac{1}{X_v} \right) \times \left( \frac{dX_v}{dt} \right) \quad (2)$$

$$t_d = \left( \frac{1}{\mu_{max}} \right) \times \ln(2) \quad (3)$$

$$q_{Gluc} = \left( \frac{-1}{X_v} \right) \times \left( \frac{dGluc}{dt} \right) \quad (4)$$

$$q_{Lac} = \left( \frac{1}{X_v} \right) \times \left( \frac{dLac}{dt} \right) \quad (5)$$

### 2.2.5. Adaptación a crecimiento en medio bajo en SFB

Se comenzó con células HEK293 creciendo en medio con 10% SFB, luego en dos T-25 se inocularon células reduciendo el suero a 5% y 1% SFB, observándose que por dos pasajes crecían bien en ambos medios se mantiene de respaldo la T-25 con el porcentaje de suero inferior, y que esté creciendo bien, y se continua reduciendo el suero desde 1% a 0,5 y 0,1%.

Junto con la reducción del suero en el medio de cultivo se empezaron a agregar suplementos adicionales para compensar la falta de nutrientes y factores que se encuentran presentes en este. Los suplementos adicionados fueron Albúmina de suero bovino (BSA) a 40 [mg/L], Intralípidos al 0,01 [%v/v] y Dexametasona 3 [mg/L], todos los anteriores de Sigma.

Complementario a esto se utilizaron placas cebadas, por razones que se explican más adelante.

---

<sup>2</sup>  $X_v$  corresponde a la concentración de células viables y V al volumen final del cultivo.

### **2.2.6. Implementación de placas cebadas para células creciendo adheridas con medio bajo en SFB**

Para cebar las placas, previamente se crecieron en ellas células HEK293 en medio suplementado con 10% SFB, una vez que alcanzan confluencia se extraen todas las células, se lava la placa y se almacena con PBS para su posterior uso (ver Anexo 6.1.6).

### **2.2.7. Adaptación a crecimiento en suspensión en Spinner**

Se recolectaron células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado al 10% SFB, luego de tripsinarlas se resuspendieron en medio, se centrifugaron para eliminarles la tripsina y se volvieron a resuspender en medio fresco.

Se inoculó un spinner previamente siliconizado con  $0,5 \times 10^6$  [cel/mL] en 100 [mL] de medio de cultivo suplementado con 10% SFB, se ajustó la concentración de Pluronic F-68 (Sigma) a 0,2 [%p/v] para protección al esfuerzo de corte y se agregó 1 [μL/mL] de solución Antiaglomerante (Anti-Clumping Agent, Gibco) para evitar los aglomerados celulares, ya que en suspensión las células tienden a crecer unas adheridas a otras formando agrupaciones de gran tamaño.

Se dejaron crecer las células con agitación de 80-90 rpm por 3-4 días, monitoreando la viabilidad y concentración celular, pasando las células si estas alcanzan una concentración de  $1 \times 10^6$  [cel/mL]. Para el pasaje celular se recolectó el medio con células y se centrifugó a 900 rpm por 10 minutos, se resuspendieron en una pequeña cantidad del medio anterior y se le agregó medio fresco con los suplementos antes descritos.

Tras sucesivos subcultivos y obtenida una viabilidad superior al 80% y una concentración celular razonable, se consideró que las células se encontraban adaptadas a crecer en suspensión (ver protocolo de subcultivo en Anexo 6.1.7).

Luego se procedió a reducir la suplementación de suero en el medio, para lo cual se realizaron disminuciones sucesivas a 5, 2, 1, 0,7 y 0,5% SFB, agregando 40 [mg/L] de BSA e Intralípidos al 0,01 [%v/v] como suplementos para compensar la reducción de suero, además de Pluronic F-68 y solución Antiaglomerante.

Una vez obtenida una viabilidad superior al 80% y una concentración celular razonable, del orden de  $7-10 \times 10^5$  [cel/mL], se consideró que las células se encontraban adaptadas a crecer en suspensión en medio bajo en suero [22, 30].

#### **2.2.8. Caracterización de células creciendo en suspensión en Spinner**

Utilizando las células previamente adaptadas a crecer en suspensión en medio bajo en suero, se realizó un cultivo de tipo batch en spinner a partir de un inóculo de  $0,3 \times 10^6$  [cel/mL] en 100 mL de medio de cultivo.

Se siguió el crecimiento celular por 8 días, midiendo la concentración celular y la viabilidad (ver Anexo 6.1.8), y guardando el sobrenadante para la medición de glucosa y lactato para la determinación de parámetros cinéticos, consumo de glucosa y producción de lactato.

#### **2.2.9. Amplificación de Adenovirus**

Se realizó la infección de células HEK293 creciendo adheridas en una T-25 con medio suplementado con 10% SFB, utilizando el adenovirus Ad-LacZ a un MOI 10 (ver Anexo 6.1.9); las células infectadas se incubaron a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.

Pasadas 48 horas después de la infección (hpi, horas post infección) se realizó la cosecha de adenovirus utilizando un rastrillo para desprender las células que aun se encontraban adheridas al t-flask, el resto de células se encuentran en el sobrenadante desprendidas a causa del efecto citopático. Se eligió este tiempo ya que el virus se encuentra dentro de las células, las cuales aun no se han lisado liberando su contenido al medio extracelular, permitiendo obtener un stock de adenovirus a una concentración mayor que si este se encontrara en el sobrenadante.

Se recolectaron las células, se centrifugaron y se guardó parte del sobrenadante para usarlo como control para verificar si hay o no presencia de virus. Para extraer el adenovirus se lisaron las células realizando 4 ciclos de congelamiento y descongelamiento a -80 °C y 37 °C respectivamente. El lisado celular se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C para eliminar los restos celulares. Las partículas virales se recuperaron del sobrenadante, se alicuotaron y

guardaron a -80 °C. Este stock fue luego titulado y utilizado para nuevas amplificaciones del adenovirus.

#### **2.2.10. Titulación del stock de Adenovirus**

Para la determinación del título del stock de adenovirus se utilizó el método biológico de la Dosis Infecciosa 50 (TCID<sub>50</sub>), que determina la concentración a la cual el virus es capaz de infectar el 50% del cultivo (ver Anexo 6.1.10).

Se utilizaron placas de 96 pocillos a las cuales se le agregaron 100 [μL] por pocillo de células HEK293 a una concentración de  $1 \times 10^5$  [cel/mL] en medio suplementado con 2% SFB. Al día siguiente se le agregaron las diluciones del stock de adenovirus y se incubaron por 10 días a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.

Pasados los 10 días se leyeron las placas, obteniéndose los títulos correspondientes.

#### **2.2.11. Infección de cultivo adaptado a suspensión**

La infección se realizó a un MOI de 10; cuando la densidad celular del cultivo en suspensión es de aproximadamente  $1 \times 10^6$  [cel/mL] (ver Anexo 6.1.12). A este cultivo se le realizó un seguimiento tomando muestras cada 24 horas desde el día en que se inicia el cultivo (antes de realizar la infección) y por aproximadamente 8 días. A dichas muestras se les mide la concentración celular, viabilidad, y se realiza la cuantificación de glucosa, lactato y de adenovirus.

Para la cuantificación de adenovirus se determinaron las partículas virales infecciosas por medio del método biológico de TCID<sub>50</sub>.

### **2.2.12. Medición de Niveles de Proteínas Intracelulares**

Se utilizaron placas de 96 pocillos a las cuales se les agregaron 100 [µL] de células por pocillo a una concentración de  $10^5$  [cel/mL]. Luego se incubaron las placas por la noche a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.

Se realizó la medición acorde a lo especificado en el kit In-Cell ELISA Colorimetric Detection Kit (Thermo Scientific), utilizando los anticuerpos que reconocen las enzimas *α-Ketoglutarato deshidrogenasa* (α-KGD), *Lactato deshidrogenasa* (LDH), *Piruvato deshidrogenasa* (PDH) y *Fosfofructoquinasa* (PFK), todos ellos de Santa Cruz Biotechnology.

Se realizó tanto para células en crecimiento como para infectadas con adenovirus. Para crecimiento se siguió el protocolo tal como aparece especificado en el kit (ver Anexo 6.1.15), mientras que para la producción de adenovirus luego de incubar las placas por la noche éstas se infectaron a un MOI de 10 [pfu/cel], se incubaron por 12-15 horas y luego se realizó el ensayo en ellas antes de que las células pudiesen desprenderse a causa del efecto citopático, fijándolas a la placa según el protocolo especificado en el kit.

### **2.2.13. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados expuestos en este trabajo se realizó mediante el software Graphpad Prism versión 5. Se realizaron análisis *two-way* ANOVA utilizando un post-test de Bonferroni. La diferencia entre los resultados se considero significativa de acuerdo al p-valor siguiendo la siguiente simbología: (\*) P< 0,1; (\*\*) P< 0,05; (\*\*\*) P< 0,01.

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1. Desarrollo de Banco de células HEK293

Se obtuvo un banco de células HEK293 congeladas en nitrógeno líquido (o a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) de células creciendo adheridas en medio DMEM/F12 suplementado con 10% SFB.

Se congelaron células adaptadas a bajo suero que crecen adheridas y en suspensión, además de respaldos de etapas intermedias de adaptación.

#### 3.2. Estado metabólico células creciendo adheridas al 10% SFB

Se realizó la curva de crecimiento para células HEK293 creciendo adheridas en placas de Petri de 60 [mm] de diámetro con medio 2.0 suplementado con 10% SFB (ver Figura 5).

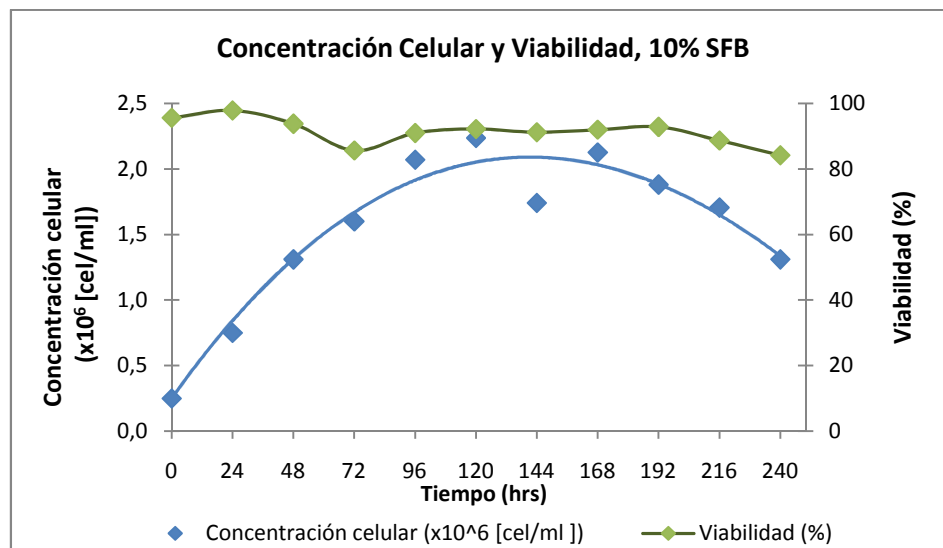


Figura 5: Curva de crecimiento de células HEK293 creciendo adheridas en medio al 10% SFB.

Se observa la ausencia de etapa lag, iniciándose la etapa exponencial desde el inicio del cultivo. Esto puede ser debido a que las células están creciendo en un medio en el cual ya están acostumbradas, y/o que la manipulación y las condiciones de cultivo eran las adecuadas por lo



cual no requirieron adaptarse al ser inoculadas, continuando su crecimiento. También puede ser producto de un error en la medición o que el inóculo inicial fue mayor al descrito.

El crecimiento se siguió por 10 días, observándose que la etapa de crecimiento exponencial se prolonga hasta las 96 horas, cuando comienza la etapa de crecimiento estacionaria. La viabilidad celular decreció hasta un 84,2% en el último día de cultivo, apreciándose una clara disminución del número de células y de viabilidad al término del cultivo.

La velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) fue de 0,0301 [ $\text{h}^{-1}$ ], con un tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de 22,9 horas, y alcanzándose una concentración celular máxima de  $2,24 \times 10^6$  [cel/mL] a las 120 horas de cultivo (día 5).

Del análisis de concentración de glucosa y lactato de las muestras de sobrenadante, extraídas diariamente por duplicado, se obtuvo los perfiles de glucosa y lactato durante el crecimiento celular que se muestra en la Figura 6. Se observa que al agotarse la glucosa a las 144 horas de cultivo hay una baja en la concentración de lactato, lo que indicaría una posible utilización del lactato como fuente de carbono alternativa. El lactato consumido estaría siendo utilizado para la mantención del metabolismo celular y no para la proliferación, ya que no se aprecia un aumento de la concentración celular del cultivo pasadas las 144 horas.

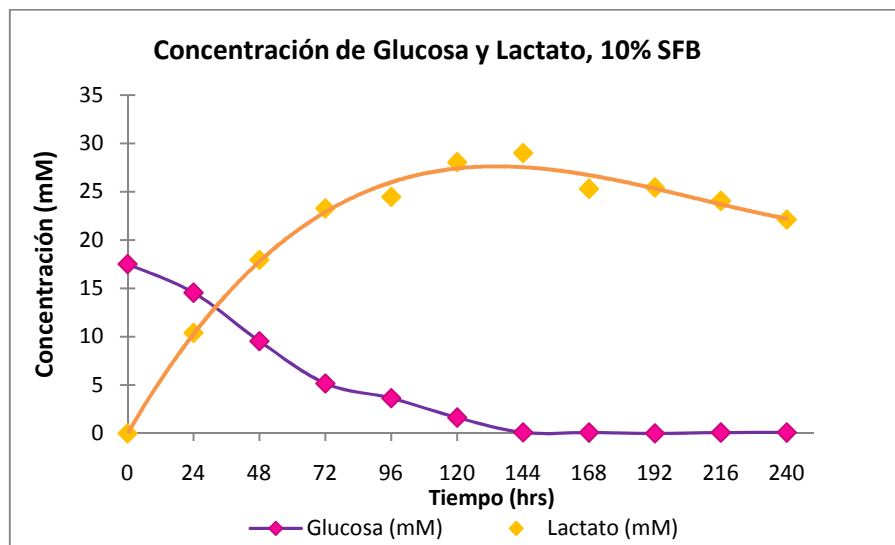


Figura 6: Perfiles de Glucosa y Lactato de células HEK293 creciendo adheridas en medio al 10% SFB.

Se calcularon las tasas específicas de consumo de glucosa y producción de lactato, y la razón entre éstas (ver Figura 7). En la Figura 7A se observa que dichas tasas son máximas en el inicio del cultivo ( $q_{\text{Gluc}}=0,901$  y  $q_{\text{Lac}}=1,948$  [mmol/10<sup>9</sup> cel/hr]), decreciendo luego y acercándose a cero en la etapa estacionaria de crecimiento entre las 96 y 168 horas de cultivo. Además se observa que la tasa de consumo de producción de lactato se torna negativa a las 144 horas, que es cuando ocurriría un cambio metabólico y se comenzaría a consumir lactato como fuente alternativa de carbono. Esto se ve con mayor claridad en la Figura 7B, en donde se presenta la razón  $\Delta L/\Delta G$  la cual es máxima al inicio del cultivo decreciendo paulatinamente cruzando el cero pasadas las 120 horas de cultivo.

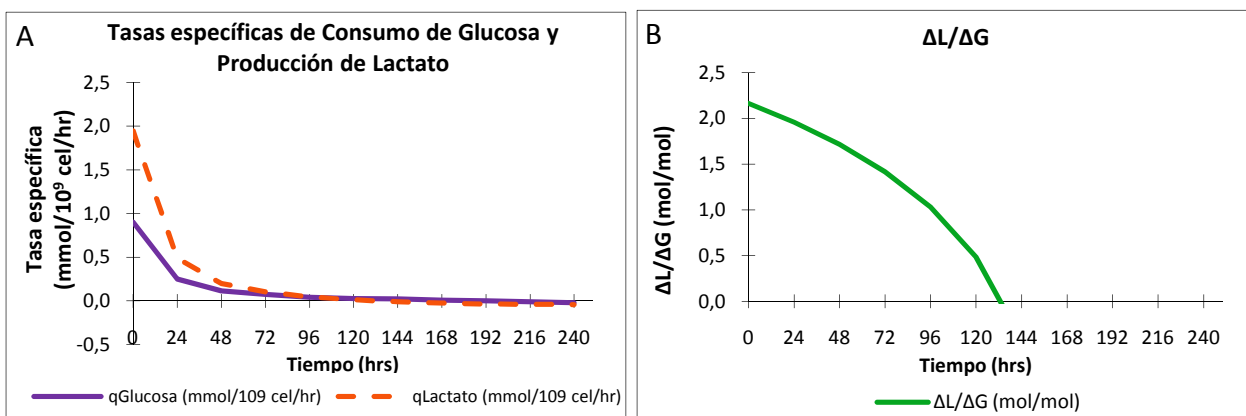
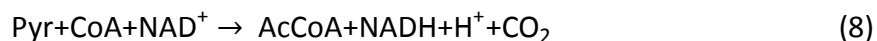
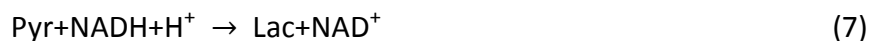
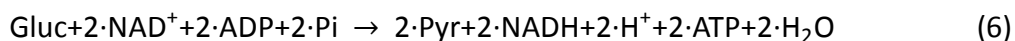


Figura 7: A) Tasas específicas de consumo de glucosa y de producción de lactato. B) Razón entre la tasa de producción de lactato y la tasa de consumo de glucosa para células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado al 10% SFB.

