



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNO-
LOGÍA Y MATERIALES

ESTUDIO DE LA ADAPTACIÓN DE CÉLULAS CHSE A CULTIVO EN SUSPENSIÓN
Y CARACTERIZACIÓN DE SU INFECCIÓN POR IPNV

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

DANIEL IGNACIO LEVET ARAVENA

PROFESOR GUÍA:
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
ÁLVARO OLIVERA NAPPA
IVÁN VALDÉS VALDIVIA

SANTIAGO DE CHILE
2020

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: DANIEL IGNACIO LEVET ARAVENA
FECHA: 2020
PROF. GUÍA: ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

ESTUDIO DE LA ADAPTACIÓN DE CÉLULAS CHSE A CULTIVO EN SUSPENSIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SU INFECCIÓN POR IPNV

La industria acuícola, en particular la del salmón atlántico, representa un eje importante en la economía chilena, ocupando un 30 % del mercado mundial del pez, posicionándose así como el segundo productor a nivel mundial. Sin embargo, existe una serie de factores patogénicos que ponen en riesgo, los cultivos, dentro de los cuales se distingue el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). Este último corresponde a un aquabiovirus que promueve una serie de complicaciones en el hospedero. La enfermedad generada corresponde al 36.5 % de las enfermedades de agua dulce y saladas diagnosticadas y puede presentar una mortalidad de hasta 100 % según las condiciones, presentándose así como un problema para el rubro. La empresa Veterquímica S.A lleva a cabo la producción de vacunas del virus inactivado a través de la infección de cultivos de CHSE-214 adherentes. La búsqueda de obtención de condiciones de operación que permitan obtener una mayor concentración de virus de manera rentable se vuelve entonces atractivo para la empresa.

El objetivo general corresponde al estudio de la adaptación a suspensión de la línea celular chinook salmon embryo CHSE-214, además de la determinación del título viral obtenido desde la infección de estas células con IPNV para diferentes condiciones de cultivo. Para esto, se llevo a cabo la caracterización del cultivo en términos de parámetros de crecimiento y consumo/producción de metabolitos, según diferentes condiciones de cultivo. En particular, se realizaron dichas pruebas según las condiciones basales de la empresa, para después probarlo en MEM y DMEM-F12 con cultivos de alta densidad. Después se evaluó que medio y que densidad celular durante la infección permitía alcanzar los mayores títulos virales, con el fin de trabajar en dichas condiciones. Dado los resultados obtenidos, se probó la adaptación a suspensión del cultivo, creciendo las células en un *spinner flask*.

Los resultados obtenidos permitieron determinar que las condiciones de cultivo en adherencia que permitían obtener la mayor densidad celular correspondían al uso de DMEM-F12 suplementado, alcanzando una concentración de $0,56 \cdot 10^6$ [células/cm²], siendo 1,57 veces mayor que en MEM Completo, poseyendo además un tiempo de duplicación de 67,3 [h] y un $\Delta Lac/\Delta Glc = 1,31 - 0,81$. Sin embargo, la evaluación de infección con IPNV mostró que la combinación alta densidad en MEM Completo permitía un título viral 3,64 veces mayor que en DMEM-F12. Las pruebas de adaptación a suspensión mostraron una mantención de la viabilidad celular por sobre el 80 % durante un plazo de 2-3 semanas, sin embargo, los resultados indican que usualmente se presentaba una muerte del cultivo. Finalmente, se procedió a proponer una serie de medidas, que podrían permitir la adaptación a suspensión en próximas pruebas. En particular, se propuso la determinación de condición de agitación óptimas, la disminución del ion calcio por su rol en la adhesión celular, pero también de lactato a menos de 6 [mM] y de glutamina a máximo 0,6 [mM] en el medio, dado sus efecto inhibitorio en la proliferación de las células.

Así, pese a que no se pudo adaptar las células a crecer en suspensión, se llevó a cabo la caracterización de los cultivos en adherencia, permitiendo entender que condiciones son, en un inicio, convenientes según el objetivo deseado. Además, se espera que la revisión bibliográfica permita mejorar próximos resultados asociados a pruebas de adaptación.

A mi familia, mi polola y mis amigos, los cuales tuvieron la paciencia de acompañarme y querermme durante todo este proceso.

Agradecimientos

Este trabajo fue un desafío total para mí y no hubiera sido posible sin todo el apoyo que recibí a lo largo de este proceso. Entiéndase no solamente la tesis, sino también mi formación como ingeniero y como persona. Todo este viaje no fue fácil, en particular porque pareciera en una primera instancia que esto no era lo que quería, pero como siempre me dijo una persona "Todo sirve en la vida". Es por eso que no me arrepiento el haber concluido en esta carrera, ya que conocí a gente maravillosa, me forme en un aspecto técnico, pero aun mas importante, forme principios que en otro lugar estoy seguro que no hubiera tenido.

Es por esto que quiero agradecer a mi familia antes que a nadie, por estar siempre presente, en particular a mi mamá y papá. Por apoyarme cada vez que me caí en la universidad, por darme los cimientos para crecer en esta casa de estudio, pero también en mis temas personales a lo largo de mi vida. Muchas gracias a mis hermanos Flopi y Cris tambien, por acompañarme durante toda su vida. Siempre entregaron todo lo que tenían para poder ayudarme a crecer, por lo que, este logro no me lo otorgo solamente a mi, sino a toda mi familia.

Por otro lado, a mis amigos de la universidad, tanto de la universidad como de plan común, quiero darles un abrazo infinito y el gracias mas grande del mundo, ya que sin ellos no estaría donde estoy. En particular, el Benja, el Quemus, el Veliz, al Papo, la José, la Dani y la Lorna, quienes soportaron mis constantes preguntas, respondieron siempre mis dudas y me quisieron como amigo. Al Nico y Benja Armijo, que pasarón de ser los eternos alumnos a muy buenos amigos. Y a los kbrz que se quedaron en el colegio, al Andrés, a Javi, a Joako y a Rai con los cuales compartíamos nuestras experiencias pese a no ser parte de una misma institución.

Finalmente, quiero agradecer infinitamente a la Nati, que pese a no haber sido parte desde el inicio de todo este proceso, fue una persona fundamental en todo esto. Ella me quiso de una forma nadie mas lo había hecho, me cambio como persona, me ayudo a forzar mi personalidad, me apoyo siempre en mis decisiones y me presto su hombro cuando lo necesite. Son muchas mas cosas que estas la verdad, pero no hay tanto espacio en solo esta página. Sinceramente, muchas gracias amor.

Muchas gracias a todas las personas maravillosas que han formado parte de mi vida, y siéntanse orgullosos, ya que este logro es gracias a todos ustedes.