Teóricamente el máximo valor de la razón  $\Delta L/\Delta G$  corresponde a 2, ya que un mol de glucosa produce un máximo de dos moles de lactato en la glicólisis, como se muestra en las ecuaciones 6 y 7. Esto implicaría que todo el piruvato se convierte en lactato sin entrar al ciclo TCA (ecuación 8).



La razón obtenida (ver Figura 7B) es ligeramente superior, lo que puede ser debido a una acumulación previa de lactato en las células, como se ha reportado en trabajos anteriores [25, 31], o a errores en la medición.

### **3.3. Adaptación a cultivo libre de suero**

A partir de células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado con 10% de SFB se comenzó la reducción de suero en forma progresiva a 5 y 1% de SFB en medio 2.0, sin observarse mayor diferencia en su crecimiento. Luego se probaron suplementos tales como BSA a 40 [mg/L], Intralípidos al 0,01 [%v/v] y Dexametasona a 3 [mg/L].

Con la adición de estos suplementos se continuó la reducción de suero a 0,5 y 0,1% SFB. Debido a que la adición de dexametasona no mostró un efecto positivo en la concentración celular obtenida (datos no mostrados), pese a ser utilizada con éxito para la formulación de un medio libre de suero para el crecimiento de células HEK293 en un trabajo previo [31], se descartó su uso. Se mantuvo la adición de intralípidos y BSA con los cuales se obtuvo una mayor concentración celular y viabilidad celular comparable, además ambos son utilizados en un trabajo previo contra el cual se realizarán comparaciones [25].

A pesar de que con 0,1% SFB las células crecían inicialmente, con los días comenzaron a desprenderse y crecer en aglomerados. Por lo que se volvió a la concentración anterior de suplementación con 0,5% de SFB, y se siguió trabajando con ella hasta concluir el trabajo debido a restricciones de tiempo. La reducción de suero fue de un 95% respecto al caso base.

Si se siguiera reduciendo el porcentaje de suero de formar sistemática y progresiva entre un 10-50% respecto a la etapa anterior, manteniendo algunos pasajes en cada etapa para estabilizar las células, esto llevaría a obtener células creciendo en medio libre de suero.

Se observó que al reducir el suero las células comienzan a crecer aglomeradas en vez de en monocapa, o que se adhieren pobremente a la placa de cultivo cuando se utiliza una superficie virgen. Esto no ocurría cuando se colocaban células en una placa en cuya superficie hayan crecido previamente células.

Debido a esto se implementó la utilización de placas cebadas para el cultivo de células en adhesión en medio con bajo suero.

### 3.4. Cultivo en placas cebadas de células creciendo adheridas en medio bajo en suero

Como se mencionó anteriormente, se observó que al disminuir el suero las células comenzaban a crecer en aglomerados cuando eran subcultivadas en placas vírgenes, lo cual no ocurría cuando se hacían pasajes sobre la misma placa en la que ya estaban creciendo. Debido a esto se optó por utilizar placas cebadas, las cuales aportan un soporte para que las células en condición de bajo suero puedan adherirse mejor a la superficie de la placa y puedan distribuirse en ella de manera uniforme.

Las diferencias en la distribución de las células durante su crecimiento utilizando placas cebadas, respecto a placas vírgenes, se muestran en la figura a continuación.

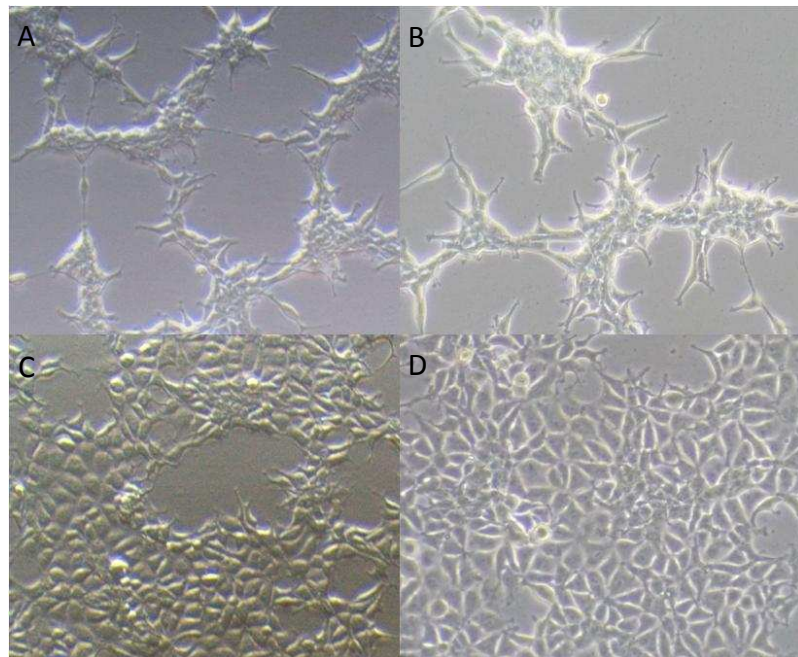


Figura 8: Comparación del crecimiento de células HEK293 en medio bajo en suero en placas cebadas versus sin tratamiento. A, B) Control 24 y 48 hrs. de cultivo, respectivamente. C, D) Crecimiento en placas cebadas 24 y 48 hrs. de cultivo, respectivamente.

En la Figura 8A y B se muestran células HEK293 creciendo en medio suplementado con 0,5% SFB, BSA e Intralípidos, las cuales fueron pasadas a una placa virgen. Es posible apreciar que las

células se encuentran en aglomerados, formando cordones sin distribuirse por la placa, sin observarse cambios en su distribución de las 48 a las 72 horas de cultivo, aunque si un aumento en el tamaño de los aglomerados y la superposición de células una sobre otra.

Diferente es lo que se observa en la Figura 8C y D, en donde las células crecieron en monocapa distribuyéndose por la superficie de manera uniforme, siendo posible ver que a las 72 horas éstas ya han llegado a confluencia. Este detalle no es menor, ya que permite la correcta visualización del estado de crecimiento de las células, pudiendo tomar decisiones acertadas sobre su subcultivo. Permite también que todas las células tengan igual acceso a los nutrientes del medio.

Además evita la formación de agregados celulares, los cuales dificultan resuspender correctamente las células cuando se tripsinizan y obligan a ejercer mayores esfuerzos de corte al pipetear, causando estrés y destruyendo células.

Obtener una suspensión homogénea de células es de importancia para no incurrir en errores al contar el número de células, tanto para inocularlas como para la caracterización del crecimiento de éstas. Además de que influye en la eficiencia de infección con adenovirus, en cuanto al acceso de las partículas virales a las células a ser infectadas.

### 3.5. Estado metabólico células creciendo adheridas con 0,5% SFB

Análogamente al caso base se realizó la curva de crecimiento para células HEK293 creciendo adheridas con medio DMEM/F12 suplementado con 0,5% SFB, BSA e intralípidos utilizando placas cebadas (ver Figura 9).

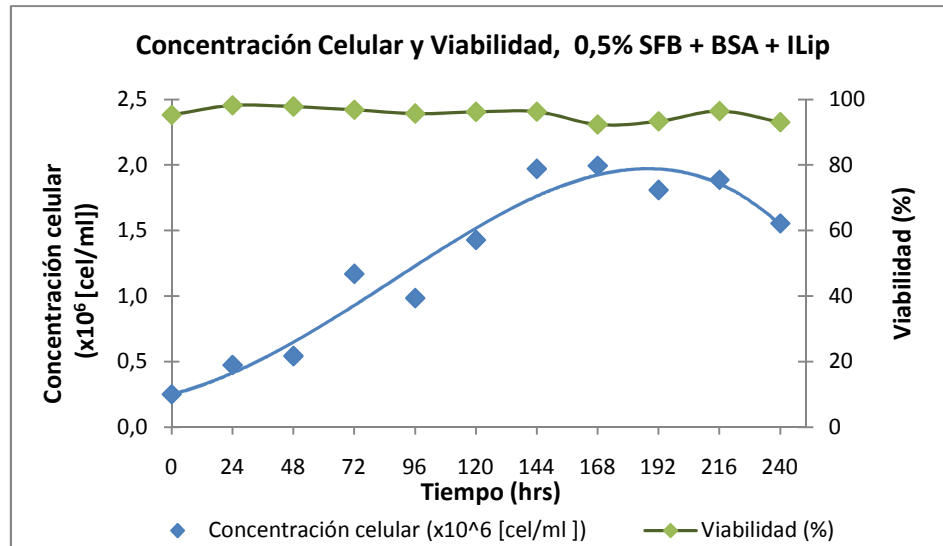


Figura 9: Curva de crecimiento de células HEK293 creciendo adheridas en medio al 0,5% SFB.

Se observa la presencia de etapa lag entre las 0 y 48 horas de cultivo, la cual no estaba presente en el caso base, de células creciendo en medio con 10% de SFB. Iniciándose luego la etapa exponencial hasta las 144 horas, en donde comienza la etapa de crecimiento estacionaria y el posterior decaimiento.

El crecimiento se siguió por 10 días, en los cuales la viabilidad no disminuyó mayormente manteniéndose sobre el 96%, aunque sí se aprecia una disminución de la concentración celular al final del cultivo.

La velocidad específica máxima de crecimiento fue de  $0,019 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ , menor a la obtenida con células creciendo en medio suplementado con 10% de SFB, con un tiempo de duplicación de 36,5 horas. La concentración celular máxima alcanzada fue aproximadamente  $2 \times 10^6 \text{ [cel/mL]}$  a las 168 horas de cultivo (día 7), siendo sólo un 10,7% menor que la alcanzada en el caso base.

Respecto a los perfiles de glucosa y lactato que se muestran en la Figura 10 es posible observar que el consumo de glucosa se realiza progresivamente, viéndose claramente que a medida que las células se multiplican van consumiendo glucosa al mismo tiempo que van produciendo lactato y liberándolo al medio extracelular. Al igual que en el caso base, se observa que luego de que se agota la glucosa, a las 168 horas de cultivo, disminuye también el lactato en el medio, empezando a ser utilizado éste como fuente alternativa de carbono.

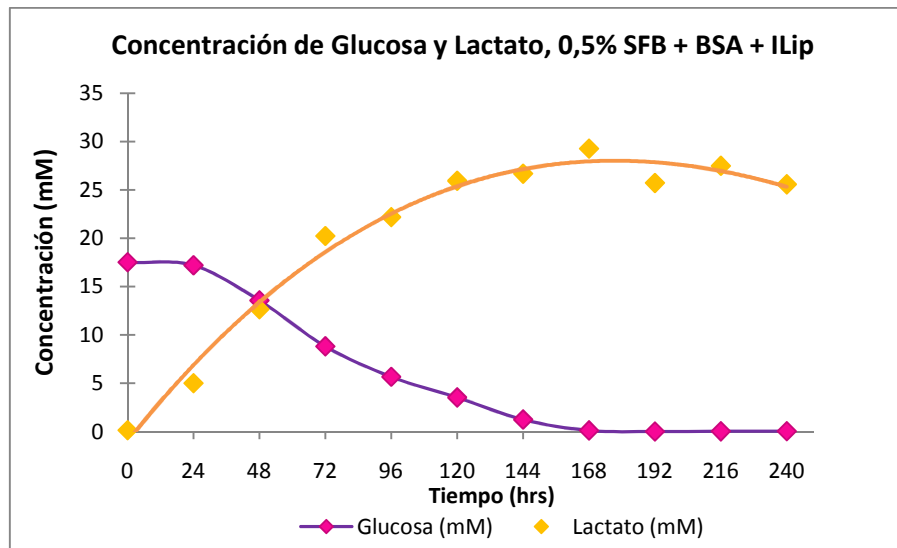


Figura 10: Perfiles de Glucosa y Lactato de células HEK293 creciendo adheridas en medio con 0,5% SFB

Cabe mencionar que la concentración de lactato máxima alcanzada en el cultivo bajo en suero fue de 29,3 [mM], siendo muy similar a la alcanzada en el cultivo con 10% SFB (29 [mM]). Concentraciones de lactato sobre 40 [mM] inhiben el crecimiento celular[25], por lo que no debería haber un efecto inhibitorio en este caso ya que ambas se encuentran por debajo de dicha concentración.

En la Figura 11A se observan las tasas específicas de consumo de glucosa y producción de lactato, presentando las dos su valor máximo al inicio del cultivo, en donde  $q_{Gluc}=0,466$  y  $q_{Lac}=1,433$  [mmol/10<sup>9</sup> cel/hr]. Ambas tasas son menores que las obtenidas para células creciendo en medio suplementado al 10% SFB, en donde el crecimiento fue mayor en el inicio del cultivo sin presentar etapa lag. Esto se explica porque en el caso base las células se

encontraban en el medio en el cual están habituadas a crecer, mientras que en el caso de crecimiento en medio bajo en suero éstas debieron ser adaptadas previamente, por lo que se observa una etapa lag, periodo en el cual las células reconocen y se acostumbran al nuevo medio en que deben crecer.

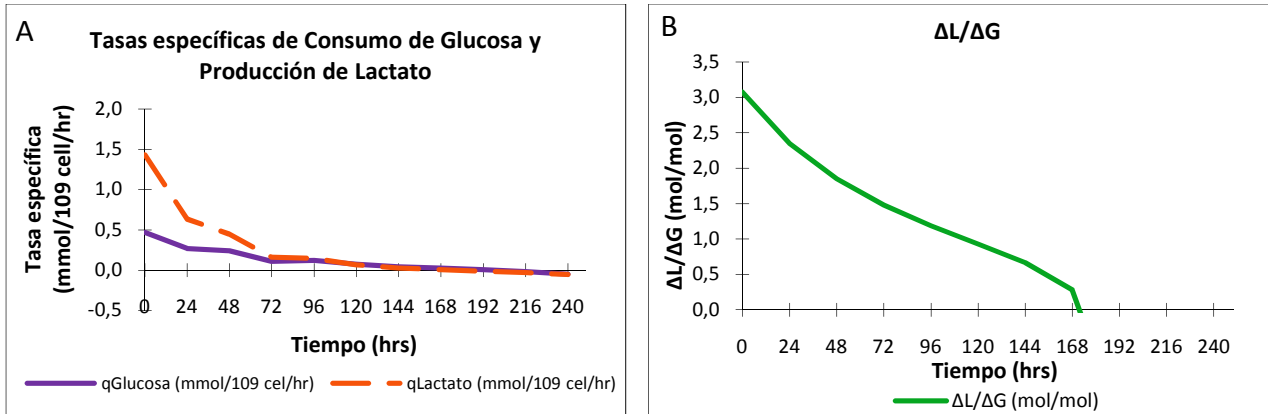


Figura 11: A) Tasas específicas de consumo de glucosa y de producción de lactato. B) Razón entre la tasa de producción de lactato y la tasa de consumo de glucosa para células HEK293 creciendo adheridas en medio bajo en suero.

La tasa de producción de lactato se torna negativa pasadas las 168 horas de cultivo, momento en el cual ya agotada la glucosa las células comienzan a consumir el lactato para mantenerse en la etapa estacionaria de crecimiento, lo cual se confirma en la Figura 11B en donde la razón  $\Delta L/\Delta G$  decrece desde 3,07 [mmol/mmol] casi linealmente hasta que se precipita a cero pasadas las 168 horas. Nuevamente se observa que la razón entre la producción de lactato y el consumo de glucosa es mayor a 2, por lo que las células quizás presentaban una acumulación de lactato previa al inicio del experimento como se discutió anteriormente.

En la Tabla 3 se presenta un resumen de los resultados obtenidos y parámetros calculados para células HEK293 creciendo adheridas, tanto para el caso base como para crecimiento en medio bajo en suero.



Tabla 3: Resumen parámetros y resultados obtenidos para células creciendo adheridas.

	10% SFB	0,5% SFB	Aumento/Reducción
$\mu_{\max}$ [1/hr]	0,0301	0,019	-36,5%
$t_d$ [hr]	22,9	36,2	+57,4%
$q_{\text{Glucosa}}$ [mmol/ $10^9$ cel/hr]	0,901	0,466	-48,3%
$q_{\text{Lactato}}$ [mmol/ $10^9$ cel/hr]	1,948	1,433	-26,4%
$\Delta L/\Delta G$ máx. [mmol/mmol]	2,16	3,07	+42,1%
Concentración celular máx. alcanzada [ $\times 10^6$ cel/mL]	2,24	2	-10,7%
Concentración lactato máx. alcanzada [mM]	29	29,3	+1,0%

De los resultados aquí expuestos, se destaca que en el caso de células creciendo en medio con 0,5% de SFB estas presentaron una velocidad específica de crecimiento 40,1% menor que el caso base, junto con una tasa específica máxima de consumo de glucosa y una consiguiente producción de lactato menores, 48,3% y 26,4%, respectivamente. A pesar de esto la concentración celular alcanzada fue muy similar, siendo sólo un 10,7% menor al caso base.

Cabe destacar que  $q_{\text{Gluc}}$  y  $q_{\text{Lac}}$  máximos fueron obtenidos al inicio del cultivo tanto en el caso base, como en el bajo en suero (el cual presentó una breve etapa lag). Si se comparan estas tasas en la etapa exponencial de ambos cultivos se observa que éstas son ligeramente superiores en el medio bajo en suero, así como también la curva de la razón  $\Delta L/\Delta G$  del cultivo bajo en suero pasa sobre la curva del caso base. Esto tendría sentido en cuanto a que las células en medio bajo en suero deben utilizar la glucosa para la síntesis de aminoácidos, vitaminas y otros elementos que aporta el suero.

### 3.6. Adaptación a crecimiento en suspensión

A partir de células HEK293 recolectadas de cultivos adherentes creciendo en medio suplementado con 10% SFB se inoculó un spinner a una concentración de  $0,5 \times 10^6$  [cel/mL] en 100 [mL] de medio 2.0 suplementado con 10% de SFB, 0,2 [%p/v] de Pluronic F-68 y 1 [ $\mu$ L/mL] de solución Antiaglomerante. Luego de 4 pasajes se consideró que las células se encontraban adaptadas al crecimiento en suspensión en spinner, ya que la viabilidad celular era superior al 90%, alcanzándose concentraciones máximas de  $1-2 \times 10^6$  [cel/mL], muy similares a las alcanzadas en el crecimiento adheridas en monocapa.

Una vez lograda la adaptación al crecimiento en suspensión se realizó la adaptación a crecimiento en medio bajo en suero, para lo cual se realizaron disminuciones sucesivas de la suplementación de suero en el medio y se agregaron los suplementos utilizados para la reducción de suero: 40 [mg/L] de BSA e Intralípidos al 0,01 [%v/v]. Se mantuvo la adición de Pluronic F-68 y Antiaglomerante.

Finalmente se obtuvo células adaptadas al crecimiento en suspensión en medio con 0,5% de suero, las cuales presentaban una viabilidad sobre el 80% y una concentración celular máxima cercana a  $1 \times 10^6$  [cel/mL].

Cabe destacar que mediante la inspección visual de agregados celulares la viabilidad observada era mayor a la obtenida mediante el protocolo utilizado para el conteo de células en aglomerados (ver Anexo 6.1.8), ya que la utilización de enzimas proteolíticas como la tripsina y el pipeteo de las células provocaba una considerable disminución en la viabilidad de éstas. Para futuros trabajos se podría probar el uso de medios bajos en magnesio y en calcio, ya que estos ayudarían a reducir la formación de agregados [22, 30].

Anteriormente se había adoptado otro enfoque para la adaptación de células a cultivo en suspensión en bajo suero, utilizándose células previamente adaptadas a crecer en medio bajo en suero y luego adaptándolas a crecer en suspensión. Se obtuvo células capaces de crecer en suspensión tras pasajes sucesivos, pero éstas crecían en aglomerados celulares de gran tamaño (sobre los 5 [mm] de diámetro), observándose una progresiva muerte de células dentro de los aglomerados debido a la limitación al acceso de nutrientes. Se presentaron además dificultades para el manejo de las muestra, introduciendo errores en la cuantificación por la falta de homogeneidad celular en dichas muestras.

Debido a esto se optó por la metodología aquí descrita (adaptar primero a suspensión y luego disminuir el suero), ya que al encontrarse las células creciendo en medio suplementado al 10% SFB, el estrés al ser cambiadas a crecimiento en suspensión manteniendo el porcentaje de suero debiese ser menor, debido a la riqueza del suero en proteínas y factores.

La adaptación se alcanzó tras 4 pasajes creciendo las células en suspensión formando agrupaciones de a lo más 10 células solo visibles al microscopio, con una viabilidad superior al 90%. Finalmente las células obtenidas, adaptadas al crecimiento en suspensión en medio bajo en suero, seguían formando aglomerados, pero estos eran de un tamaño mucho menor a los obtenidos con el enfoque previo.

Para el primer enfoque (reducción de suero y luego adaptación a suspensión) se realizó una prueba de suplementos, agregando solución antiaglomerante a concentración 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , piruvato de sodio a 1x y concentrado de aminoácidos a 1x, se realizó de los respectivos medios a las 48 y 120 horas. Los resultados se presentan en la Figura 12 en donde se aprecia que inicialmente en los tres cultivos bajó la concentración y la viabilidad celular. Se observaron mejorías tras el cambio de medio a las 48 horas, siendo el mejor caso el cultivo creciendo en medio suplementado con los tres compuestos mencionados anteriormente, pero la concentración máxima alcanzada y la viabilidad siguen siendo bajas.

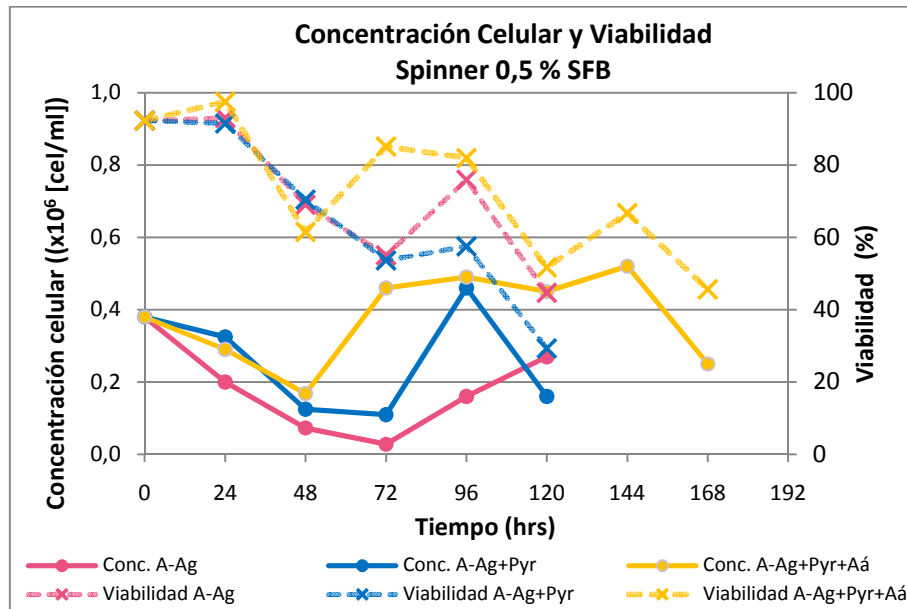


Figura 12: Prueba de adición de suplementos a cultivo en suspensión en spinner con 0,5% de SFB.

El piruvato de sodio es utilizado en los medios de cultivo celular como una fuente de carbono adicional al cual las células pueden acceder fácilmente para la producción de energía, sin requerir inicialmente producir piruvato por la biosíntesis de glucosa o aminoácidos, pudiendo ingresar al ciclo TCA rápidamente ayudando a las células a obtener energía para su crecimiento en las primeras horas de cultivo. En cuanto el concentrado de aminoácidos aporta 12 aminoácidos, varios de ellos esenciales, por lo que las células no pueden sintetizarlos por sí mismas o las rutas de obtención de ellos son largas y energéticamente costosas.

Debido a que el primer enfoque no tuvo resultados positivos en cuanto a concentración y viabilidad celular, junto con la formación de agregados celulares como se mencionó anteriormente. Ya que tampoco se observó mejoría con la adición de los suplementos adicionales, se siguió el segundo enfoque (adaptación a suspensión en medio suplementado con 10% de SFB y luego reducción del porcentaje de suero). Debido a restricciones de tiempo no se realizaron pruebas de crecimiento en suspensión con suplementación de piruvato de sodio y concentrado de aminoácidos para las células finalmente adaptadas y utilizadas. En cambio si se utilizó el antiaglomerante ya que permitía mantener una suspensión homogénea de células minimizando la formación de aglomerados. Sería interesante a futuro realizar pruebas con éstos suplementos para ver el efecto sobre el crecimiento celular en suspensión.

### 3.7. Estado metabólico células creciendo en suspensión con 0,5% SFB

Se realizó la curva de crecimiento para células HEK293 adaptadas a crecer en suspensión en medio bajo en suero. El cultivo se llevo a cabo en un spinner con 100 [mL] de medio operando de modo batch. El medio utilizado fue el medio 2.0 suplementado con 0,5% de SFB, BSA, Intralípidos, Pluronic F-68 y Antiaglomerante a las concentraciones especificadas anteriormente.

En la Figura 13 se observa la etapa de crecimiento exponencial desde las 24 a las 144 horas seguida de una etapa estacionaria. El crecimiento se siguió por 8 días, en los cuales la viabilidad decreció a un 60%, viéndose reflejado además en la disminución del número de células viables.

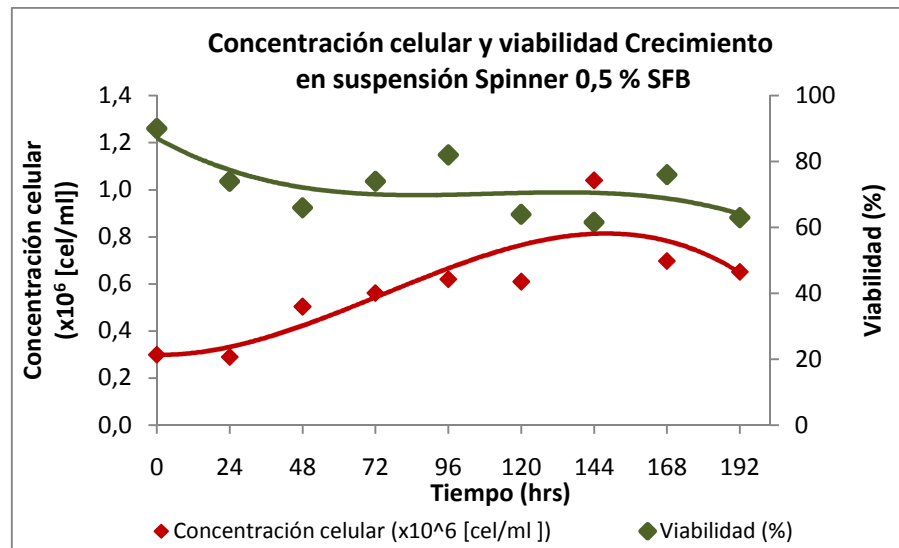


Figura 13: Curva de crecimiento de células HEK293 creciendo en suspensión en spinner en medio al 0,5% SFB.

La velocidad específica máxima de crecimiento fue de 0,0156 [h<sup>-1</sup>], con un tiempo de duplicación de 44,3 horas, y alcanzándose una concentración celular máxima de 1,04x10<sup>6</sup> [cel/mL] a las 144 horas de cultivo.

Respecto a los perfiles de glucosa y lactato que se muestran en la Figura 14 es posible observar la concentración de glucosa disminuye de forma progresiva pero en baja cantidad sin llegar a ser consumida en su totalidad, así como también la concentración de lactato en el medio va aumentando hasta llegar a un máximo de 14,8 [mM], momento en el cual la concentración celular es máxima. Si se comparan estos resultados con los obtenidos para células creciendo

adheridas con la misma concentración de suero (ver Figura 10), las concentraciones de glucosa y lactato observadas en suspensión corresponderían a las que presenta un cultivo en adhesión a aproximadamente las 50 horas de cultivo. La concentración celular en ese tiempo es cercana a  $0,7 \times 10^6$  [cel/mL] (ver Figura 9), siendo similar a la obtenida en el cultivo en suspensión en su máximo crecimiento.

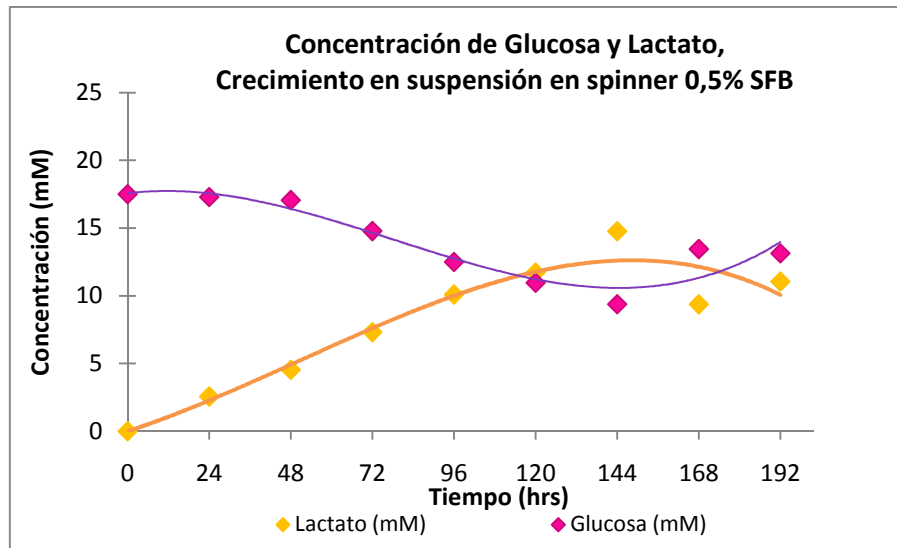


Figura 14: Perfiles de Glucosa y Lactato de células HEK293 creciendo en suspensión en spinner en medio bajo en suero.

El consumo de glucosa corresponde al 46,4% de la glucosa presente en el cultivo, produciéndose además menos lactato, siendo su concentración máxima 49,6% inferior a la alcanzada en el cultivo de células en adherencia en medio con 0,5% de SFB (29,3 [mM]). En dicho cultivo la glucosa se agotaba a las 168 horas.

Al final del cultivo se observa que a las 168 y 192 horas hay un aumento de la concentración de glucosa en el medio, esto podría explicarse por la evaporación del agua presente en el medio o por errores asociados a la técnica de cuantificación de glucosa utilizada. También se podría asumir una liberación de glucosa desde el medio intracelular producto de la muerte celular o por gluconeogénesis, pero no se observa un aumento asociado de concentración de lactato, el cual debiese ser conjuntamente liberado al medio.

Si se compara además la velocidad específica de crecimiento, en suspensión ésta es 18,3% menor de la obtenida en células creciendo adheridas ( $\mu_{\max}= 0,019 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ ), obteniéndose una concentración celular máxima 48% inferior a la alcanzada creciendo adheridas con 0,5% de SFB.

En la Figura 15A se observan las tasas específicas de consumo de glucosa y producción de lactato, las cuales tienen un valor máximo de  $q_{\text{Gluc}}=0,135$  y  $q_{\text{Lac}}=0,351 \text{ [mmol/10}^9 \text{ cel/hr]}$ ). Ambas tasas son al menos tres veces menores a las obtenidas para células creciendo adheridas en medio bajo en suero, lo cual concuerda con el menor consumo/producción de glucosa/lactato, discutidos anteriormente. Dichas tasas se tornan negativas pasadas las 144 horas de cultivo, momento en el cual se aprecia una disminución de la concentración de células entrando luego en la etapa estacionaria. Una tasa de producción de lactato negativa indicaría que las células están consumiendo lactato, lo cual llama la atención debido a que existe glucosa disponible en el medio.

En la Figura 15B se grafica la razón  $\Delta L/\Delta G$  la cual presenta un máximo de 3,51 [mmol/mmol] a las 24 horas de cultivo consecuencia del bajo consumo de glucosa en las primeras horas y de la liberación de lactato acumulado en el cultivo previo. Dicha razón luego toma valores bajo 1,5 hasta el final del cultivo, indicando que la glucosa estaría ingresando al ciclo TCA, no siendo completamente convertida en lactato. Aunque se observa una disminución de la tasa específica de consumo de lactato, alcanzando incluso valores negativos (lo cual indicaría un consumo de lactato), esto no se ve reflejado en la razón  $\Delta L/\Delta G$ . Esto sería producto de las tasas de consumo de glucosa negativas obtenidas al final del cultivo, las cuales cambiarían el signo de dicha razón.

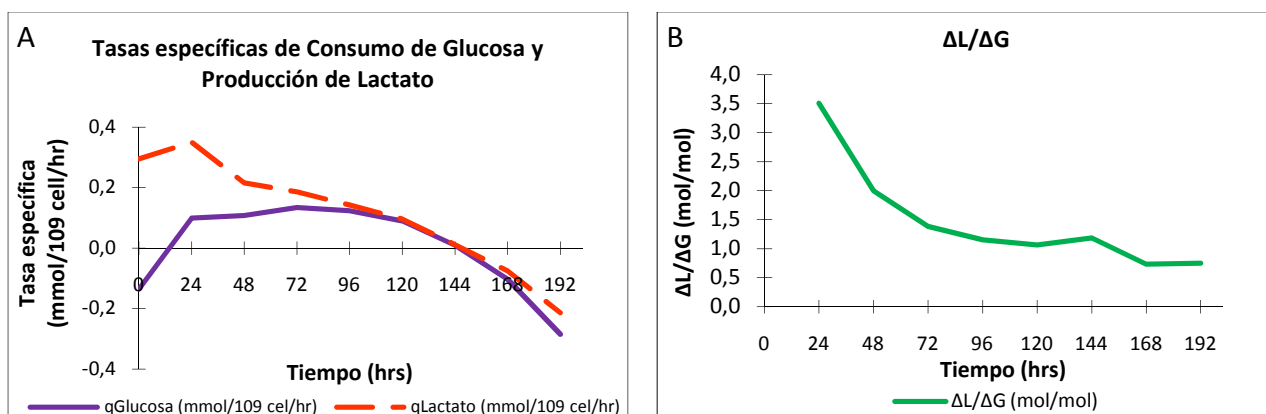


Figura 15: A) Tasas específicas de consumo de glucosa y de producción de lactato. B) Razón entre la tasa de producción de lactato y la tasa de consumo de glucosa para células HEK293 creciendo en suspensión en spinner en medio bajo en suero.

### 3.8. Amplificación de Adenovirus

A partir de un stock purificado del adenovirus Ad-LacZ rotulado con un título de  $9,48 \times 10^{10}$  [ip/ml] se realizó una infección a un MOI de 10 [ip/cel], recuperándose las células 72 horas después de la infección y siguiendo el protocolo de liberación del vector adenoviral (ver Anexo 6.1.9) se obtuvo un primer stock desde el lisado celular.

A partir de este stock se realizaron otras dos infecciones en T-25. Muestras de dichas amplificaciones fueron tituladas obteniendo los títulos que se presentan a continuación.

Tabla 4: Resultados titulación adenovirus.