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. Industria del Salmón en Chile	1
1.2. Virus de la necrosis pancreática infecciosa (NPIv) y sus consecuencias	1
1.3. Soluciones actuales, problemas y horizonte	2
1.3.1. Cultivos en suspensión	3
1.4. Motivación	3
2. Objetivos y Limitaciones	4
2.1. Objetivo General	4
2.2. Objetivos Específicos	4
2.3. Limitaciones	4
3. Marco Teórico	5
3.1. Virus de la necrosis pancreática infecciosa (NPIv)	5
3.1.1. Características y genómica	5
3.1.2. Repartición, Hospederos y Transmisión	6
3.1.3. Infección y patología	7
3.1.4. Tipos de vacunas	8
3.2. Cultivo de Chinook Salmon Embryo Cells CHSE 214	9
3.2.1. En adherencia	9
3.2.2. En suspensión	12
3.3. Infección de CHSE con IPNv	14
4. Metodología	16
4.1. Cultivo en adherencia	16
4.1.1. Obtención, expansión y banco de CHSE-214	16
4.1.2. Curva de crecimiento en adherencia según condiciones basales de Vetterquímica S.A	17
4.1.3. Curva de crecimiento en adherencia: alta densidad celular MEM.	17
4.1.4. Curva de crecimiento en adherencia: alta densidad celular DMEM-F12.	17
4.1.5. Tolerancia a pluronic	17
4.2. Infección con IPNv	18
4.2.1. Infección de cultivos CHSE-214 en alta y baja densidad	18
4.2.2. Infección de cultivos CHSE-214 en MEM completo y DMEM-F12 suplementado	19
4.3. Cultivo en suspensión	19

4.3.1.	Adaptación inicial	19
4.3.2.	Punto a Punto	19
4.4.	Tasas de consumo y producción de metabolitos	20
4.5.	Recursos y requerimientos	21
4.5.1.	Equipos	21
4.5.2.	Material de laboratorio	21
5.	Resultados y Discusiones	23
5.1.	Cultivo en adherencia	23
5.1.1.	Curva de crecimiento en adherencia según condiciones basales de Veterquímica S.A	23
5.1.2.	Curva de crecimiento en adherencia: alta densidad celular MEM.	24
5.1.3.	Curva de crecimiento en adherencia: alta densidad celular DMEM-F12.	26
5.1.4.	Tolerancia a Pluronic.	29
5.2.	Infección con IPNV	30
5.2.1.	Infección de cultivos CHSE-214 en alta y baja densidad celular	30
5.2.2.	Infección de cultivos CHSE-214 en MEM Completo y DMEM-F12 suplementado	31
5.3.	Cultivo en suspensión	32
5.3.1.	Adaptación inicial	32
5.3.2.	Punto a Punto	33
5.3.3.	Propuestas futuras	35
	Conclusión	38
	Bibliografía	39
	Anexos	43
.1.	ANEXO: Composición medios MEM y DMEM-F12	43

Índice de Tablas

3.1. Tabla resumen con las condiciones de cultivo para CHSE-214 [25]	12
5.1. Parámetros de cultivo obtenidos para CHSE-214 en DMEM - F12 suplementado.	27
5.2. Concentración final y viabilidad de células para cultivo de CHSE-214 para distintas concentraciones de Pluronic-F68.	29
5.3. Título viral de IPNV obtenido para infección de cultivo CHSE-214 a bajo CCI y alto CCI	31
5.4. Título viral de IPNV obtenido para infección de cultivo CHSE-214 en MEM Completo y DMEM-F12	32
5. Composición de medios de cultivo MEM completo y DMEM-F12 suplementado	43

Índice de Ilustraciones

3.1. Diagrama del virus de NPI, presentando tanto los segmentos genómicos A y B como la posición de las proteínas VP1, VP2, Vp3 (VP3* siendo una porción de VP3) y Vp4 a través de flechas. [17]	5
3.2. Imagen de un alevín de trucha infectada por NPIv, presentando distensión abdominal, decoloramiento branquial y exoftalmia. [22]	7
3.3. Imagen de zona ventro-intestinal de un alevin de trucha infectada con NPIv, se observa hemorragias en el mesenterio y ceca. [22]	8
3.4. Monocapa nativa de CHSE-214 [36]	12
3.5. Curva de crecimiento de CHSE-sp en spinner, obtenida en el trabajo de H. Karasawa [40]	15
5.1. Curva de crecimiento de CHSE bajo condiciones basales establecidas por VQ, donde el medio utilizado es MEM Completo y la densidad celular de inoculación fue de $0,005 \cdot 10^6$ [células/cm ²] o $12 \cdot 10^6$ [células/ml]	23
5.2. Curva de crecimiento de CHSE-214 donde el medio utilizado es MEM Completo y la densidad celular de inoculación fue de $0,042 \cdot 10^6$ [células/cm ²] o $1,1 \cdot 10^6$ [células/ml]	24
5.3. Curva de concentración de glucosa, ácido láctico y piruvato en función del tiempo en el cultivo de CHSE-214 de alta densidad en MEM Completo. . . .	25
5.4. Curva de crecimiento de CHSE-214 donde el medio utilizado es DMEM-F12 suplementado y la densidad celular de inoculación fue de $0,041 \cdot 10^6$ [células/cm ²] o $1 \cdot 10^6$ [células/ml]	27
5.5. Comparación del crecimiento de CHSE-214 en DMEM-F12 suplementado y MEM Completo.	28
5.6. Curva de concentración de glucosa y ácido láctico en función del tiempo en el cultivo de CHSE-214 de alta densidad en DMEM-F12 suplementado.	28
5.7. Observación microscópica de cultivos CHSE-214 una semana post infección. a) Cultivo de alta densidad sin infectar, presentando <i>cell crowding</i> . b) cultivo de alta densidad infectado con IPNV, presentando las características típicas del efecto citopático generado por el virus.	30
5.8. Esferoides observados a los 8 días del comienzo de la adaptación a suspensión.	32
5.9. Densidad celular del cultivo celular en suspensión CHSE-214 en DMEM-F12 suplementado, medido cada una semana con re inoculación de células seleccionadas.	33

5.10. Densidad celular del cultivo celular en suspensión CHSE-214 en DMEM-F12 suplementado, medido cada 24 [h]. A la izquierda el pasaje 1 y a la derecha el pasaje 2. La flecha indica el momento en que se llevo a cabo una reinoculación con células en adherencia.	34
5.11. Consumo de glucosa y producción de lactato del cultivo celular en suspensión CHSE-214 en DMEM-F12 suplementado, medido cada 24 [h] (Pasaje 1 punto a punto).	34
5.12. Spinners con diferentes tipos de impellers para agitación, siendo de a) Tipo imán (utilizado para las pruebas de laboratorio) b) Paletas c) Péndulo (a la derecha)	35

Capítulo 1

Introducción

1.1. Industria del Salmón en Chile

La industria acuicola se encuentra en constante aumento, prediciendo un crecimiento en la pesca desde 74 millones de toneladas métricas (TM) de productos pesqueros en 2014 hasta un total de 250 millones de TM para el año 2050, con el fin de satisfacer la demanda estimada de los 9 mil millones de individuos. En particular para el 2015, la demanda de salmón represento un 3.6% del requerimiento mundial en productos pesqueros, con un total de 2,7 millones de TM cosechadas.

En el mercado del salmón atlántico (*Salmo salar*), Chile se sitúa como uno de los principales agentes, junto con Noruega, Canadá y Escocia, los cuales, en su conjunto poseen una cosecha conjunta que alcanza el 90% de la producción mundial de la especie.

A nivel nacional, la cosecha alcanzo un total de 834.000 TM en 2015 representando un 30% del mercado mundial del salmón, generando exportaciones estimadas en US\$ 3.202 millones, posicionando a Chile como el 2° productor de salmónes a nivel mundial [1] [2]. Así, con el fin de responder a la demanda a nivel internacional, las empresas e instituciones generan de manera directa e indirecta mas de 70.000 empleo, los cuales permiten dinamizar y articular la economía de las zonas productoras nacionales: los Lagos, Aysén, la Araucanía y Magallanes. De esta manera, la acuicultura y en particular la industria salmonera se presenta como un eje clave en la economía chilena [3].