Titulación	[TCID <sub>50</sub> /ml]	[pfu/ml]
Stock $9,48 \times 10^{10}$	$2,51 \times 10^7$	$5,01 \times 10^6$
Stock $9,48 \times 10^{10}$ _2	$1,70 \times 10^7$	$3,55 \times 10^6$
virus 1	$3,98 \times 10^8$	$7,94 \times 10^7$
virus 2	$7,59 \times 10^6$	$1,51 \times 10^6$
virus 3	$3,16 \times 10^7$	$6,31 \times 10^6$



### 3.9. Caracterización de infección de cultivos creciendo en adhesión

Se caracterizó la infección de células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado con 10% SFB. Para la realización del experimento se utilizaron 14 placas de Petri de 60 [mm] de diámetro, para seguir el crecimiento en duplicado cada 24 horas. La infección fue realizada a un MOI de 10 [pfu/cel] a las 72 horas de cultivo. Este tiempo se eligió a partir de la caracterización previa del crecimiento del cultivo (ver Figura 5), ya que en este punto se alcanza el 70% del crecimiento del cultivo.

Se siguió la infección por 72 horas, tiempo en el cual las células se desprenden completamente a causa del efecto citopático (ver Figura 16). Se observa como a las 24 horas post-infección (hpi) la concentración celular se mantiene constante, decreciendo luego producto del efecto lítico del adenovirus, acompañado de una disminución progresiva de la viabilidad hasta un 45% a las 72 [hpi].

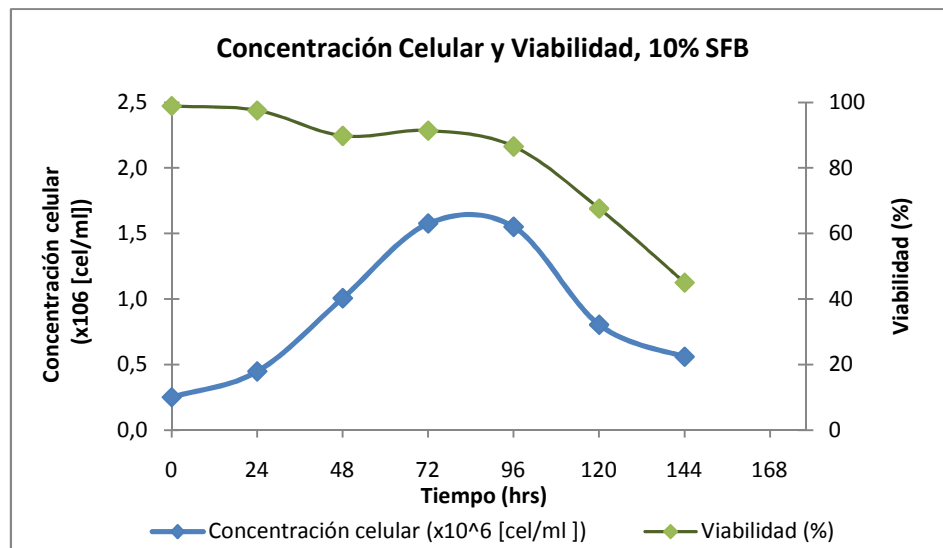


Figura 16: Curva de infección de células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado con 10% SFB. La infección se realizó a las 72 horas de cultivo.

En la Figura 17 se presenta el perfil de consumo de glucosa y de producción de lactato, el cual hasta las 72 horas tiene las mismas características vistas anteriormente para cultivo de células HEK293 creciendo en adherencia en medio con 10% de SFB (ver Figura 6). Luego de la infección realizada a las 72 horas, en la cual se cambia casi totalmente el medio de cultivo, se toma una

muestra a las 73 horas, observándose en el perfil un drástico aumento de la glucosa y disminución del lactato debido al cambio de medio.

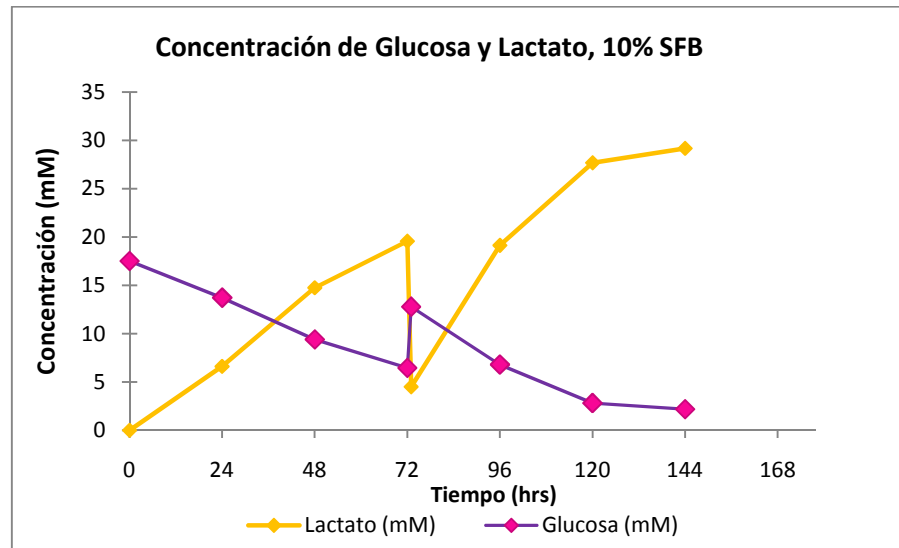


Figura 17: Perfiles de glucosa y lactato para infección de células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado con 10% SFB. La infección se realizó a las 72 horas de cultivo.

En las horas posteriores a la infección se advierte un rápido aumento en la producción de lactato que supera el máximo teórico, quizás por efecto de la liberación de lactato al medio producto del rompimiento de células por la vía lítica del adenovirus, o de la acumulación previa de lactato debido a que el medio no es cambiado completamente en la infección. A pesar de esto, la concentración de lactato en el medio no llega a ser inhibitoria, alcanzando un máximo de 29,2 [mM] a las 72 [hpi].

Aunque no se observa un aumento en la concentración celular después de la infección, es posible ver una disminución en la concentración de glucosa en el medio (ver Figura 17). Esto sería producto del cambio en el metabolismo celular, desplazándose éste hacia las necesidades de producción adenoviral y no al aumento de biomasa.

En la Figura 18A se observa que la máxima tasa de consumo de glucosa se tiene en el inicio de la infección con  $q_{Gluc} = 0,48$  [mmol/10<sup>9</sup> cel/hr], manteniéndose casi constante hasta las 48 [hpi] momento desde el cual decrece volviéndose negativa a las 72 [hpi]. En la misma figura se observa la tasa específica de producción de lactato, la cual también presenta su máximo al inicio

del cultivo, siendo  $q_{Lac} = 0,2$  [mmol/10<sup>9</sup> cel/hr], disminuyendo luego y tornándose negativa pasadas las 48 [hpi], lo que indicaría consumo de lactato para la mantención del metabolismo de las células que aun no se han lisado y para la producción de adenovirus. Esto no se refleja en la razón  $\Delta L/\Delta G$ , la cual pasadas las 48 [hpi] aumenta hasta llegar a 3,6 debido quizás a un cambio de signo de la razón dado que la tasa de consumo de glucosa también es negativa a las 72 [hpi] (ver Figura 18B). El hecho de que hasta las 48 [hpi] se observe que  $\Delta L/\Delta G$  es mayor a 2 no necesariamente implica que el metabolismo sea menos eficiente, ya que en dichas horas debiese haber liberación de lactato al medio producto del ciclo lítico del adenovirus.

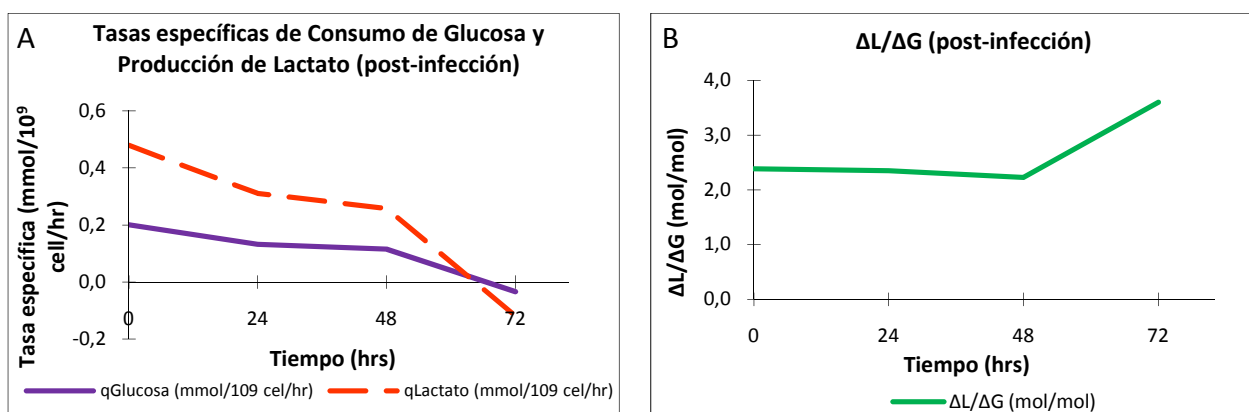


Figura 18: A) Tasas específicas de consumo de glucosa y de producción de lactato. B) Razón entre la tasa de producción de lactato y la tasa de consumo de glucosa para infección células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado al 10% SFB.

Cabe destacar que tanto la tasa máxima de consumo de glucosa, como la de producción de lactato son inferiores en la infección y producción de adenovirus que las vistas en el crecimiento celular. Siendo  $q_{Gluc}$  y  $q_{Lac}$  un 77,7% y 75,4% inferiores que las tasas obtenidas en la caracterización del crecimiento celular a 10% SFB. Pero si se compara el valor de dichas tasas en la producción de adenovirus versus las obtenidas para una etapa similar en crecimiento (en este caso se consideró para el mismo tiempo de cultivo), se obtiene que  $q_{Gluc}$  y  $q_{Lac}$  son, respectivamente, 2,7-4,2 y 4,6-19,1 veces mayores en la producción de adenovirus. Este resultado apoyaría lo expuesto anteriormente, respecto a que existe un cambio en el metabolismo celular el cual se adapta a los requerimientos de la producción de vectores adenovirales.

Posteriormente se realizó la titulación de las muestras de adenovirus extraídas a las 24, 48 y 72 [hpi] para determinar la concentración de virus para cada tiempo. En la Figura 19 se muestra la curva de producción de adenovirus, observándose que la concentración de adenovirus tiene su máximo a las 48 [hpi], con un título de  $16 \times 10^{12}$  [pfu/mL]. Este comportamiento concuerda con lo descrito en bibliografía [11], en donde los máximos títulos virales se registran entre las 36 y 48 [hpi]. Siendo el tiempo óptimo para recolectar las células entre las 36 y 60 [hpi], ya que la disminución en la viabilidad celular culmina en la lisis celular a las 72 [hpi].

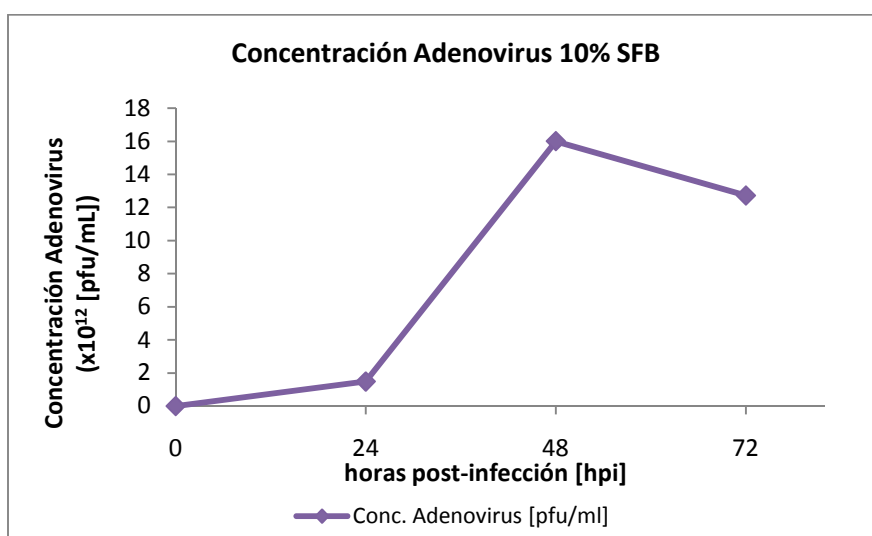


Figura 19: Curva de producción de adenovirus en células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado al 10% SFB.

También se caracterizó la infección de células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado con 0,5% SFB, BSA e Intralípidos. La infección fue realizada a un MOI de 10 a las 96 horas de cultivo, debido a que en la caracterización previa del crecimiento del cultivo (ver Figura 9) el 70% del crecimiento del cultivo se alcanza en dicho momento.

Sin embargo el crecimiento celular fue mayor al esperado, por lo que las células fueron infectadas cuando se encontraban a una concentración cercana a  $2,5 \times 10^6$  [cel/mL]. De la Figura 20 se observa una considerable baja en la concentración celular a las 120 horas (24 [hpi]), aumentando levemente a las 144 horas (48 [hpi]), quizás como consecuencia de que no todas las células fueron infectadas inicialmente. Luego, hacia el final del cultivo (72 [hpi]), la densidad

celular decrece a  $0,6 \times 10^6$  [cel/mL], presentando una viabilidad del 22,6%, indicando que existe lisis de células infectadas, ya que en situaciones de concentración de glucosa y lactato similares la disminución de la viabilidad y concentración celular no fue tan dramática como la aquí observada.

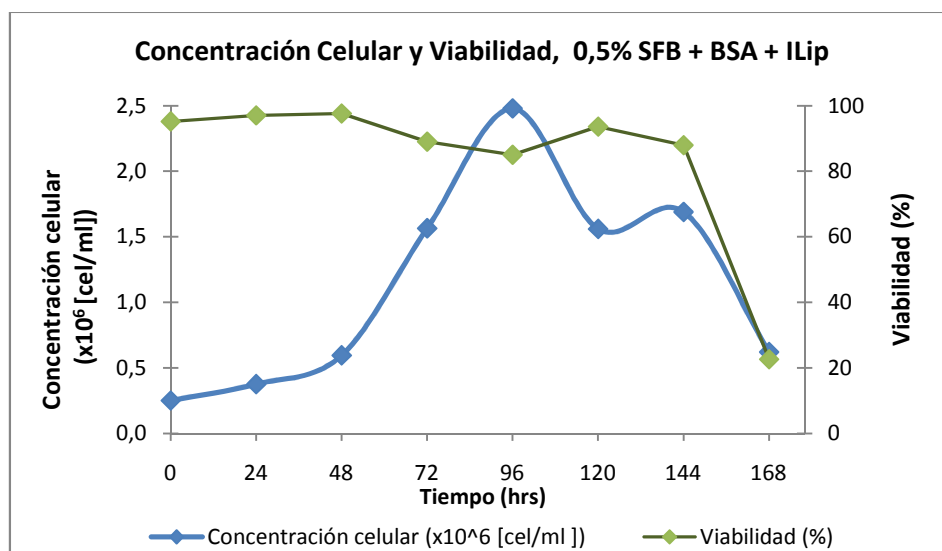


Figura 20: Curva de infección de células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado con 0,5% SFB. La infección se realizó a las 96 horas de cultivo.

Respecto al perfil de consumo de glucosa y de producción de lactato, estos tienen características muy similares a las presentadas para la infección de células al 10% SFB, salvo que se realizaron las infecciones en días diferentes (ver Figura 17 y Figura 21). Debido a esto hay un mayor consumo de glucosa y producción de lactato, pero las concentraciones de glucosa y lactato alcanzadas al final del cultivo (72 [hpi]) son casi las mismas, sin llegar a agotarse la glucosa y manteniendo la concentración de lactato por debajo de niveles inhibitorios.

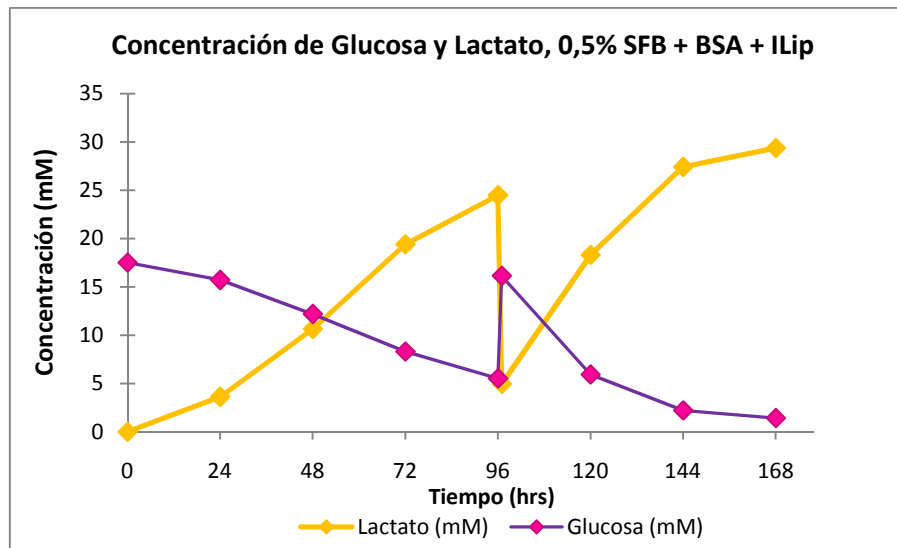


Figura 21: Perfil de glucosa y lactato para infección de células HEK293 creciendo adheridas en medio suplementado con 0,5% SFB. La infección se realizó a las 97 horas de cultivo.

De la Figura 22A se observa que la máxima tasa de consumo de glucosa se tiene en el inicio de la infección con  $q_{Gluc} = 0,243$  [mmol/10<sup>9</sup> cel/hr], decreciendo luego hasta las 48 [hpi] momento desde el cual se mantiene muy cercana a cero y casi constante por 24 horas. En la misma figura se observa la tasa específica de producción de lactato, la cual alcanza su máximo a las 24 [hpi], siendo  $q_{Lac} = 0,313$  [mmol/10<sup>9</sup> cel/hr], disminuyendo luego y tornándose negativa pasadas las 48 [hpi].

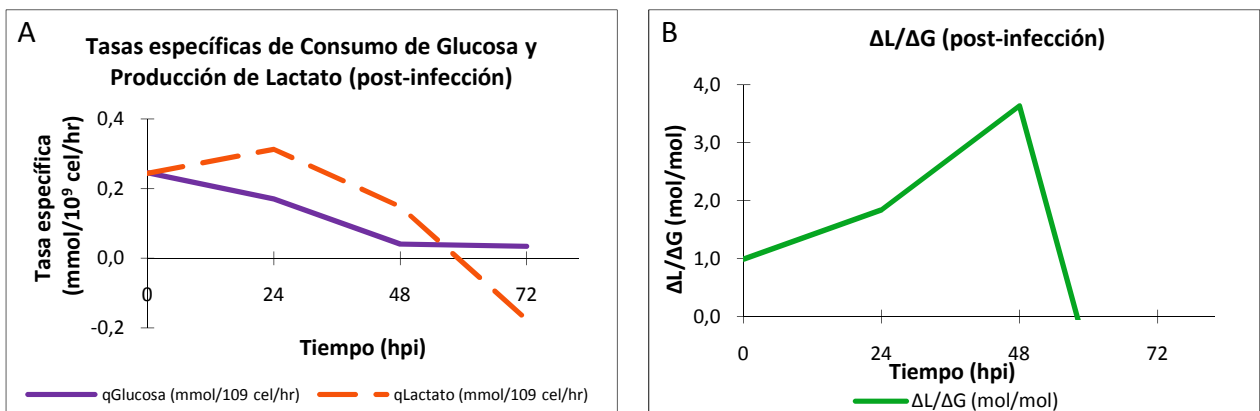


Figura 22: A) Tasas específicas de consumo de glucosa y de producción de lactato. B) Razón entre la tasa de producción de lactato y la tasa de consumo de glucosa para infección de células HEK293 creciendo adheridas en medio bajo en suero.

En la Figura 22B se observa que la razón  $\Delta L/\Delta G$  tiene un valor máximo de 3,6 a las 48 [hpi]. Los altos valores de esta razón se relacionan con la disminución de la concentración celular y de viabilidad celular, ya que al lisarse las células infectadas estarían liberando el lactato acumulado en su interior al sobrenadante.

Sin embargo en las últimas horas de cultivo se observa que la tasa de producción de lactato se vuelve negativa, junto con un violento descenso de la razón  $\Delta L/\Delta G$ , por lo que el lactato estaría siendo consumido para mantener la producción de adenovirus, ya que en la biomasa no se ve un incremento.

Nuevamente se destaca que tanto la tasa máxima de consumo de glucosa, como la de producción de lactato, son inferiores en la infección y producción de adenovirus que las vistas en el crecimiento celular. Siendo  $q_{Gluc}$  y  $q_{Lac}$  un 47,9% y 78,2% inferiores que las tasas obtenidas en la caracterización del crecimiento celular en bajo suero. Pero al igual a lo expuesto para la infección del caso base, si se comparan las tasas de consumo/producción de glucosa/lactato en una etapa similar de crecimiento, se obtiene que  $q_{Gluc}$  y  $q_{Lac}$  son, respectivamente, 1,4-2,4 y 1,7-5,5 veces mayores en la producción de adenovirus.

En la Figura 23 se observa la curva de producción de adenovirus por células HEK293 creciendo adheridas en medio bajo en suero. Se aprecia que la concentración máxima de adenovirus se presenta a las 24 [hpi] con  $12,8 \times 10^{12}$  [pfu/mL], pero con una posterior disminución de la concentración de adenovirus en las horas siguientes post-infección (ver datos con mayor detalle en Tabla 5).

**Tabla 5: Resumen cuantificación producción adenovirus en células HEK293.**

Titulación hrs post-infeccion [hpi]	Conc. Adenovirus ( $\times 10^{12}$ [pfu/mL])		Conc. Adenovirus ( $\times 10^4$ [pfu/cel])	
	0,5% SFB	10% SFB	0,5% SFB	10% SFB
0	0,00002	0,00002	0,001	0,001
24	12,8	1,5	822	95
48	0,012	16,0	0,70	1994
72	0,0004	12,7	0,07	2278

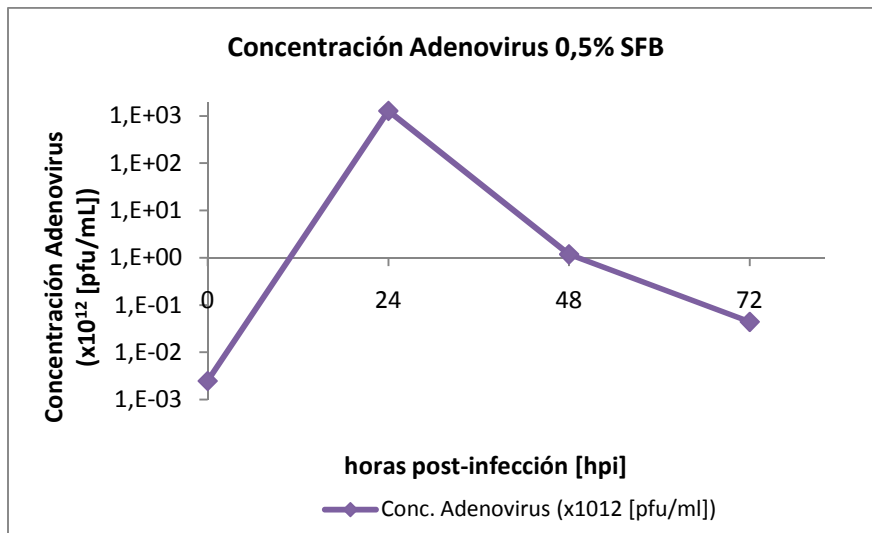


Figura 23: Curva de producción de adenovirus en células HEK293 creciendo adheridas en medio bajo en suero.

Entre las diferencias que presenta este caso, respecto al caso base, es que la infección fue realizada cuando la concentración celular era cercana a  $2,5 \times 10^6$  [cel/mL], o sea un 55% mayor que en la infección de células creciendo adheridas en medio suplementado al 10% SFB. Esto puede haber incidido en la difusión e integración del adenovirus, debido a la mayor concentración de células como también a la densidad celular, ya que como se explicó anteriormente las células creciendo en bajo suero tienden a formar aglomerados dificultando el contacto con el virus. También es importante considerar la presencia de metabolitos inhibitorios en el medio, como lactato y amonio.

Al infectar cultivos con concentración celular mayor a  $1 \times 10^6$  [cel/mL] se recomienda el cambio de medio en el momento de infección o la adición de glucosa y aminoácidos en modo fed-batch, con el fin de mantener el crecimiento celular y obtener una buena productividad del cultivo y minimizar la producción de lactato [10, 11]. Para concentraciones mayores a  $2 \times 10^6$  [cel/mL] se recomienda incluso el cambio de medio a las 24 [hpi]. También se ha descrito el uso de medios no amoniagénicos, en los cuales en vez de la glutamina se agrega glutamato al medio para reducir la producción de amonio como subproducto [9, 32].



### 3.10. Infección de cultivo en suspensión

Se realizó la caracterización del estado metabólico en la producción de adenovirus para un cultivo creciendo en suspensión en spinner con medio bajo en suero. Para esto se inoculó un spinner con  $0,3 \times 10^6$  [cel/mL] en 100 [mL] de medio 2.0 suplementado con 0,5% SFB, BSA, Intralípidos, Pluronic F-68 y Antiaglomerante, utilizando las concentraciones previamente descritas.

En la Figura 24 se muestra la curva de infección de células creciendo en suspensión, las cuales fueron infectadas a un MOI 10 a las 96 horas de cultivo. La concentración celular máxima alcanzada fue de  $0,87 \times 10^6$  [cel/mL], mientras que la viabilidad presenta valores bajo 60% posterior a la infección.

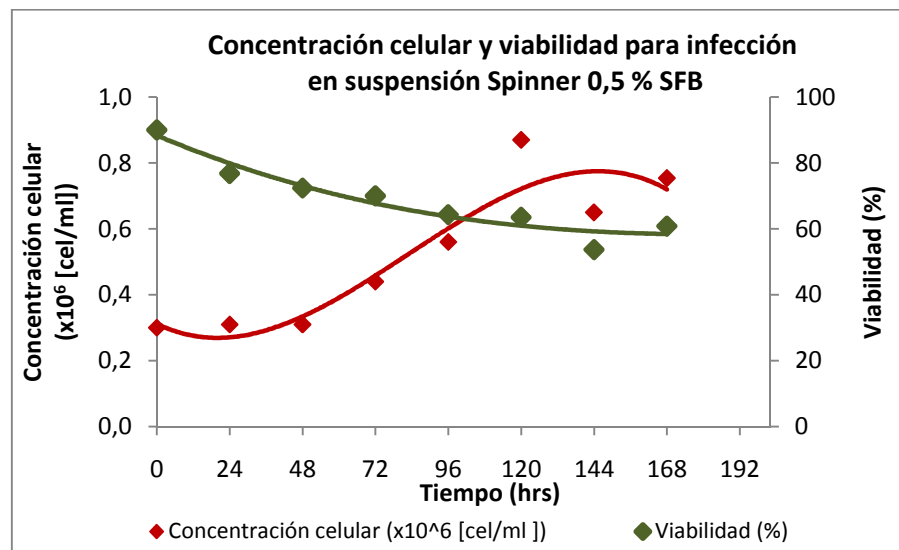


Figura 24: Curva de infección de células HEK293 creciendo en suspensión en spinner con medio suplementado con 0,5% SFB. La infección se realizó a las 96 horas de cultivo.

En el perfil de concentración de glucosa y lactato (ver Figura 25) se observa una leve disminución de la glucosa en el medio durante la etapa de crecimiento, junto con una producción moderada de lactato. En las horas posteriores a la infección se observa un gran consumo de glucosa entre las 144 y 168 horas (48 y 72 [hpi]), junto con un aumento en la concentración de lactato en el medio.

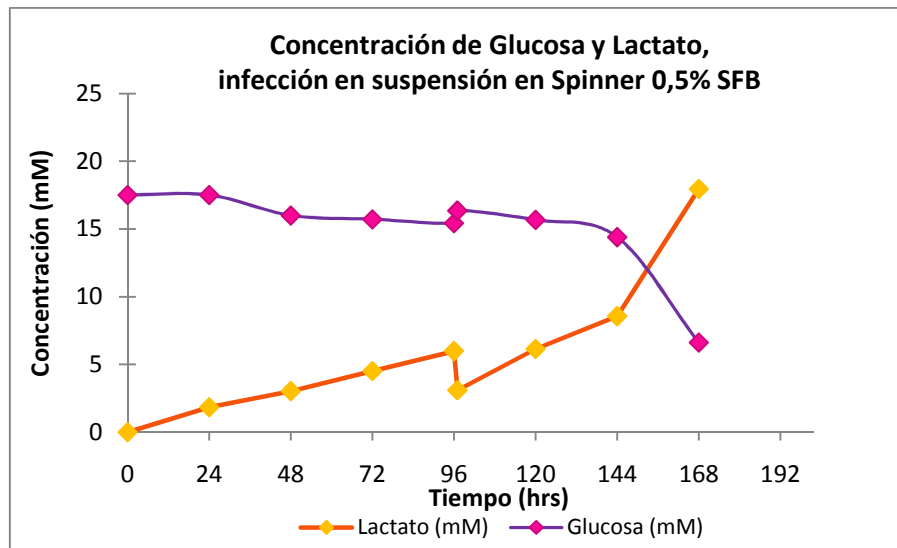


Figura 25: Perfil de glucosa y lactato para infección de células HEK293 creciendo en suspensión en spinner en medio suplementado con 0,5% SFB. La infección se realizó a las 96 horas de cultivo.

En la Figura 26A se presentan las tasas específicas de consumo de glucosa y producción de lactato, las cuales presentan su valor máximo a las 72 [hpi], en donde  $q_{\text{Gluc}} = 0,926$  y  $q_{\text{Lac}} = 0,516$  [mmol/10<sup>9</sup> cel/hr]. Ambas curvas son crecientes en el tiempo, observándose un brusco aumento en el consumo de glucosa a las 48 [hpi], sin incidir mayormente en la producción de lactato. La razón  $\Delta L/\Delta G$  era de 0,75 luego de la infección, aumentando posteriormente hasta un máximo de 3,9 a las 48 [hpi] (ver Figura 26). Pasadas las 48 [hpi] la razón  $\Delta L/\Delta G$  disminuye a 0,56.

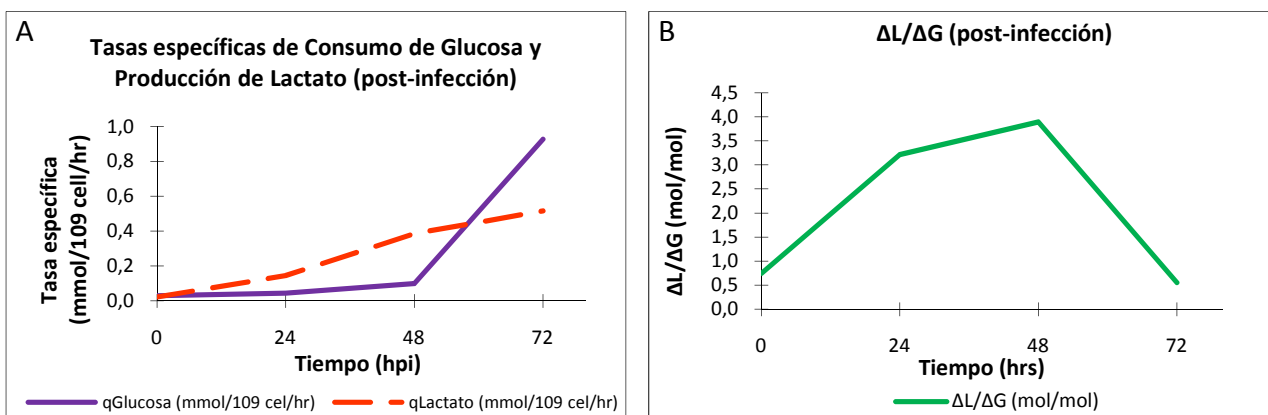


Figura 26: A) Tasas específicas de consumo de glucosa y de producción de lactato. B) Razón entre la tasa de producción de lactato y la tasa de consumo de glucosa para infección de células HEK293 creciendo en suspensión en spinner en medio bajo en suero.

El brusco aumento en el consumo de glucosa estaría destinado a la producción de adenovirus y no a biomasa, ya que a esa altura del cultivo se observa que la concentración celular disminuyó.

A continuación en la Tabla 6 se presenta un resumen de los resultados y parámetros obtenidos del estado metabólico de células HEK293, en crecimiento y producción de adenovirus en suspensión. Se observa que la tasa de consumo de glucosa es mucho mayor en la producción de adenovirus, debido a los requerimientos de la célula para su mantención y producción de virus. Pero por lo visto en la razón  $\Delta L/\Delta G$  luego de una producción inicial de lactato, la cual estaría más influida por la liberación de lactato en la lisis que por la producción de éste, baja la tasa de producción de lactato, observándose además una disminución en la razón  $\Delta L/\Delta G$  que llevaría a pensar en un consumo de lactato por parte de las células al haber una mayor disponibilidad de éste en el medio en comparación con la glucosa que se agotaba en el medio de cultivo.

Tabla 6: Resumen parámetros y resultados obtenidos para la producción de adenovirus en células creciendo en suspensión.

	Crecimiento	Producción Adv	Aumento/Reducción
$\mu_{\max}$ [ $\text{hr}^{-1}$ ]	0,0156	-	-
$t_d$ [hr]	44,3	-	-
$q_{\text{Glucosa}}$ [ $\text{mmol}/10^9 \text{ cel/hr}$ ]	0,135	0,926	+588%
$q_{\text{Lactato}}$ [ $\text{mmol}/10^9 \text{ cel/hr}$ ]	0,351	0,516	+47,1%
$\Delta L/\Delta G$ máx. [ $\text{mmol}/\text{mmol}$ ]	3,5	3,9	+11,1%
Concentración celular máx. alcanzada [ $\times 10^6 \text{ cel/mL}$ ]	1,04	0,87	-16,4%
Concentración lactato máx. alcanzada [mM]	14,8	17,9	+20,9%

### 3.11. Medición de Niveles de Enzimas claves del metabolismo del carbono

Se cuantificaron los niveles de proteínas intracelulares, en específico de enzimas que intervienen en el metabolismo celular. Se utilizaron anticuerpos para identificar la cantidad de las enzimas *Fosfofructoquinasa* (PFK), *Lactato Deshidrogenasa* (LDH), *Piruvato Deshidrogenasa* (PDH), y  $\alpha$ -*Ketoglutarato Deshidrogenasa* ( $\alpha$ -KGD) presentes al interior de las células. La elección de estas enzimas se justifica en el rol que ellas cumplen en el metabolismo del carbono en la glicólisis y ciclo TCA. Se cuantificó la PFK en la glicólisis, LDH en la conversión de piruvato a lactato, PDH en el ingreso de piruvato al ciclo TCA y  $\alpha$ -KGD en el ciclo TCA.

Se realizaron pruebas preliminares para determinar la concentración del anticuerpo primario a ser utilizada, para lo cual se usaron células HEK293 creciendo en medio suplementado con 10% de SFB.