1.2. Virus de la necrosis pancreática infecciosa (NPIv) y sus consecuencias

La industria del salmón posee varios riesgos biológicos, asociados principalmente al brote de variadas infecciones virales y bacterianas, poniendo en riesgo los cultivos de salmonoides [4]. En particular, uno de los principales patógenos que afecta los cultivos es el virus de la

necrosis pancreática infecciosa (IPNv). La presencia de este último ha sido descrita en varios continentes, y en particular en países con un importante rubro acuicola, tales como Chile, Noruega, Canadá y Japón [5], pudiendo caracterizarse como una enfermedad de distribución mundial [6] [7].

NPIv genera el declive de la salud de los especímenes infectados, siendo usualmente salmónidos que se encuentran en la etapa de alevines y de crías de primera alimentación [5]. Existen varios signos clínicos que permiten la identificación de un individuo enfermo, siendo usualmente: distensión de la zona abdominal, nado letárgico (usualmente en sacacorcho), hiper-pigmentación, hemorragia en la zona ventral y heces de color blanquecinas [4] [5] [7] [8].

La tasa de mortalidad generada dependerá del serotipo viral, del título presente al momento de la infección, de la especie y edad del pez y de la temperatura del agua [9] [10], pudiendo así variar entre 0 y 100% de mortalidad acumulada. Dado lo anterior, NPIv se presenta como la segunda causa de mortalidad del salmón Atlántico en Chile (*Salmo salar*), siendo uno de los patógenos detectados con mayor frecuencia, representando el 36.5% de las enfermedades diagnosticadas en especies de agua tanto dulces como saladas [4] [11].

Dado la importancia que acarrea la salmonicultura en Chile, la muerte y/o descarte de los peces por el daño a la carne, acompañado del incurrimiento en gastos para prevención y tratamiento de los especímenes se traducen en pérdidas económicas importantes para el rubro [4] [11].

1.3. Soluciones actuales, problemas y horizonte

La principal solución empleada por las empresas para el control de la enfermedad corresponde al uso de vacunas. Actualmente se distinguen 37 productos registrados para el tratamiento de NPIv en salmónidos en Chile, donde la gran mayoría (34 del total) corresponde a vacunas basadas en la generación de un efecto inmunológico por la inyección del patógeno inactivado, mientras que las 3 restantes basan su principio en las proteínas virales VP2 y VP3 producidas de manera recombinante [4] [7].

La mayoría de estas vacunas corresponden a inyectables polivalentes, los cuales permiten el tratamiento paralelo de la IPN con SRS, vibriosis, furunculosis, entre otros [12], mientras que unas pocas corresponden a vacunas sumergibles [4]. Pese a que las vacunas logren un aumento en la tasa relativa de supervivencia (TRS) de los especímenes vacunados frente a un brote, se desconoce el mecanismo, y en consecuencia el nivel de acción que tiene la vacuna del virus inactivado para otorgar la inmunización. Dado esto, no es posible asociar un título de anticuerpos con el grado de protección adquirido, haciendo que la TRS sea el único parámetro determinista en la eficacia de las vacunas [8] [13]. Sin embargo, aunque no se conozca el mecanismo de acción, hay estudios que ponen en evidencia que la vacuna no evita la infección, teniendo así la presencia tanto del virus como de anticuerpos en los individuos infectados [8] [13]. Además de los problemas anterior, la aplicación de vacunas posee efectos secundarios no deseados consecuencia del uso de adyuvantes oleosos, tales adherencias leves y oscurecimiento en la zona de la inyección [7] [14].

Frente a los obstáculos previamente descritos, se han llevado a cabo investigaciones alrededor de otros tipos de vacunas en la última década. Para el caso particular de Chile, se han promovido los estudios genéticos y el establecimiento de programas de vacunación temprana, con el fin de enfrentarse a brotes del virus. [4].

1.3.1. Cultivos en suspensión

Los cultivos en suspensión se basan en el crecimiento de líneas celulares en un volumen de medio de manera que estas no se encuentren adheridas a las superficies. El crecimiento bajo estas condiciones puede ser logrado dado la naturaleza no adhesiva de la línea celular o por la implementación de una suspensión mecánica. Este tipo de cultivos provee una serie de ventajas frente a los cultivos en suspensión, teniendo un atractivo no menor para las industrias del rubro bioquímico [15] .

En efecto, a diferencia de los cultivos en placas, la densidad celular máxima alcanzada viene limitada por el volumen de cultivo y no por el área, permitiendo alcanzar entonces mayores densidades celulares para una misma superficie. Por otro lado, se reduce el riesgo de contaminación, dado que se disminuye el número de subcultivos y la manipulación de las células durante su crecimiento. Por otro lado, no se presenta el estrés generado por la tripsinación de las células, dado que los subcultivos y recuperación de las células se realizan de manera directa desde el medio [15].

1.4. Motivación

Veterquímica S.A. (VQ), empresa con la cual se está afiliada para llevar a cabo esta memoria, corresponde a una compañía que lleva a cabo el desarrollo de productos para el cuidado, alimentación, salud y bioseguridad animal, generando productos para ganadería y acuicultura [16]. Actualmente producen la vacuna inyectable IPE-VAC Microdosis a través de la infección de la línea celular CHSE-214, la cual tiene como principio la inmunización del espécimen a partir de la incorporación de dos cepas de IPNV. Así, la producción y recuperación de altas concentraciones del virus corresponden a un punto de interés para VQ. Por lo que, dado los antecedentes previamente presentados, la empresa está interesada en determinar el título viral obtenido en la infección de IPNV de las células CHSE-214 en diferentes medios y sustratos, para que puedan establecer y trabajar en las condiciones de cultivo que permitan alcanzar mayor utilidad, siendo posiblemente el trabajo en suspensión.

Capítulo 2

Objetivos y Limitaciones

2.1. Objetivo General

Este trabajo tiene como fin el estudiar el efecto del medio de cultivo en el crecimiento de la línea celular CHSE-214 y sus respectivos títulos virales desde la infección con IPNV, además de buscar la adaptación a suspensión de las células.

2.2. Objetivos Específicos

Los objetivos específicos establecidos para cumplir el objetivo general son los siguientes:

- Crecer CHSE en cultivo adherente usando medio basal MEM Completo y DMEM-F12 suplementado y caracterizar su crecimiento en términos de biomasa y metabolitos principales.
- Estudiar rendimiento celular y título viral en diferentes condiciones, variando medio de crecimiento y densidad celular.
- Adaptar la línea celular CHSE-214 a crecimiento en suspensión y estudiar factibilidad de infección en estas condiciones.

2.3. Limitaciones

Existen limitaciones con respecto al alcance del trabajo a realizar. Primero que nada, la evaluación del crecimiento según los medios de cultivo no contemplara el análisis de amino ácidos, dado que corresponde a una evaluación de crecimiento preliminar. De esta manera, los medios trabajadas corresponderán a DMEM/F12 y MEM. Finalmente, dada la disponibilidad de diferentes equipos en los laboratorios (principalmente spinners, agitadores e incubadoras), no se considera la realización de cultivos en suspensión de manera simultanea.

Capítulo 3

Marco Teórico

3.1. Virus de la necrosis pancreática infecciosa (NPIv)

3.1.1. Características y genómica

El virus de la necrosis pancreática infecciosa es un virus que pertenece a la familia Birnaviridae y en particular al genero Aquabirnavirus. Este Birnavirus posee una capsida de 60 [nm] de diámetro, conformada por 132 capsomeros en triangulación T=13, presentando así una organización icosaedral. El virión presenta un peso molecular de $55 * 10^6 Da$, donde el 6.9% de su masa es otorgada por su contenido genómico ($3,77 * 10^6 Da$) [4] [17].

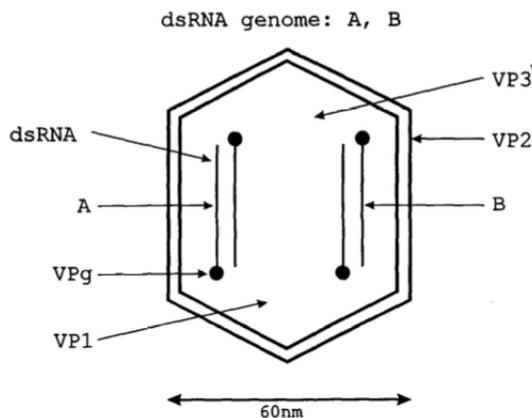


Figura 3.1: Diagrama del virus de NPI, presentando tanto los segmentos genómicos A y B como la posición de las proteínas VP1, VP2, Vp3 (VP3* siendo una porción de VP3) y Vp4 a través de flechas. [17]

Su pertenencia al genero Birnaviriade es justificada por un genoma compuesto de dos segmentos en doble hebra de RNA, denominados como A y B [4] [7] [5] [11] [17]. El segmento A, formado por 3000 pares de bases, codifica para un total de 3 proteínas virales, denotadas

VP2, VP3 y VP4. Las dos primeras corresponden a proteínas estructurales internas y de la capsida, mientras que VP4 posee una actividad proteolítica clave en la conversión de VP2. Por su parte, el segmento B, compuesto por 2800 pares de base, codifica para la RNA-polimerasa VP1, llamada VPg al estar ligada al extremo 5' de los segmentos del genoma [4] [7] [11] [5] [17]. La Figura 3.1 presentada a continuación permite entender visualmente la organización y composición viral.

3.1.2. Repartición, Hospederos y Transmisión

El patógeno fue aislado por primera vez desde un espécimen de *Salvelinus fontinalis* en 1957 por el *Eastern Fish Disease Lab* del Dept. of Interior Bureau of Sports Fisheries and Wildlife en Kearneysville, U.S [18]. La presencia de este último ha sido descrita en varios continentes, identificándose principalmente en Australia, Canadá, Dinamarca, Escocia, España, Finlandia, Francia, Inglaterra, Italia, Japón, Noruega, Suiza y Chile [5], siendo catalogada como enfermedad de presencia mundial [6] [7].

En Chile, el virus fue aislado por primera vez hacia mediados de 1980, sin embargo fue descrito y confirmado en un brote del año 1998, afectando de manera generalizada los cultivos de salmón atlántico, llegando a considerarse como endémico a de hoy [4] [11]. Dado el impacto económico generado en el rubro, el Passive Surveillance Programs (PSPs) lleva a cabo el seguimiento constante del estado del virus, con el fin de prevenir y enfrentar posibles brotes [4].

Los principales hospederos corresponden a los salmónidos, esencialmente de trucha fontana *Salvelinus fontinalis*, trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* y salmón atlántico *Salmo Salar*, siendo los más sensibles a perecer bajo el NPIV [5]. Sin embargo, se ha aislado el birnavirus de otras especies de peces marinos que se encuentran en las cercanías de cultivos acuícolas infectados [7]. Aun más, su presencia ha sido descrita en anguilas americanas, japonesas y europeas [5], presentándose con la capacidad de ingresar a diferentes especies acuáticas [7].

La infección del virus se da cuando los peces entran en contacto con algún vector de este. Son varios los reservorios que pueden estar al origen un brote al encontrarse en las cercanías de salmonidos, siendo estos principalmente rotíferos, cangrejos de río y moluscos. A esto se le agrega la depositación de tejido, moléculas orgánicas y heces de animales infectados, conformando capas sedimentarias con potencial viral [5] [19] [20]. Una vez los peces infectados, la transmisión puede llevarse a cabo tanto de manera vertical como horizontal. La primera se da cuando la tasa de excreción viral es importante, transmitiéndose de un espécimen a otro a través del agua y de la cercanía entre los animales. Por otro lado, la transmisión vertical, o sea hacia la progenie, ocurre por la presencia del virus en los espermatozoides o en el líquido folicular, infectando las crías a posteriori [7] [5].

3.1.3. Infección y patología

El proceso de infección y replicación del virus no ha sido comprendido en profundidad, sin embargo, existen precedentes que permiten comprender tanto el mecanismo como las moléculas involucradas [4].

En primera instancia, ocurre la unión del virus con la célula, a través de la vinculación de la proteína viral VP2 a polipeptidos de membrana de elevado peso molecular. Esto permitiría el ingreso del virus al medio intracelular a través de endocitosis [4] [17] [20]. En particular, estudios sugieren que, dado la inhibición del intercambiador Na_+/H_+ se observa una menor infección viral, este proceso de integración se realizaria vía macropinositosis [21].

Una vez ingresado, se observa el desensamble del patógeno y en consecuencia la liberación del genoma viral. Esto permite dar paso a la replicación del RNA a través de RNA polimerasa, en este caso VP1, obteniendo ssRNA el cual es posteriormente traducido en proteínas estructurales e internas del virión [22]. Finalmente, ocurre el ensamblaje, maduración y liberación al medio extracelular del virus [4]. Cabe destacar que la liberación del virus para cultivos *in vitro* de CHSE-214 se realiza consecuencia de la apoptosis de la célula, sin embargo, este mecanismo no ha sido comprobado para modelos *in vivo*, donde el numero de células apoptoticas es menor al esperado [4] [23]

Existen diversos signos clínicos que permiten evidenciar el desarrollo de una necrosis pancreática infecciosa. En primer lugar, se observan signos externos, distinguibles por observación ocular de los salmones en los estanques de cultivo. Los síntomas mas usuales corresponden a una coloración mas oscura de la piel, inapetencia, pseudofecas ("heces colgantes" de color blanquecino [5]), nado letárgico y errático, con recorrido en sacacorcho. También se observa la existencia de abultamiento abdominal, decoloramiento de las agalla y exoftalmia [4] [7] [5] [8] [22], tal como se observa en la Figura 3.2.



Figura 3.2: Imagen de un alevín de trucha infectada por NPIv, presentando distensión abdominal, decoloramiento branquial y exoftalmia. [22]

En segundo lugar, se observan signos internos, los cuales permiten entregar un diagnostico

mucho mas preciso con respecto a la posible infección. Cambios en los diferentes órganos son detectables, donde los mas importantes son: hemorragias en la zona ventral, presentado en la Figura 3.3, decoloración y lesiones de órganos internos tales como el corazón, bazo, hígado y riñón, además de una necrosis característica del tejido pancreático [22] [4] [8]. A esto se le agrega la ausencia de alimento en el tracto intestinal, usualmente dado por una disminución característica del apetito consecuencia de la infección [9] [4].



Figura 3.3: Imagen de zona ventro-intestinal de un alevin de trucha infectada con NPIv, se observa hemorragias en el mesenterio y ceca. [22]

3.1.4. Tipos de vacunas

En mayo de 2019, se contabilizaron un total de 38 licencias asociadas a diferentes vacunas para salmones contra la Necrosis Pancreática Infecciosa. Se distinguen dos tipos de vacunas, por un lado las de virus inactivado, que corresponden a la gran mayoría y por otro lado las de subunidades, representando solamente 3 de las 38 licencias [24].