De las diluciones recomendadas para el stock de anticuerpo, siendo el rango de dilución de 1:30 a 1:30.000, se testearon inicialmente diluciones de 1:500, 1:1.000 y 1:3.000.

En el caso del anticuerpo anti-LDH la dilución no fue suficiente, saturándose y obteniendo valores de absorbancia sobre 2. Por lo que se repitió el ensayo, haciendo diluciones de 1:5.000 y 1:7.000, con las cuales se seguía saturando, por lo que se probaron diluciones 1:15.000 y 1:30.000. Finalmente, para cada caso se eligieron las diluciones de anticuerpo que se muestran a continuación.

Tabla 7: Diluciones de Anticuerpo primario utilizadas.

Dilución	$\alpha$ -KGD	LDH	PDH	PFK
1:500			X	X
1:1.000	X			
1:30.000		X		

Los experimentos se realizaron por sextuplicado, dada la gran variabilidad y error observado en los experimentos preliminares. A pesar de esto, fue necesario discriminar datos que presentaban valores negativos al restar el valor de fondo de las muestras control.

De la Figura 27 se aprecia que las enzimas PFK y LDH tienen mayor presencia en crecimiento al 10% SFB, mientras que la cantidad de PDH y  $\alpha$ -KGD es similar en 0,5 y 10% de SFB. Este resultado concuerda parcialmente con el obtenido a través del MFA proveniente de un trabajo previo [25], en el cual se utilizaron los mismos suplementos para el medio libre de suero (ver Figura 28).

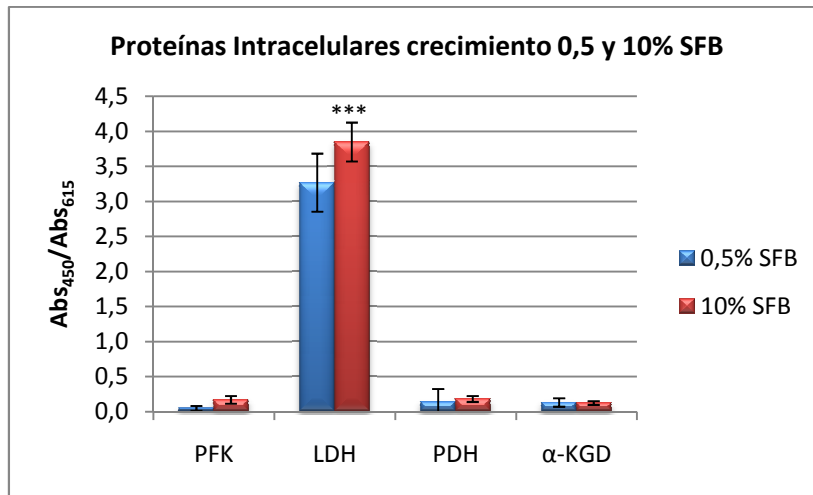


Figura 27: Comparación de niveles de enzima para células creciendo en medio suplementado al 0,5% SFB y 10% SFB. (\*\*\*:  $P < 0,01$ ).

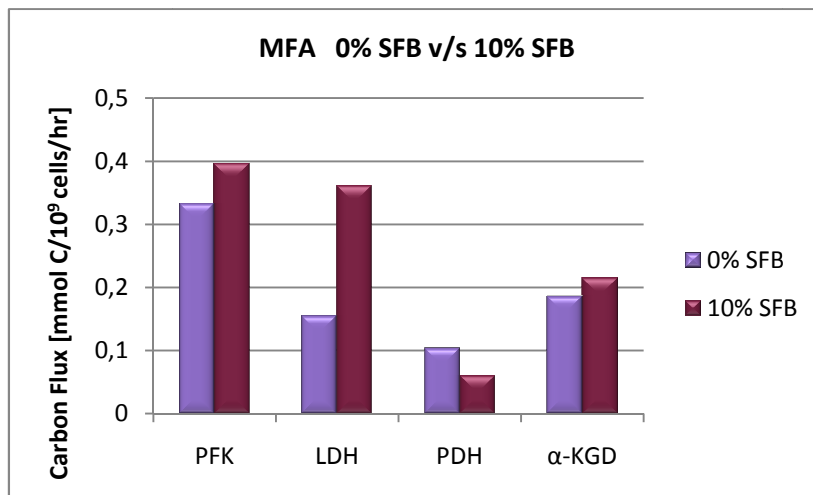


Figura 28: Comparación flujo de carbono entre células creciendo en medio libre de suero y a 10% SFB.

La mayor presencia de las enzimas PFK y LDH mostrada en la Figura 27 concuerda con el resultado obtenido anteriormente en la caracterización del estado metabólico (ver Tabla 3), en donde se observa que  $q_{\text{Gluc}}$  y  $q_{\text{Lac}}$  son mayores para el caso base de células creciendo en medio suplementado con 10% de SFB respecto a las crecidas en medio con 0,5% de SFB. Debido a que la PFK es una enzima regulatoria de la glicólisis, una mayor cantidad de ella puede ser relacionada a un mayor consumo de glucosa. Mientras que una mayor cantidad de LDH estaría asociada a una mayor conversión de piruvato a lactato, por lo que se observaría una mayor producción de lactato por parte de las células.

Por los errores presentados en el gráfico de barras, se realizó adicionalmente un análisis estadístico con un test ANOVA para ver si existían diferencias significativas entre los resultados de las distintas condiciones experimentales utilizadas. Se encontró que las diferencias entre las cantidades de enzima entre 0,5 y 10% de SFB sólo fueron significativas en el caso de la LDH, en donde aplicando un post-test de Bonferroni se obtuvo que tiene un  $P < 0,01$ .

Se debe tener en cuenta que los valores de flujo de carbono fueron extraídos de diagramas como el que se presenta en la Figura 29, los cuales se realizan a partir de una representación simplificada del metabolismo celular a través de ecuaciones, y en donde por ejemplo, se reduce la glicólisis a una reacción desde glucosa a piruvato, sin considerar todas las reacciones intermedias ni otras vías metabólicas asociadas al metabolismo del carbono. Por lo que la medición de una de las tantas enzimas involucradas puede no ser representativa, a menos que se trate de una enzima limitante de la vía, es por esto que se eligió la PFK debido que es una enzima altamente regulada de la glicólisis. Además, el MFA muestra los flujos de carbono efectivos por la vía, mientras que la medición de los niveles de una enzima no nos entrega información acerca de su actividad.

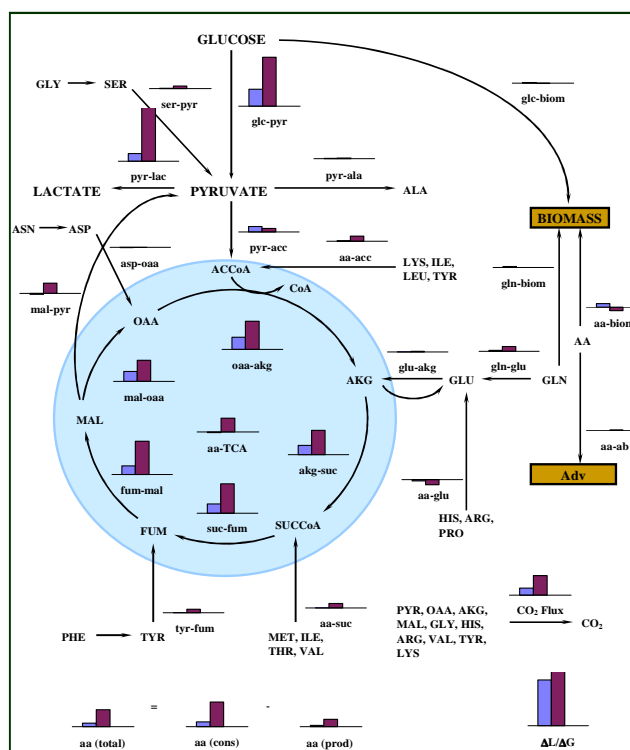


Figura 29: Análisis de Flujo de Metabólico para células en estado de crecimiento (celeste) y en producción de Adenovirus (morado), cultivadas en spinner en medio 0% SFB.

Se realizó además la medición de enzimas intracelulares para células HEK293 creciendo en medio bajo en suero, para comparar sus niveles de enzimas en el crecimiento y en la producción de adenovirus. Es importante recordar que al infectar las células, éstas comienzan a redondearse y desprenderse de la placa, por lo que se incubaron aproximadamente 15 horas, antes de que fuese visible efecto citopático en ellas.

De la Figura 30 se aprecia que el nivel de la enzima LDH es mayor durante el crecimiento que en la producción de adenovirus, resultado que discrepa con lo observado en el MFA (ver Figura 31). En cuanto a las otras enzimas estudiadas los resultados no son concluyentes debido al gran error que presentan y la invalidez de resultados, por lo que no se presentan.

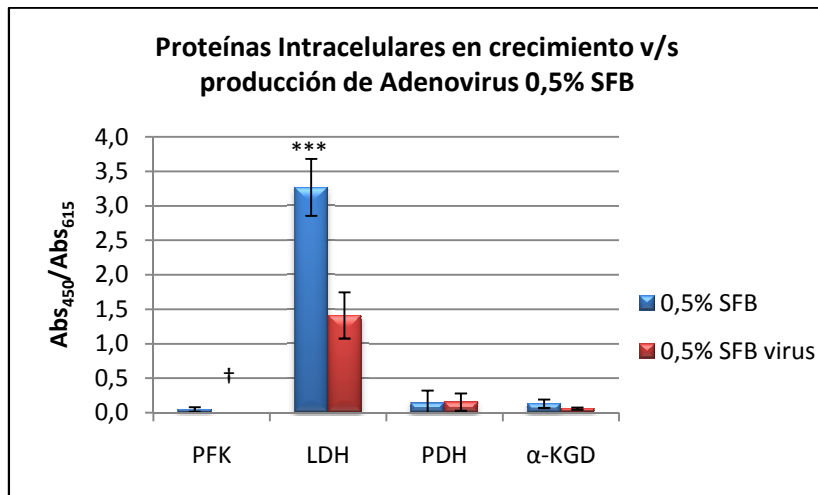


Figura 30: Comparación de enzimas para células en medio suplementado al 0,5% SFB en crecimiento y en producción de Adenovirus. (\*\*\*:  $P < 0,01$ ; †: resultado no disponible).

Según la Figura 30 la enzima LDH se encuentra en mayor cantidad durante el crecimiento celular que durante la producción de adenovirus. Esto no concuerda con lo observado en la caracterización del estado metabólico en la producción de adenovirus, en donde se obtuvo una mayor producción de lactato en esta etapa, siendo  $q_{Lac}$  4,4-19,9 veces mayor en producción de adenovirus respecto a la tasa observada en el crecimiento celular. Sin embargo, se debe considerar que gran parte del lactato presente en el medio es consecuencia de la liberación de éste al medio extracelular a causa del efecto citopático y posterior lisis de las células, el cual aun no se presenta a las 15 [hpi]. Debido a esto podría haberse obtenido una cantidad de LDH inferior a la esperada en la producción de adenovirus, pudiendo también pensarse en que una baja concentración de la enzima responde a una mejor metabolización de la glucosa para la generación de las partículas adenovirales, bajando la generación de lactato como metabolito secundario.

En la Figura 31 se observa que según el MFA el flujo de carbono es mayor durante la producción de adenovirus, contrario a lo observado en Figura 30. Aunque hay que tener en cuenta que en el MFA el lactato se encuentra representado por la ecuación de producción de lactato por la conversión de piruvato, sin considerar la aparición de éste por lisis celular. Por lo que el resultado obtenido de la medición de la LDH indicaría que la presencia de lactato en el medio es producto de la lisis celular a causa de la infección con adenovirus y no de una mayor concentración de la LDH. Aportando información valiosa para el entendimiento del



metabolismo celular en la producción de adenovirus, y que debido a los supuestos considerados en el diseño de ecuaciones utilizadas en el MFA no se podía apreciar.

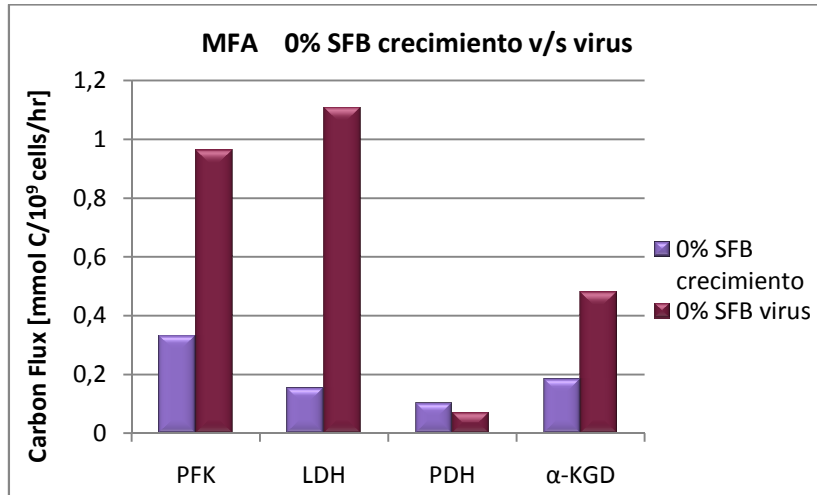


Figura 31: Comparación flujo de carbono para células en medio libre de suero en crecimiento y en producción de Adenovirus.

Otro punto que debe ser mencionado es que de los anticuerpos primarios utilizados sólo el correspondiente a la enzima LDH era de tipo monoclonal, mientras que para las otras enzimas utilizadas éstos eran policlonales. Es claro ver en la Figura 27 y Figura 30, que la medición de esta enzima siempre fue posible, mostrando niveles superiores a los de las otras enzimas estudiadas. Este resultado es esperable, debido a la alta especificidad y afinidad de este tipo de anticuerpos [31], visible además en la alta dilución utilizada respecto a los otros anticuerpos en cuestión (ver Tabla 2). Sería aconsejable utilizar anticuerpos monoclonales en posteriores estudios para obtener resultados con mayor precisión.

## 4. Conclusiones

Se obtuvo un banco de células de trabajo HEK293 creciendo en adhesión en medio con 10% de SFB. Se determinó que éstas crecen con una velocidad específica máxima de  $0,0317 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ , alcanzando una concentración celular máxima de  $2,24 \times 10^6 \text{ [cel/mL]}$ .

Es posible reducir los requerimientos de SFB de células HEK293 en cultivo mediante la adición de suplementos, logrando además cultivos homogéneos en adhesión por medio de la utilización de placas cebadas. Se logró la adaptación de células HEK293 a crecer en un medio reducido en suero, suplementado con 0,5% de SFB, BSA e intralípidos, para las cuales se alcanzó una concentración celular de  $2 \times 10^6 \text{ [cel/mL]}$  con  $\mu_{\text{máx}}^{0,5\%} = 0,019 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ , siendo un 36,5% inferior a  $\mu_{\text{máx}}^{10\%}$ , obteniendo una concentración máxima celular un 10,7% menor que en el crecimiento con 10% de SFB. La reducción del 95% de suero permite una buena aproximación en términos de definir el medio con un porcentaje de certeza aceptable para posteriores análisis metabólicos.

Las tasas máximas de consumo de glucosa y producción de lactato obtenidas en crecimiento fueron  $q_{\text{Gluc}, 10\%}^{\text{máx, crec}} = 0,901$ ,  $q_{\text{Lac}, 10\%}^{\text{máx, crec}} = 1,948$ ,  $q_{\text{Gluc}, 0,5\%}^{\text{máx, crec}} = 0,466$  y  $q_{\text{Lac}, 0,5\%}^{\text{máx, crec}} = 1,433 \text{ [mmol/10}^9 \text{ cel/hr]}$ , ambas tasas fueron inferiores para el medio bajo en suero. En las dos condiciones descritas se observó que al agotarse la glucosa las células comenzaban a consumir lactato como fuente de carbono alternativa para la mantención del metabolismo, ya que no se observó aumento en la concentración celular. Luego, el consumo de glucosa y producción de lactato es mayor en el medio suplementado con 10% de SFB.

En las células infectadas con adenovirus a un MOI de 10 [pfu/ml] se observó una disminución en la viabilidad a un 23% y 45%, para células infectadas en medio con 10% y 0,5% de SFB, respectivamente, indicando que en ambos casos la infección siguió un ciclo lítico. Se obtuvieron  $q_{\text{Gluc}, 10\%}^{\text{máx, inf}} = 0,201$ ,  $q_{\text{Lac}, 10\%}^{\text{máx, inf}} = 0,479$ ,  $q_{\text{Gluc}, 0,5\%}^{\text{máx, inf}} = 0,244$  y  $q_{\text{Lac}, 0,5\%}^{\text{máx, inf}} = 0,313 \text{ [mmol/10}^9 \text{ cel/hr]}$ , siendo menores a las tasas máximas obtenidas de la caracterización de las células en crecimiento. Al comparar las tasas de producción de lactato y consumo de glucosa durante la producción de adenovirus con las presentadas en un tiempo de cultivo equivalente, se obtuvo que durante la etapa de producción de adenovirus ambas tasas son mayores, con  $q_{\text{Gluc}}$  y  $q_{\text{Lac}}$  2,7-4,2 y 4,6-19,1 veces mayores para células en medio con 10% SFB, y 1,4-2,4 y 1,7-5,5 veces mayores en medio con 0,5% de SFB. Debido a que hay consumo de glucosa sin aumentar la biomasa, se concluye que hay un cambio en el metabolismo celular, adaptándose éste a las necesidades de la

---

$\mu_{\text{máx}}^{x\%}$ , velocidad específica máxima de crecimiento en medio con x% de SFB.