El proceso de síntesis y vacunación se lleva a cabo en varias etapas:

- Infección de células hospederas afines con verificación de efecto citopático.
- Recolección del virus vía centrifugación/filtración
- Inactivación del virus vía adición de β -propiolactone (BPL) o de formalina
- Adición de adyuvantes basados en emulsiones de aceites y decisión si la vacuna sera mono o multivalente (protegerá contra mas de un patógeno).
- Aplicación de la vacuna, la cual puede ser por:
 - administración oral.
 - sumergimiento del espécimen en medio con vacuna.
 - inyección intramuscular (*im*) o intraperitoneal (*ip*).

Sin embargo, aunque otorgar una inmunidad confiable a los cultivos, no ha sido posible asociar el mecanismo completo que permite entregar inmunidad. En efecto, pese a que la tasa de supervivencia relativa proveídas por las vacunas aumenta, el número de anticuerpos varia según de manera importante según las condiciones y ambiente [7].

3.2. Cultivo de Chinook Salmon Embryo Cells CHSE 214

3.2.1. En adherencia

La línea celular CHSE-214 corresponde a células extraídas de un embrión de salmón chinook o *Oncorhynchus tshawytscha* [25], iniciada en octubre de 1964 [26]. Las CHSE, al igual que la gran mayoría de las células de pez, poseen condiciones de cultivo muy similares a las aplicadas para las células mamíferos. Así, se distinguen las siguientes consideraciones para el crecimiento de células de pez [27]:

Medio

Los medios de cultivo corresponden a mezclas de nutrientes, vitaminas, amino ácidos y suplementos que permiten llevar a cabo tanto el crecimiento, como la división de la línea celular inoculada. Los medios de cultivo pueden ser mas sofisticados, teniendo concentraciones de amino ácidos, vitaminas, hormonas, factores de crecimiento y nutrientes específicos para lograr un crecimiento óptimo de líneas celulares.

Dentro de los medios de cultivo mas usados a nivel de laboratorio e industrial se distinguen Eagle's minimum essential medium (MEM) y Dulbecco Eagle's Minimal Essential Medium (DMEM), dado que responden respectivamente a necesidades básicas para el crecimiento de células. En algunos casos, se utiliza DMEM y la mezcla de nutrientes HAM's F-12 en relación 1:1, permitiendo obtener un medio rico dado las altas concentraciones de variados compuestos [28].

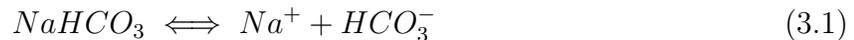
En efecto, este último posee una concentración 3 veces mayor de glucosa que la presente en MEM, permitiendo responder a tasas de consumo mayores. Por otro lado, el medio complejo esta compuesto por una mezcla de los 20 aminoácidos, mientras que el MEM, no presenta 8 de estos, siendo: asparagina, glutamato, alanina, asparagina, cisteina, glicina, prolina, serina y tirosina [ANEXO 1: Composición medios MEM y DMEM-F12]. A esto se le agrega la presencia de mayores concentraciones de vitaminas y otros compuestos, permitiendo responder a necesidades celulares mas exigentes y en consecuencia a una mayor variedad de líneas celulares [29].

La mayoría de las células de pez son crecidas en Eagle's minimum essential medium (MEM) o en Eagle's basal medium (BMEM), medium 199 o leibbovitz L-15, donde el mas utilizado corresponde al MEM. El crecimiento fuera de incubadora es posible, sin embargo, requiere de un control del pH, lo que puede ser logrado a través del uso de buffers, tales como HEPES, Tris o $NaHCO$. Para la línea CHSE-214, el medio mas utilizado para uso en laboratorio corresponde usualmente al MEM [30] [31] [32].

pH

El pH seleccionado se ve influenciado según la aplicación par la cual se desea utilizar el cultivo. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se utiliza un pH cercano a los 7,2 – 7,4, dado el comportamiento favorable de las células bajo dicha concentración de iones hidrógeno. El metabolismo celular de las CHSE genera compuestos que acidifican el medio, pasando a un pH cercano a los 6,8. Por otro lado, un alcalinamiento del medio, trabajando con valores superiores a los 8, tienen como resultado una degradación celular, la cual se traduce en desprendimiento, vacuolación y restricción de ciertas funciones celulares.

Para responder a la necesidad de un pH estable, se suelen utilizar diferentes buffers según las condiciones de operación del cultivo, para así responder a la disminución del pH dado el metabolismo de las células. Para sistemas abiertos que posean un control con respecto a la inyección de CO_2 , se suele utilizar bicarbonato de sodio $NaHCO_3$. El dióxido de carbono se disuelve en el medio e interactúa con el bicarbonato HCO_3^- , para formar H_2CO_3 acidificando el medio. Con el fin de mantener un equilibrio del pH, se $NaHCO_3$, el cual reacciona con el bicarbonato según la reacción (3.1) presentada a continuación, permitiendo una estabilización del pH en un valor cercano a 7 [15] [33].



Sin embargo, para sistemas cerrados, donde no existe intercambio de gases con el exterior, se suele utilizar un sistema de control a base del zwitterion HEPES, dado la capacidad de amortiguamiento de pH independiente del CO_2 que posee este ultimo [15] [34].

Temperatura

Otro parámetro a considerar corresponde a la temperatura de incubación de las células. Las células de pez poseen diferentes rangos de temperatura óptimos según la especie de la que fueron recuperadas, dado que estas ultimas presentan diferentes condiciones térmicas según su medio ambiente. En particular para las CHSE-214, la temperatura óptima de crecimiento observada corresponde a los 20°C [26] [10]. Temperaturas muy bajo este valor (del orden de los 4-15°C) generan un ralentizamiento del metabolismo, permitiendo mantener el cultivo durante mas tiempo sin necesidad de cambiar el medio de manera frecuente. Por otro lado, temperaturas sobre la temperatura óptima (del orden de los 25-27°C), generan estrés celular, pudiendo afectar la estabilidad de la membrana dado el contenido de ácidos grasos de la membrana.

Suero

El suero corresponde al plasma obtenido post centrifugación y purificación de la sangre. Este último es rico en proteínas, polipeptidos, carbohidratos, factores de crecimiento, hormonas, compuestos inorgánicos, entre otros. Dado la complejidad de las células animales, simular el ambiente en el que estas crecen es una tarea complicada. Frente a esto, la respuesta aplicada corresponde al uso de suero en los medios de cultivo, dado que cumple varias funciones [33] [29]:

- Proporciona nutrientes y elementos traza determinantes en procesos bioquímicos para el crecimiento y desarrollo celular.
- Entrega compuestos que promueven la adhesión celular.
- Promueve el crecimiento celular dado la presencia de hormonas y factores de crecimiento.
- Genera un ambiente que protege a las células, evitando un buen funcionamiento de las proteasas, inactivando la tripsina y entregando una viscosidad basal que evita el daño celular frente a posibles esfuerzos mecánicos.

Existen diferentes tipos de sueros según la fuente animal del que es extraído, no obstante, los más utilizados corresponden a suero bovino fetal (FBS), suero de ternera bovina y suero de ternera recién nacida. Sin embargo, el FBS es el de mayor recurrencia en el cultivo de células de pez, dado que los investigadores se presentan reacios a los cambios celulares que un posible cambio de suero podría generar. En efecto, es importante destacar que los cultivos son sensibles a cambios en el tipo de suero. En efecto, una vez que se creció por primera vez el cultivo con un tipo de suero (FBS por ejemplo), el cambio a otro tipo de suero (suero bovino adulto) es mal recepcionado, pudiendo tanto afectar como detener el crecimiento celular. Adicionalmente, este último posee como ventaja el poseer un menor riesgo de contaminación, dado que no se expone al medio ambiente y posee menor concentración de anticuerpos y componentes del sistema complemento [33].

Dado todo lo anterior, el suero es uno de los compuestos más importantes en la formulación de los medios animales, gracias al aporte de una mezcla de varios componentes críticos al cultivo de células de pez y en consecuencia para las CHSE. En particular, las células crecen usualmente con concentración de FBS que se encuentren entre el 5 y 10% aunque a bajas concentraciones se fomenta una tasa de crecimiento levemente menor.

La Tabla 3.1 presenta de manera generalizada un resumen con las condiciones de cultivo necesarias para el crecimiento de las CHSE-214 [25].

Las condiciones previamente presentadas permiten el establecimiento de cultivos en adherencia en placas T25, T75 y T175, formando una monocapa con morfología epitelial [26], como se puede observar en la Figura 3.4. La concentración máxima alcanzada por el cultivo celular, entendiéndose la confluencia, se da entre 5-7 días post-iniciación del cultivo [35].

Tabla 3.1: Tabla resumen con las condiciones de cultivo para CHSE-214 [25]

Condicion	Requerimiento
	MEM
Medio	Leibowitz Medium L-15 Medium 199
Suplementos	5-10 % FBS 10 mM HEPES
pH	7,2 – 7,4
Temperatura	Optima: 20°C

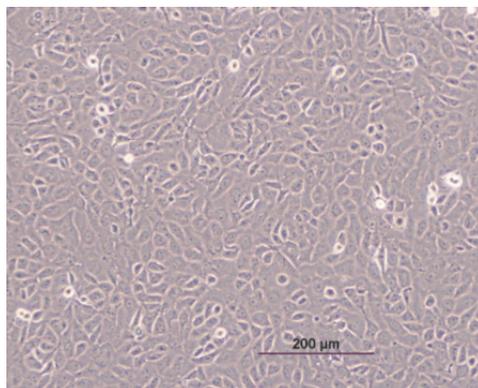


Figura 3.4: Monocapa nativa de CHSE-214 [36]

3.2.2. En suspensión

Ventajas

Pese a que las células crecen usualmente adheridas a alguna superficie, existen ventajas asociados a los cultivos en suspensión que fomentan la búsqueda de adaptación de las líneas celulares a crecer suspendidas en el medio.

Primero que nada, el uso de cultivos en suspensión permite obtener cantidades de biomasa mayores a las que se pueden obtener en adherencia para una misma superficie de cultivo. Segundo, permite mantener a las células en una fase metabólica constante si se realizan cambios de medio y diluciones, situación que no es posible de lograr realmente en adhesión. Además, se disminuyen ciertos riesgos para las células asociados al trabajo de cultivos en placas. En efecto, la obtención de altas densidades en cultivos adheridos requieren de varios pasajes y varias placas de células, por lo que su expansión y recuperación corresponden a posibles factores de contaminación. Lo anterior no sucede al trabajar en suspensión, ya que solamente se lleva a cabo la apertura del substrato en el que crecen para la inoculación y para la recuperación de las células. Es también importante destacar que la recuperación de las células no pasa por un proceso de rompimiento de la matriz extracelular a través de enzimas, ya que al estar suspendidas en el medio, basta con recuperar y centrifugar el caldo para disponer de las células, disminuyendo así el tiempo, como estrés generado en el proceso

de obtención de las células [15]. Todo lo anterior permite que el escalamiento del proceso sea alcanzado de mas fácilmente [37], siendo entonces interesante para las industrias de rubros bioquímicos.

Compuestos clave en suspensión

Dado las ventajas que poseen los cultivos en suspensión, se genera un interés técnico-económico en las industrias y laboratorios. Dado esto, son pocas las fuentes que presentan sus protocolos de adaptación, sin embargo, existen consideraciones generales a tomar al momento de buscar el crecimiento de las células en tres dimensiones. En efecto, los compuestos y propiedades del medio tienen un impacto no menor en el proceso de adaptación.

Primero que nada, se distingue una influencia en la concentración de suero. Este último esta dotado de proteínas, tales como fibronectina y laminina, que promueven la adhesión celular a superficies, dificultando una posible adaptación a suspensión. Sin embargo, la viscosidad entregada al medio de cultivo protege a las células de daño generado por esfuerzos de corte y mecánicos, siendo así de ayuda para suspensiones mecánicas [33] [29].

Otros compuestos importantes son los surfactantes, los cuales corresponden a polímeros que disminuyen los efectos de cortes generados por la agitación o por las burbujas para aeración, disminuyendo así el daño generado a las células. Uno de los surfactantes mas usados corresponde al Pluronic F68, el cual disminuye la tensión superficial, reduciendo la formación de espuma, además de saturar las burbujas, evitando así una interacción entre estas con las células del medio [38]. Sin embargo, dado su naturaleza toxica, se utiliza en concentraciones que varían entre 0,01 – 0,2%. Así, se suele emplear Pluronic en los rangos entregados para cultivos en suspensión, con el fin de responder a la disminución de la viscosidad por la baja concentración de suero y evitar la formación de burbujas por la agitación [15].

Por otro lado, se distingue el calcio, el cual corresponde a un componente critico en varios procesos celulares, pero tambien en lo que contempla la adhesión celular. En efecto, el calcio bajo forma de ion Ca^{2+} juega un rol en la función de las glycoproteinas conocidas como *moléculas de adhesión celular* (MAC). La falta de disponibilidad del ion se traduce en una disminución de la unión entre las células, generando así agregados celulares de menor tamaño, deseables para una correcta adaptación a suspensión. Sin embargo, dado que el calcio no posee como único rol el mediar la formación de la matriz extracelular, sino que también participa dentro de la señalización celular, es necesario preservar una concentración base con el fin de mantener la integridad de las células.

CHSE-214 sp

Uno de los principales usos de esta línea es su infección con patógenos, tanto virales como bacteriales para la comprensión de mecanismos del organismo huésped y hospedero, pero también para la generación de nuevos productos para farmacología animal. Dado esto, nuevas condiciones de cultivo que favorezcan una mayor producción, que permitan evaluar citotoxicidad [39] o que faciliten el escalamiento son objetivos buscados. Es dentro de este contexto, que en 1991 se reporta la adaptación de la línea celular CHSE-214 a crecer en suspensión [40]. Sin embargo, este resultado no ha sido replicado posteriormente en otros trabajos.

Para ello, se trabajo con la línea celular CHSE-214 disponible en el laboratorio, dotada de mas de 400 pasajes, la cual se crecía en MEM, suplementado con 5-10 % FBS y 10 [$\mu\text{g}/\text{ml}$] de kanamicina. Las células fueron adaptadas a crecer en otro medio, conocido como Waymouth's MB 752/1

Las condiciones establecidas para el crecimiento en suspensión de la nueva línea llamada CHSE-sp son las siguientes [40]:

- **Medio:** Waymouth's MB 752/1 medium sin CaCl_2 .
- **Suplementos:** 5 % FBS, 0,05 % NaHCO_3 y 10 [$\mu\text{g}/\text{ml}$] de kanamicina.
- **pH:** 7,4 ajustado con 14mM de buffer HEPES-NaOH.
- **Temperatura:** 20°C
- **Cultivo en:** spinner flask siliconizado a 60-70rpm.
- **Inoculación inicial:** 200 [ml] a concentración $1 \cdot 10^5$ [células/ml].