$q_{\text{Bi}, x\%}^{\text{máx, Cj}}$ , tasa específica máxima de  $B_i$ ,  $i \in \{\text{"consumo de glucosa"}, \text{"producción de lactato"}\}$ , para células en medio con x% de SFB durante  $C_j$ ,  $j \in \{\text{"crecimiento"}, \text{"infección"}\}$ .

producción de adenovirus.

Se alcanzó mayor producción de adenovirus en medio con 10% SFB, en donde se obtuvo  $16 \times 10^{12}$  [pfu/mL] a las 48 [hpi]. En el caso de células en medio bajo en suero, éstas se infectaron a una alta concentración de  $2,5 \times 10^6$  [cel/mL], obteniendo un título de  $12 \times 10^{12}$  [pfu/mL] a las 24 [hpi] decreciendo en las horas posteriores. El menor título se debería al “efecto de densidad celular” o a la acumulación de metabolitos inhibitorios.

Se logró adaptar células HEK293 a crecer en suspensión en spinner en medio suplementado al 10% SFB, las que luego se adaptaron a crecer en medio con 0,5% de SFB más la adición de BSA, intralípidos, Pluronic F-68 y antiaglomerante. Se obtuvo que  $\mu_{\text{máx}}^{0,5\%}$  fue  $0,0156$  [ $\text{h}^{-1}$ ] alcanzando una concentración celular de  $0,87 \times 10^6$  [cel/mL], con  $q_{\text{Gluc}} = 0,135$  y  $q_{\text{Lac}} = 0,351$  [mmol/ $10^9$  cel/hr] en el crecimiento celular. Estos valores son menores a los obtenidos en células creciendo adheridas, tanto en caso base como en el medio bajo en suero. Entonces, en suspensión tanto el crecimiento como el consumo de glucosa y producción de lactato es inferior que en el crecimiento en adhesión.

En la producción de adenovirus en suspensión  $q_{\text{Gluc}, 0,5\%}^{\text{máx, inf}}$  y  $q_{\text{Lac}, 0,5\%}^{\text{máx, inf}}$  fueron  $0,926$  y  $0,516$  [mmol/ $10^9$  cel/hr], respectivamente, siendo 3,8 y 1,6 veces mayores a las tasas obtenidas en la infección en células adheridas.

De la comparación de los niveles de enzimas que intervienen en el metabolismo celular con los resultados teóricos entregados por el MFA, sólo se obtuvo diferencias estadísticamente significativas para la LDH en los dos casos estudiados. En el caso de la comparación de crecimiento entre 10% y 0,5% de SFB, los resultados obtenidos por ELISA concuerdan con el MFA, ya que la cantidad de enzima y el flujo de carbono en el crecimiento con 10% de SFB son mayores. Luego, la mayor producción de lactato en 10% SFB se explica por un mayor flujo de carbono y una mayor cantidad de LDH.

En cuanto a la comparación del crecimiento y producción de adenovirus en bajo suero, según el MFA hay un mayor flujo de carbono hacia la producción de lactato durante la producción de adenovirus, mientras que la medición de la LDH indica lo contrario. Según esto, la mayor concentración de lactato no estaría dada por una mayor producción de éste, sino por la liberación de lactato al medio producto de la lisis celular. Se concluye que el aumento de lactato en la infección no se debe a un mayor flujo de carbono ni a una mayor cantidad de LDH, sino a la liberación de lactato al medio por lisis celular.

Finalmente los resultados obtenidos permitirán un mejor entendimiento del comportamiento de células HEK293, y de sus requerimientos nutricionales en cultivo y producción de adenovirus.

## 5. Referencias

1. Martinez V, Gerdtzen ZP, Andrews BA, Asenjo JA. Viral vectors for the treatment of alcoholism: use of metabolic flux analysis for cell cultivation and vector production. *Metab Eng* 2010; **12**: 129-37.
2. Segura MM, Kamen A, Garnier A. Downstream processing of oncoretroviral and lentiviral gene therapy vectors. *Biotechnol Adv* 2006; **24**: 321-37.
3. Ferrer-Miralles N, Vazquez E, Villaverde A. Membrane-active peptides for non-viral gene therapy: making the safest easier. *Trends Biotechnol* 2008; **26**: 267-75.
4. Meneses-Acosta A, Dormond E, Jacob D, Tom R, Bernier A, Perret S *et al.* Development of a suspension serum-free helper-dependent adenovirus production system and assessment of co-infection conditions. *J Virol Methods* 2008; **148**: 106-14.
5. Nadeau I, Garnier A, Cote J, Massie B, Chavarie C, Kamen A. Improvement of recombinant protein production with the human adenovirus/293S expression system using fed-batch strategies. *Biotechnol Bioeng* 1996; **51**: 613-23.
6. Henry O, Perrier M, Kamen A. Metabolic flux analysis of HEK-293 cells in perfusion cultures for the production of adenoviral vectors. *Metab Eng* 2005; **7**: 467-76.
7. Iyer P, Ostrove JM, Vacante D. Comparison of manufacturing techniques for adenovirus production. *Cytotechnology* 1999; **30**: 169-72.
8. Zhang C, Ferreira TB, Cruz PE, Alves PM, Hauray M, Carrondo MJ. The importance of 293 cell cycle phase on adenovirus vector production. *Enzyme and Microbial Technology* 2006; **39**: 1328-1332.
9. Ferreira TB, Carrondo MJ, Alves PM. Effect of ammonia production on intracellular pH: Consequent effect on adenovirus vector production. *J Biotechnol* 2007; **129**: 433-8.
10. Nadeau I, Jacob D, Perrier M, Kamen A. 293SF metabolic flux analysis during cell growth and infection with an adenoviral vector. *Biotechnol Prog* 2000; **16**: 872-84.
11. Nadeau I, Kamen A. Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotechnol Adv* 2003; **20**: 475-89.
12. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Fifth edn Wiley-Liss, 2005.
13. Kretzmer G. Industrial processes with animal cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; **59**: 135-42.
14. Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 1999; **10**: 440-7.
15. Hakkarainen T, Hemminki A. Enhancement of cancer gene therapy with modified viral vectors and fusion genes. *Gene Therapy and Molecular Biology* 2005; **9**: 153-168.
16. Danthinne X, Imperiale M. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Therapy* 2000: 1707-14.
17. Volpers C, Kochanek S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med* 2004; **6**: 164-71.
18. Liu H, Liu XM, Li SC, Wu BC, Ye LL, Wang QW *et al.* A high-yield and scaleable adenovirus vector production process based on high density perfusion culture of HEK 293 cells as suspended aggregates. *J Biosci Bioeng* 2009; **107**: 524-9.
19. Kamen A, Henry O. Development and optimization of an adenovirus production process. *J Gene Med* 2004; **6**: 184-92.
20. Liu CH, Wu PS. Optimization of adenoviral production in human embryonic kidney cells using response surface methodology. *J Biosci Bioeng* 2007; **103**: 406-11.

21. Mittereder N, March KL, Trapnell BC. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol* 1996; **70**: 7498-509.
22. Mather JP, Roberts PE. *Introduction to cell and tissue culture : theory and technique*, Plenum Press: New York, 1998.
23. Negrete A, Ling TC, Lyddiatt A. Production of adenovirus vectors and its recovery. *Process Biochemistry* 2007; **42**: 1107-1113.
24. Higuchi K. Cultivation of animal cells in chemically defined media, a review. *Adv Appl Microbiol* 1973; **16**: 111-36.
25. Martínez V. Optimización del cultivo de células HEK293 en suspensión para su crecimiento y producción de adenovirus. Memoria Título Ingeniero civil en Biotecnología, Universidad de Chile, Santiago, 2007.
26. Ugai H, Yamasaki T, Hirose M, Inabe K, Kujime Y, Terashima M *et al*. Purification of infectious adenovirus in two hours by ultracentrifugation and tangential flow filtration. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **331**: 1053-60.
27. Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: Serum-free cell culture. *ALTEX* 2003; **275**-281.
28. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*, 3rd edn Worth Publishers: New York, 2000.
29. Stephanopoulos G, Aristidou AA, Nielsen JH. *Metabolic engineering : principles and methodologies*, Academic Press: San Diego ; London, 1998.
30. Masters JRW. *Animal cell culture : a practical approach*, 3rd edn Oxford University Press: Oxford; New York, 2000.
31. Mercado S. Optimización del cultivo de células embrionarias de riñón humano (HEK-293) para la producción de anticuerpos monoclonales anti-factor de necrosis tumoral (TNF). Memoria Título Ingeniero civil en Biotecnología, Universidad de Chile, Santiago, 2009.
32. Shen CF, Voyer R, Tom R, Kamen A. Reassessing Culture Media and Critical Metabolites that Affect Adenovirus Production. *Biotechnol. Prog.* 2010; **26**: 200-207.

## 6. Anexos

### 6.1. Protocolos

#### 6.1.1. Preparación de reactivos y suplementos utilizados

##### 6.1.1.1. Medio 2.0

Preparación de Medio DMEM/F12 (1:1) High glucose (Gibco), para cultivo de células HEK293. Para la elaboración de 2 L de medio 2.0 se procede de la siguiente forma:

- 1) En un matraz Erlenmeyer con capacidad para 2 litros se prepara el medio agregando los siguientes compuestos, adicionando agua MilliQ.

Compuesto	Cantidad
DMEM (alto en glucosa)	1 sobre
F12	10,626 [g]
Bicarbonato de sodio	4,877 [g]
Acido ascórbico	0,04 [g]
Putrescina	0,002 [g]
Pluronic F68	0,4 [g]
Etanolamina	200 [μL]
Selenito de sodio	2 [μL] de stock 5 [g/L]
Mercaptoetanol	3,3 [μL]
Penicilina/Estreptomicina	10 [mL]

- 2) Se mezcla utilizando un agitador magnético y se ajusta a pH 7.0 adicionando HCl o NaOH según sea necesario.
- 3) Se filtra en unidad de filtración previamente autoclavada y se distribuye en botellas estériles de 250 ó 500 [mL].
- 4) Agregar 100 [μL] de Apotransferrina (de stock 25 [g/L]) cada 500 [mL] de medio.

### **6.1.1.2. Albúmina de suero bovino (BSA)**

Para preparar solución stock de BSA a concentración 40 [g/L]:

- 1) Autoclavar botella de 50 [mL] con un agitador magnético en su interior.
- 2) Pesar 1,6 [g] de BSA sobre papel (previamente puesto por unos minutos bajo luz ultravioleta) en balanza cerrada (limpiada previamente con etanol 70%).
- 3) Colocar papel con BSA bajo luz ultravioleta por 5 minutos.
- 4) Bajo campana de flujo laminar colocar el BSA en la botella autoclavada y agregar 40 [mL] de PBS estéril.
- 5) Mezclar sobre plancha magnética con adición de calor, entibiar para disolver el BSA.

Notas:

Este procedimiento se efectúa debido a que la proteína es de gran tamaño, por lo cual no se puede filtrar y se denaturaría al ser autoclavada.

Se deben hacer pruebas posteriores para confirmar la esterilidad de la solución.

### **6.1.1.3. Dexametasona**

Para preparar una solución stock con concentración 1 [mg/mL]:

- 1) Agregar 1 [mL] de etanol absoluto por cada 1 [g] de dexametasona.
- 2) Revolver suavemente para disolver.
- 3) Filtrar utilizando una jeringa con un filtro de 0,2 [ $\mu$ m].
- 4) Alicuotar y almacenar a -20 °C. Soluciones de dexametasona son estables al menos por 30 días a 4 °C protegidas de la luz.

#### **6.1.1.4. Apotransferrina**

Preparación de un stock de apotransferrina (APO) a una concentración de 25 [g/L].

- 1) Disolver 100 [mg] de APO en 4 [mL] de PBS.
- 2) Mezclar con agitador magnético (previamente autoclavado), con aplicación de calor para entibiar la solución.
- 3) Filtrar la solución utilizando una jeringa con un filtro de 0,2 [ $\mu\text{m}$ ].
- 4) Alicuotar en tubos de 1,5 [mL] estériles.
- 5) Almacenar a -20 °C.

#### **6.1.1.5. Cristal Violeta**

Preparación de solución de Cristal Violeta 0,1% [p/p] en ácido cítrico (0,1 [M]), utilizado para teñido y conteo de núcleos.

- 1) Preparar ácido cítrico 0,1 [M] en un vaso precipitado, disolviendo 2,1 [g] de ácido cítrico monohidratado en 100 [mL] de agua destilada.
- 2) Preparar una solución de cristal violeta 0,1% [p/p] disolviendo 0,1 [g] de cristal violeta en 100 [mL] de ácido cítrico 0,1 [M] preparado previamente.
- 3) Agitar con un agitador magnético. Si el cristal violeta no se encuentra completamente disuelto filtrar los cristales con papel filtro.
- 4) Transferir a una botella de 100 [mL], almacenar a 4 °C.

Nota: Limpiar cualquier salpicadura de cristal violeta con etanol.

#### **6.1.1.6. Trypan Blue 0.2% en PBS**

- 1) Se prepara un stock de trypan blue 1% [p/v], agregando 5 [g] de trypan blue en 500 [mL] de PBS.
- 2) Colocar en botella y disolver utilizando agitador magnético, guardar a 4 °C.
- 3) Para conteo celular utilizar solución de trypan blue al 0,2% disolviendo en PBS. Almacenar a temperatura ambiente.



#### **6.1.1.7. Tripsina/EDTA**

En una botella con 250 [mL] de PBS estéril se agregan 4 [mL] de solución de Tripsina al 4% y 2,5 [mL] de solución EDTA al 2% (ambas previamente preparadas, filtradas y almacenadas a -20 °C). La solución de Tripsina/EDTA 1:50 se mantiene a -20 °C.

#### **6.1.2. Protocolo de descongelamiento de células desde nitrógeno líquido**

Para células HEK293 congeladas en tubos de 1,8 [mL] en nitrógeno líquido. Se debe realizar el siguiente procedimiento:

- 1) Se deja el tubo de 1,5 [mL] en baño a 37°C por 3 minutos o hasta que se descongele completamente el medio.
- 2) Se pone tubo de centrifuga de 15 [mL].
- 3) Se agrega lentamente 1 [mL] de medio tibio por mL de células congeladas y se mezcla por inversión.
- 4) Se deja por 5 minutos en baño de 37°C.
- 5) Se agrega medio hasta doblar el volumen.
- 6) Se deja por 5 minutos en baño a 37°C.
- 7) Luego se agrega medio hasta duplicar el inicial en el tubo. Invertir para mezclar.
- 8) Se pasan las células a T-75 y se agrega medio tibio hasta completar los 24 [mL] dentro del t-flask.

#### **6.1.3. Protocolo de pasaje celular (subcultivo)**

Para el caso de T-75 el procedimiento a seguir es:

- 1) Se extrae el medio de cultivo del t-flask utilizando una pipeta pasteur estéril con ayuda de una bomba peristáltica.
- 2) Se agregan 4 [mL] de PBS para lavar la superficie.
- 3) Se extrae el PBS utilizando una pipeta pasteur estéril con ayuda de una bomba peristáltica.
- 4) Se agrega 1 [mL] de EDTA-Tripsina 1:50 en PBS.

- 5) Se incuba a 37°C entre 3 a 5 minutos.
- 6) Se detiene la tripsinación agregando 8 [mL] de medio al 10% SFB (completando 9 [mL]). Con mucho cuidado utilizando la pipeta se homogeniza el medio para eliminar aglomerados celulares.
- 7) Si se están cultivando las células en un medio bajo 10% SFB se coloca el medio con células en un tubo de centrifuga de 15 [mL] y se centrifuga por 7 min a 10.000 rpm para remover la tripsina (Centrífuga Boeco C-28, rotor 1619). En el caso de estar trabajando con un medio al 10% SFB se saltan los pasos 7 y 8.
- 8) Se elimina el medio y se resuspende las células en 9 [mL] del medio en el que se están cultivando.
- 9) Se tienen 2 T-75 previamente marcados para realizar el pasaje. A cada uno de estos t-flask se les agregan 3 [mL] desde el t-flask que contiene 9 [mL] o del tubo de centrifuga de 15 [mL] (en el caso de estar cultivándolas en un medio con un suplemento menor a 10 % SFB).
- 10) Finalmente se agregan 21 [mL] de medio a cada t-flask (completando los 24 [mL] de medio) y se dejan en incubadora a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. No olvidar marcar en el t-flask original el cambio de pasaje.

Es importante realizar todo el procedimiento bajo campana de flujo laminar en estrictas condiciones de esterilidad. Además de todos los reactivos a utilizar dejarlos previamente en un baño a 37°C para no causar estrés a las células.

El procedimiento anterior para el caso de células HEK293 se debe realizar día por medio o cuando las células se encuentren 70-80 % confluentes.

#### **6.1.4. Protocolo de congelamiento celular**

Para el caso de T-75 y células HEK293. Se comienza realizando los pasos 1 a 7 (incluso si se está trabajando con un medio al 10% SFB) del protocolo anterior, luego:

- 8) Se elimina el sobrenadante y se resuspende en 1 [mL] (cada  $1 \times 10^6$  [cel]) de medio de cultivo con 20% SFB suplementado con un 10% de DMSO estéril.
- 9) Se distribuye en tubos para congelar con capacidad de 1,8 [mL] cada uno, previamente rotulados con tipo de células, medio de cultivo, pasaje, fecha, cantidad de células y nombre del usuario.
- 10) Se dejan inmediatamente los tubos en hielo (4 °C) y luego se dejan por 24 horas a -80°C.
- 11) Pasadas las 24 horas se dejan en nitrógeno líquido.

Es recomendable después de 24 horas congeladas las células en nitrógeno líquido, elegir un tubo al azar y descongelarlo para hacer un análisis de viabilidad.

#### **6.1.5. Protocolo de cálculo de concentración celular y viabilidad para células creciendo adheridas**

Para el caso de T-25 y células HEK293:

- 1) Se extrae el medio de cultivo del t-flask. utilizando una pipeta Pasteur estéril con ayuda de una bomba peristáltica.
- 2) Se agregan 2 [mL] de PBS.
- 3) Se extrae el PBS, que se utiliza para lavado, utilizando una pipeta Pasteur estéril con ayuda de una bomba peristáltica.
- 4) Se agregan 0,5 [mL] de Tripsina 1:50 en PBS.
- 5) Se deja incubando a 37 °C entre 3 a 5 minutos.
- 6) Se detiene la tripsinación agregando 2 [mL] de medio al 10% SFB. Con mucho cuidado utilizando la pipeta estéril se homogeniza el medio.
- 7) Se extraen 100 [μL] y se guardan en un tubo eppendorf de 1,5 [mL]; se agregan 100 [μL] de Trypan Blue al 0,1% y se homogenizan pipeteando suavemente.

- 8) Se agregan 20 [μL] de la mezcla anterior en un hemocitometro y bajo un microscopio se cuentan tanto las células vivas como las muertas (las muertas se visualizan azules y las vivas blancas).

La concentración celular se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Concentración celular} = \text{células contadas} \times \frac{\text{Dilución}}{\text{n}^\circ \text{ campos contados}} \times 10000$$

En este caso la dilución es 2.

La viabilidad corresponde a la razón entre las células vivas y las células totales (suma entre vivas y muertas).

Cuando se está siguiendo el crecimiento celular el protocolo se realiza una o dos veces al día por el total de días que las células presentan una viabilidad mayor o igual al 50%. Para el caso de células HEK293 creciendo adheridas en medio DMEM/F12 suplementado al 10% con SFB corresponden a aproximadamente 12 días. Y en suspensión a aproximadamente 8 días.

#### **6.1.6. Protocolo placas cebadas**

Este protocolo se utiliza para la preparación de placas petri o botellas de cultivo a ser utilizadas para el crecimiento de células HEK293 adaptadas a bajo suero, con el fin de evitar la formación de aglomerados celulares. Pasos a seguir para una T-25:

- 1) Se inocula una T-25 con células creciendo en medio suplementado con 10% SFB y se deja incubando a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.
- 2) Una vez que las células han alcanzado confluencia, se extrae el medio de cultivo de la placa utilizando una pipeta Pasteur estéril con ayuda de una bomba peristáltica.
- 3) Se agregan 2 [mL] de PBS para lavar la superficie.
- 4) Se extrae el PBS utilizando una pipeta Pasteur estéril con ayuda de una bomba peristáltica.
- 5) Se agregan 0,5 [mL] de Tripsina/EDTA 1:50 en PBS.
- 6) Se deja incubando a 37°C entre 2 a 4 minutos.

- 7) Se detiene la tripsinación agregando 4 [mL] de medio al 10% FBS. Utilizando la pipeta estéril se homogeniza el medio, poniendo atención en despegar la mayor cantidad de células de la T-25.
- 8) Se extrae el medio con células utilizando una pipeta Pasteur estéril con ayuda de una bomba peristáltica.
- 9) Luego se lava 2 veces con 3 [mL] de PBS, extrayendo el PBS por medio de una pipeta Pasteur estéril con ayuda de una bomba peristáltica.
- 10) Se agregan 4 [mL] de PBS y se coloca en la incubadora a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, y se reserva para su posterior uso.
- 11) Cuando se vaya a utilizar, extraer el PBS utilizando una pipeta Pasteur estéril con ayuda de una bomba peristáltica y lavar una vez con 2 [mL] de PBS.

#### **6.1.7. Protocolo de subcultivo de células en suspensión**

- 1) Agregar 100 [mL] de medio a 37 °C en un spinner.
- 2) Agregar un inóculo de  $2-5 \times 10^5$  [cel/mL] desde un cultivo en la etapa exponencial de crecimiento.
- 3) Colocar el spinner sobre agitador magnético con agitación de 80-100 rpm. Incubar a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub> con una tapa lateral aflojada..
- 4) Monitorear el crecimiento diariamente tomando una muestra a través de uno de los brazos laterales.
- 5) Después de 3-4 días extraer el medio con células y centrifugar las células a 1.000 rpm por 7 minutos.
- 6) Eliminar la mayor parte del sobrenadante y resuspender las células en un pequeño volumen del medio antiguo.
- 7) Inocular el(los) spinner(s) a la concentración deseada, conservar 20-30% del medio antiguo y completar con medio fresco.

### **6.1.8. Protocolo de cálculo de concentración celular y viabilidad para células creciendo en suspensión**

Sacar dos muestras de 1 [mL], rotular una de ellas como pre-tripsina (PreT) y otra como post-tripsina (PostT).

#### **i. Muestra PreT**

- 1) Contar viabilidad con Trypan Blue colocando 20 [μL] en hemocitómetro.
- 2) Resto centrifugar por 7 min a 1.000 rpm.
- 3) Retirar sobrenadante.
- 4) Resuspender en igual volumen con Cristal Violeta, incubar por 5 min en baño de agua a 37 °C, agitar en vórtex por 1 min.
- 5) Contar número de células poniendo 20 [μL] en hemocitómetro.

#### **i. Muestra PostT**

- 1) Centrifugar 7 min a 1.000 rpm.
- 2) Remover sobrenadante.
- 3) Agregar 100 [μL] de Tripsina/EDTA 1:50.
- 4) Colocar por 5-30 min en incubadora agitando suavemente cada 5 min (dependiendo del tamaño del aglomerado).
- 5) Resuspender con cuidado.
- 6) Centrifugar 7 min a 1.000 rpm.
- 7) Retirar sobrenadante.
- 8) Resuspender en 1 [mL] de medio al 10% SFB.
- 9) Contar viabilidad con Trypan Blue colocando 20 [μL] en hemocitómetro.
- 10) Resto centrifugar por 7 min a 1.000 rpm.
- 11) Retirar sobrenadante.
- 12) Resuspender en igual volumen con Cristal Violeta, incubar por 5 min en baño de agua a 37 °C, agitar en vórtex por 1 min.
- 13) Contar número de células poniendo 20 [μL] en hemocitómetro.

Se promedian los valores de viabilidad y número de células obtenidos para las muestras PreT y PostT.

### **6.1.9. Protocolo Propagación de Adenovirus (protocolo modificado por Casilda Mura PhD)**

#### **i. Infección de células HEK293**

- 1) Cultivar células HEK293 en placas o t-flasks hasta alcanzar 80-90% de confluencia a las 12 horas antes de la infección.
- 2) Antes de la infección, remover el medio casi totalmente y agregar un volumen de virus en 1 ml de medio DMEM/F12 con 5% SFB. Mezclar bien.
- 3) Incubar a 37 °C en 5% CO<sub>2</sub> por 90 minutos.
- 4) Agregar el resto del medio, para completar 10 [ml] si es una T-25 o 20 [ml] para una T-75.
- 5) Incubar entre 48, 72 o más horas dependiendo del efecto citopático: las células se redondean y comienzan a soltarse. Esto es el resultado de la replicación de las partículas adenovirales.
- 6) Colectar las células por medio de un rastrillo para células cuando 30-50% de ellas estén desprendidas.
- 7) Transferir las células a un tubo de centrifuga de 15 [ml], centrifugar 5 min a 500-700 rpm. Remover 5 [ml] de un T-25 o 10 [ml] de un T-75 del sobrenadante y guardar a -80 °C para su uso como control para verificar si está o no desprovisto de virus.

#### **i. Liberación del vector adenoviral**

- 1) Obtener las partículas virales por 3 o 4 ciclos de congelamiento y descongelamiento de las células, a -80 °C y 37 °C respectivamente, para liberar los virus de las células. Estos lisados se mantienen infectivos por un año a -80 °C en el medio original.
- 2) Descartar los restos celulares por centrifugación a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Las partículas virales se recuperan del sobrenadante. Guardar en alícuotas para futuras infecciones o titulaciones.

### 6.1.10. Titulación

Se utilizó un método biológico de cuantificación de adenovirus, el cual permite medir la capacidad infectiva del stock adenoviral. El método utilizado corresponde al Método de las diluciones limitantes o Dosis infectiva 50 (TCID<sub>50</sub>, Tissue Culture Infectious Dose 50). Se procede de la siguiente forma:

- 1) Se preparan células HEK293 a una concentración de  $1 \times 10^5$  [cel/mL] en medio suplementado con 2% SFB.
- 2) En una placa de 96 pocillos se depositan 100 [μL] en cada pocillo.
- 3) Una vez adheridas las células (o al día siguiente) se les agrega 100 [μL] de medio fresco a las columnas control (columnas #1 a #2), en las siguientes columnas agregar las diluciones de adenovirus realizadas a partir de 100 [μL] del stock ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  o las que correspondan según el caso).
- 4) Incubar la placa por 10 días a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.
- 5) Después de 10 días se leen las placas utilizando un microscopio invertido, observando pocillo por pocillo la presencia de efecto citopático (CPE). Marcar como positivos todos los pocillos que presenten CPE, independiente de la magnitud de este.
- 6) Se determina el promedio de positivos por columna.

El ensayo es válido si el control negativo no presenta ningún CPE o problemas de crecimiento celular y la menor dilución presenta un 100% de infección, mientras la mayor dilución presenta un 0% de infección.

El título (T) se determina utilizando el método estadístico de Spearman-Kärber, donde:

$$T = 10^{1+d(S-0,5)} \quad [TCID_{50}/mL]$$

d= Log<sub>10</sub> de la dilución inicial. (Siendo 1 para una dilución de 10 veces)

S= la suma de los promedios. (Siempre comenzando desde la primera dilución  $10^{-1}$ , aunque esta no haya sido testeada directamente)

Si en la placa se omitieron algunas de las diluciones menores, como  $10^{-1}$  ellas también tienen que ser incluidas con promedio de 1.

Además se puede llevar a unidades de [pfu/ml] usando:  $T = 10^{(1+d(S-0,5))-0,7}$  [pfu/mL]



#### **6.1.11. Protocolo de infección en T-25.**

Este protocolo se utiliza para la amplificación inicial de adenovirus; se trabaja con células HEK293 y en T-25. Pasos a seguir:

- 1) Se inocula una T-25 con  $1 \times 10^5$  [cel/cm<sup>2</sup>] y se deja incubando a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Pasadas aproximadamente 3 horas las células ya se encuentran completamente adheridas al t-flask.
- 2) Cuando las células se encuentran adheridas al t-flask se extrae el medio de cultivo con ayuda de una pipeta Pasteur y una bomba peristáltica.
- 3) Se agregan 1,5 [mL] de medio fresco a la T-25.
- 4) Se agrega un volumen viral tal que se realiza una infección a un MOI de 10.
- 5) Se deja incubar por una hora con agitación cada 10 minutos.
- 6) Se agregan 6,5 [mL] de medio fresco y se dejan incubar a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

#### **6.1.12. Protocolo de infección para células en suspensión.**

Este protocolo se utiliza para la amplificación de adenovirus; se trabaja con células HEK293 creciendo en suspensión. Pasos a seguir:

- 1) Se extrae el medio a un Spinner de 200 [mL] con  $1 \times 10^6$  [cel/mL]
- 2) Se agregan 37,5 [mL] de medio fresco y se deja incubando a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.
- 3) Se agrega un volumen viral tal que se realiza una infección a un MOI de 10 (10 partículas infecciosas por célula).
- 4) Se deja incubar por una hora con agitación.
- 5) Se agregan 162 [mL] de medio fresco y se dejan incubar a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.

### 6.1.13. Protocolo de cuantificación de Glucosa.

Para cuantificar glucosa se utiliza el kit “Labkit GLUCOSE GOD-PAP”. Los pasos a seguir son:

- 1) Se preparan los reactivos: disolviendo el reactivo 2 en el reactivo 1. Esta solución monorreactiva es estable hasta la fecha indicada en la etiqueta a 2-8 °C y protegida de la luz (el reactivo 1 corresponde a un buffer y el 2 a la solución enzimática).
- 2) Se utiliza glucosa a 5 [g/L] en agua destilada como estándar.
- 3) Se prepara un blanco con 1 [mL] de reactivos.
- 4) Se prepara un estándar con 10 [μL] de glucosa y 1 [mL] de reactivo.
- 5) Se prepara la muestra con 10 [μL] de muestra y 1 [mL] de reactivo.
- 6) Todas mezclas anteriores se incuban 5 minutos a 37 °C.
- 7) Se mide la absorbancia a 505 nm (490-550) contra el blanco. (El color es estable por 30 minutos).

Se calcula la concentración de Glucosa:

$$\text{Glucosa [mg/dL]} = \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs estándar}} \times \text{concentración del estándar}$$

$$[\text{mg/dL}] \times 0,0555 = [\text{mmol/L}]$$

Si la concentración de glucosa es mayor a 500 [mg/dL] se debe diluir la muestra con solución salina y repetir el procedimiento.

### 6.1.14. Protocolo de cuantificación de Lactato.

Se utilizó el kit de Randox L-LACTATE (LAC) PAP “Enzymatic Determination of L-Lactate” en base a la enzima lactato oxidasa. Los pasos a seguir son:

- 1) Se colocan 1000 [μL] de reactivo en una cubeta y se agregan 10 [μL] de muestra.
- 2) Se utiliza el reactivo como blanco y se realiza un estándar agregando 10 [μL] de calibrador a una cubeta con 1000 [μL] de reactivo.
- 3) Se mezclan las cubetas por inversión.
- 4) Se incuba a 37 °C por 5 min.

5) Se mide la absorbancia a 550 nm.

Cálculo de concentración de lactato:

$$\text{Lactato [mg/l]} = \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs estándar}} \times \text{Concentración del estándar [mg/l]}$$

#### **6.1.15. Protocolo medición proteínas intracelulares**

Se utiliza el kit de Thermo Scientific “In-Cell ELISA Colorimetric Detection Kit”. Después de preparar la cantidad necesaria de reactivos, según se especifica en el manual del kit, los pasos a seguir son los siguientes:

##### **i. Ensayo ELISA**

- 1) En una placa de 96 pocillos agregar 100 [μL] de células a cada pocillo a una concentración de 10<sup>5</sup> [cel/mL]. Incubar las placas por la noche a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.
- 2) Remover el medio y agregar 100 μL de formaldehído 4% a cada pocillo. Incubar la placa bajo campana a temperatura ambiente por 15 minutos.
- 3) Remover el formaldehído y lavar la placa 2 veces con 100 [μL/pocillo] de 1X TBS.
- 4) Remover 1X TBS, agregar 100 [μL/pocillo] de 1X Permeabilization Buffer e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Remover Permeabilization Buffer y lavar 1 vez con 100 [μL/pocillo] de 1X TBS.
- 6) Remover 1X TBS, agregar 100 [μL/pocillo] de Quenching Solution e incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
- 7) Remover Quenching Solution lavar 1 vez con [μL/pocillo] de 1X TBS.
- 8) Remover 1X TBS, agregar 100 [μL/pocillo] de Blocking Buffer e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 9) Remover Blocking Buffer y agregar 50 [μL/pocillo] de anticuerpo primario. Colocar un sello plástico a la placa e incubar por la noche a 4 °C.
- 10) Remover la solución de anticuerpo primario y lavar la placa 3 veces con 100 [μL/pocillo] de 1X Wash Buffer.

- 11) Remover Wash Buffer y agregar 100 [ $\mu\text{L}$ /pocillo] de Diluted HRP Conjugate. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 12) Remover Diluted HRP Conjugate y lavar la placa 3 veces con 200 [ $\mu\text{L}$ /pocillo] de 1X Wash Buffer.
- 13) Remover Wash Buffer y agregar 100 [ $\mu\text{L}$ /pocillo] de TMB Substrate. Incubar a temperatura ambiente protegido de la luz. Detener la reacción a los 15 minutos o cuando se alcance el color azul deseado.
- 14) Agregar [ $\mu\text{L}$ /pocillo] de TMB Stop Solution. Medir la absorbancia a 450 nm ( $A_{450}$ ) dentro de los 30 minutos de detenida la reacción.

## ii. Teñido de células

- 1) Vaciar el contenido de la placa y lavar 2 veces con 200 [ $\mu\text{L}$ /pocillo] de agua Milli-Q.
- 2) Remover el agua y agregar 100 [ $\mu\text{L}$ /pocillo] de Janus Green Whole-Cell Stain. Incubar la placa por 5 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Remover la tinción y lavar 3-5 veces con 200 [ $\mu\text{L}$ /pocillo] de agua Milli-Q hasta eliminar el exceso de tinción.
- 4) Remover el agua y agregar 100 [ $\mu\text{L}$ /pocillo] de Elution Buffer. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Medir la absorbancia a 615 nm ( $A_{615}$ ).

## iii. Cálculo de Resultados

- 1) Calcular el promedio de todas las réplicas de controles de cada condición experimental.
- 2) Restar los valores del control de todos los valores del mismo tipo experimental.
- 3) Normalizar los valores de  $A_{450}$  con los valores de  $A_{615}$  de los pocillos correspondientes, para ajustar la diferencia del número de células de los diferentes pocillos.
- 4) Calcular el valor de  $A_{450}$  promedio para cada condición experimental, comparar las veces de cambio de una condición versus la otra.

Notas:

Realizar todos los pasos de incubación con agitación suave en un agitador de placas.

En el paso 9 del Ensayo ELISA, las diluciones a utilizar son las siguientes:

Anticuerpo	Dilución	Marca	Código
$\alpha$ -KGD	1/500 - 1/1000	Santa Cruz	sc-49589
LDH	1/15000 - 1/30000	Santa Cruz	sc-133123
PDH	1/500 - 1/1000	Santa Cruz	sc-133898
PFK	1/500 - 1/1000	Santa Cruz	sc-31712