El cultivo bajo estas condiciones permitió alcanzar, a los 38-40 días, una densidad aproximada de $1,4 \cdot 10^6$ [células/ml], tal como se observa en la Figura 3.5.

3.3. Infección de CHSE con IPNv

Dado su naturaleza, IPNv puede llevar a cabo su ciclo celular al interior de diferentes células huésped [4] [5]. Los procesos de infección han sido llevados a cabo en diferentes estudios compartiendo ciertas consideraciones de operación. Dentro de la bibliografía, se distinguen 2 metodologías de infección , las cuales quedan descritas a continuación:

1. El primer protocolo corresponde al realizado por R. Labraña et al. en 2008, para la detección de IPNv en sedimentos de agua dulce y posee las siguientes consideraciones [30]:
 - *Cultivo de célula hospedera:* Cultivo de CHSE-214 en adherencia a 18-20°C, en MEM con diferentes suplementos según el estudio. En particular para este caso, se agregaron diferentes sales de Earle, 2 [mM] de l-glutamina, 0.1 [mM] amino ácidos no esenciales, 2 [mg/ml] de bicarbonato de sodio, 50 [$\mu\text{g}/\text{ml}$] de gentamicina y 10 % FBS [19]. En esta etapa, se busca alcanzar propagar las células hasta alcanzar una

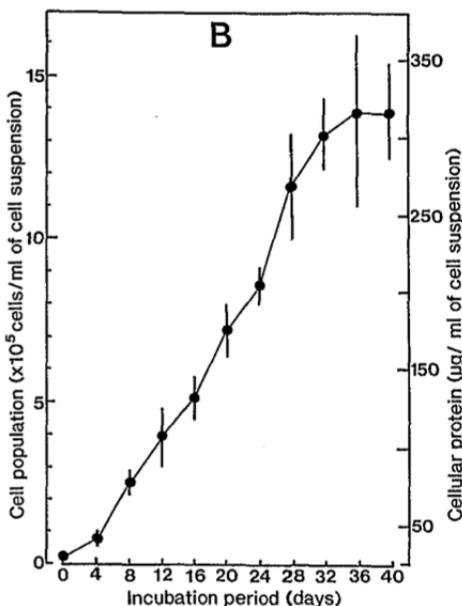


Figura 3.5: Curva de crecimiento de CHSE-sp en spinner, obtenida en el trabajo de H. Karasawa [40]

confluencia cercana al 90 %.

- *Infección y título viral*: Para la infección, se cultivaron placas de 24 pocillos de CHSE-214 sobre cubreobjetos de vidrio, las cuales fueron infectadas con muestras de IPNV en MEM 2 % a través de diluciones seriadas en razón de 1:10, agregando 10 μl de cada muestra viral a cada pocillo. Al alcanzar 1 hora de adsorción, se cambió el medio de los pocillos por medio fresco con 2 % FBS. Se fijaron las células con metanol a -20°C y se incubaron con anticuerpos monoclonales. Se agregó solución de montaje y se examinaron las muestras a través de un microscopio de epifluorescencia con aumento 100X.
2. El segundo protocolo corresponde al realizado por B. Damsgård, et al. en 1998, con el fin de evaluar el efecto de IPNV en el apetito de los peces infectados y posee las siguientes consideraciones [9]:
- *Cultivo de célula hospedera*: Cultivo de CHSE-214 en adherencia a $18-20^{\circ}\text{C}$, en MEM con diferentes suplementos según el estudio. En particular para este caso, se suplementó el medio con 1 % (peso/volumen) de aminoácidos no esenciales, 1 % de l-glutamina y antibióticos, además de 8 % de suero de becerro fetal (FCS) [9]. En esta etapa, se busca alcanzar propagar las células hasta alcanzar una confluencia cercana al 90 %.
 - *Infección y título viral*: Durante el proceso de infección, se cambia el medio por uno con las mismas características que el utilizado en la etapa de crecimiento salvo por la concentración de suero, siendo en este caso de 2 % de FCS. Para la infección, se cultivaron placas de 24 pocillos de CHSE-214, las cuales fueron infectadas con a través de diluciones seriadas en razón de 1:10. Alcanzada la semana post infección, se determinaron los pocillos con efecto citopático para posteriormente cuantificar el virus basándose en la técnica de Reed and Meunch.

Capítulo 4

Metodología

4.1. Cultivo en adherencia

4.1.1. Obtención, expansión y banco de CHSE-214

Una muestra de la línea celular CHSE-214 provista por VQ fue descongelada desde un criovial de 1.5 ml que se encontraba en criopreservación a -80°C . Siguiendo los protocolos de la empresa, se inoculo una placa T-flask de $75\text{ [cm}^2\text{]}$ utilizando la totalidad del criovial, adicionando 18.5 ml de MEM suplementado según, el cual queda descrito en **[ANEXO: MEM Completo]**. Las condiciones de cultivo correspondieron a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dentro de una incubadora oscura sin CO_2 . Al observar un 80% de confluencia, se realizo la expansión del cultivo, llevando a cabo un split 1:6, dividiendo el total de células de la placa inicial a 6 placas T-flask de $75\text{ [cm}^2\text{]}$.

Para llevar a cabo las expansiones, se descartó el medio de la placa madre y se agrego PBS en razón 1:2 con respecto al volumen de medio inicial. El volumen agregado se desplazo dentro de la placa de manera que alcanzara toda la superficie durante 1-2 min. Una vez alcanzado el tiempo, se descartó el PBS y se agrego 1 o 5 ml de una mezcla de 1:4 de Tryple Select:PBS (para que quede 2x), según se trabajara con T-flask de $25\text{ [cm}^2\text{]}$ o T-flask de $75\text{ [cm}^2\text{]}$ respectivamente. Se dejo actuar durante 10-15 minutos a temperatura ambiente y se realizo fuerza mecánica a un costado de la placa cada 5 minutos, con el fin de ayudar a la resuspensión celular. Finalmente, para llevar a cabo la inactivación de la tripsina, se agrego medio de cultivo en una razón 1:1 con la mezcla de Tryple-PBS. Se recuperaron las células resuspendidas en un falcón y se centrifugo entre 7-10 min a 10.000 RPM. Se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspende según el volumen de trabajo deseado.

Una vez alcanzado el 3^{er} pasaje desde el descongelamiento, se procedió a realizar un banco de células siguiendo las recomendaciones entregadas por la empresa. Para esto, se resuspendio la totalidad de las células recuperadas desde una placa en una mezcla compuesta por 90%

FBS y 10 % DMSO, de manera que la concentración sea de $1,5 - 2 \cdot 10^6$ [células/ml]. Desde la mezcla, se vierte un volumen entre 1 y 1.5 ml en crioviales, hasta agotar el volumen total. Una vez finalizado, los stocks de células son almacenados directamente en el congelador a -80°C .

4.1.2. Curva de crecimiento en adherencia según condiciones basales de Veterquímica S.A

Siguiendo el protocolo entregado, se inocularon un total de 22 T-flask de 25 [cm²] utilizando dos T-flask de 75 [cm²] en 80-90 % de confluencia según un split 1:4. Esto fue equivalente a inocular cada placa con $0,005 \cdot 10^6$ [células/cm²]. Se determinó la densidad y viabilidad celular según el método de exclusión con azul tripán, obteniendo un total de 11 puntos separados por intervalos regulares de 24 +/- 6hrs. Una vez obtenida la curva, se determinó la velocidad de crecimiento específica, el tiempo de duplicación y la densidad máxima alcanzada.

4.1.3. Curva de crecimiento en adherencia: alta densidad celular MEM.

Se inocularon un total de 22 T-flask de 25 [cm²] con 8ml de MEM Completo a una densidad de $0,04 \cdot 10^6$ [células/cm²]. Se determinó la densidad y viabilidad celular según el método de exclusión con azul tripán, obteniendo un total de 11 puntos separados por intervalos regulares de 24 +/- 6hrs. Una vez obtenida la curva, se determinó la velocidad de crecimiento específica, el tiempo de duplicación y la densidad máxima alcanzada.

4.1.4. Curva de crecimiento en adherencia: alta densidad celular DMEM-F12.

Se inocularon un total de 30 T-flask de 25 [cm²] con 8ml de DMEM-F12 a una densidad de $0,04 \cdot 10^6$ [células/cm²]. Se determinó la densidad y viabilidad celular según el método de exclusión con azul tripán, obteniendo un total de 14 puntos. Una vez obtenida la curva, se determinó la velocidad de crecimiento específica, el tiempo de duplicación y la densidad máxima alcanzada.

4.1.5. Tolerancia a pluronic

Para evaluar la tolerancia de la línea celular al Pluronic F-68 (GIBCO), se inocularon 12 T-flask de 25 [cm²] a una densidad de $0,04 \cdot 10^6$ [células/cm²]. Cada placa se dispuso de manera que tuviera 8ml de MEM completo suplementado con diferentes concentraciones de surfactante. Así, cada trío de placa presentaba respectivamente 0 %, 0.05 %, 0.1 % y 0.2 % de

Pluronic F-68. Se determino la densidad y viabilidad celular según el método de exclusión con azul tripán y se compararon los resultado para cada una de las concentraciones.

4.2. Infección con IPNV

Para llevar a cabo la infección, se disponía de un stock viral de IPNV proporcionado por VQ. El metodo de cuantificación empleado corresponde a Reed & Muench, el cual se basa en la infección de cultivos celulares a través de una dilución seriada desde el stock viral, permitiendo determinar la concentración de virus requerida para que la mitad de los cultivos presentan un efecto catóptrico ($TCID_{50}$). Este parámetro se relaciona de manera que el numero de unidades formadoras de placas (UFP) esperadas sea el $0,7 \cdot TCID_{50}/ml$.

El protocolo de infección utilizado queda descrito a continuación. Primero, se realizaron diluciones seriada con factor 1:10 desde 1 ml del stock viral. Se retiro y descartó el medio de los cultivos a infectar y se llevó a cabo una limpieza con PBS. Una vez finalizado el pretratamiento, se infectaron entre 3 y 4 placas con cada dilución de manera que el volumen de virus vertido correspondiera a un décimo del volumen final. El resto del volumen corresponde al medio de cultivo para la infección, siendo MEM Completo con 2% FBS. Es importante destacar que para todos los casos, existió un control negativo, o sea un set de placas sin infectar y una infección directa, basándose en el vertimiento de de stock viral sin diluir a la placa, representando así el control positivo.

Alcanzada la semana post-infección, se procedió a realizar la observación de las placas vía microscopio de fase invertida, con el fin de contabilizar las placas que presentaron efecto citopático. Una vez determinada las placas positivas, se procede a calcular el $TCID_{50}$ según la metodología de Reed & Muench.

4.2.1. Infección de cultivos CHSE-214 en alta y baja densidad

Se realizo el cultivo de CHSE-214 en 42 T-flask de 25 [cm²] en un volumen total de 8ml de medio, el cual corresponde a MEM Completo. Estos últimos fueron inoculados a una densidad de $0,04 \cdot 10^6$ [células/cm²], realizando de manera diaria observaciones de las placas vía microscopio con el fin de evitar cualquier irregularidad del cultivo al momento de la infección.

Al alcanzar un 90% de confluencia visual, equivalente a $0,14 \cdot 10^6$ [células/cm²], se procedió a llevar a cabo el protocolo de infección en 21 de las 42 placas, representando la infección para baja densidad celular.

Por otro lado, para la infección a alta densidad, se infectaron 21 placas del cultivo cuando este presento cerca del 80% de la densidad celular máxima alcanzada con respecto a la curva

de crecimiento en adherencia , siendo en este caso $0,26 \cdot 10^6$ [células/cm²].

4.2.2. Infección de cultivos CHSE-214 en MEM completo y DMEM-F12 suplementado

Para llevar a cabo la infección en DMEM-F12 y MEM, se realizaron cultivos en placas de 24 pocillos. Se inocularon 4 placas de estas con CHSE-214 a una densidad celular de $0,04 \cdot 10^6$ [células/cm²], donde dos placas fueron crecidas con 1 [ml] de MEM completo por pocillo y las otras dos con 1 [ml] de DMEM-F12 suplementado por pocillo. Al alcanzar una densidad cercana a $0,26 \cdot 10^6$ [células/cm²], se llevó a cabo la infección siguiendo el protocolo previamente descrito, permitiendo así determinar la cantidad de [UFP/ml].

4.3. Cultivo en suspensión

4.3.1. Adaptación inicial

En una primera instancia, se realizaron cultivos en spinner con el fin de ir seleccionando las células mejor adaptadas a crecer en suspensión. Para eso, se inoculo el spinner con 60 ml de DMEM-F12 suplementado con 7 % de FBS y 0,1 % de pluronic, a una densidad de $0,38 \cdot 10^6$ [células/ml]. Alcanzada la semana, se procedió a recuperar el caldo en tubos falcon de 50 [ml], descartando las células que hayan sedimentado en la parte inferior del spinner. Se centrifugo el cultivo recuperado a 1000 RPM durante 8 minutos, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet obtenido en el medio previamente usado para el crecimiento. Se determino la densidad y viabilidad celular según el método de exclusión con azul tripán, teniendo así un punto inicial y final del cultivo.

A continuación, se procedió a repetir dos veces el experimento previamente descrito, utilizando las células suspendidas del pasaje anterior. Sin embargo, se modifico la densidad celular a la cual se inoculo, siendo para las próximas iteraciones de $0,26 \cdot 10^6$ [células/ml]. Con el fin de poseer un stock de células frente a eventualidades, se llevó a cabo el cultivo de las células resuspendidas restantes en T-flask de 75 [cm²]

4.3.2. Punto a Punto

Desde las células en adherencia obtenidas desde el pasaje 2 de adaptación a suspensión, se inoculo un spinner previamente tratado con 60 [ml] de DMEM-F12 suplementado con 7 % de FBS y 0,1 % de pluronic, a una densidad de $0,45 \cdot 10^6$ [células/ml]. Cada 1-2 días, se procedió a recuperar entre 1 a 2 [ml] del cultivo, tomando como precaución que el medio posea una agitación homogénea, y se determino la densidad y viabilidad celular según el método de exclusión con azul tripán. El conjunto de puntos obtenidos permitieron obtener una curva de

crecimiento, presentando así, al igual que para el caso de la curva en adherencia, los parámetros de velocidad específica de crecimiento, tiempo de duplicación y densidad máxima alcanzada. Con las células obtenidas desde el spinner y en adherencia obtenidas desde el pasaje 2 de adaptación a suspensión, se llevó a cabo otro pasaje en suspensión según la misma dinámica previamente descrita, modificando la densidad de cultivo a $0,45 \cdot 10^6$ [células/ml].

4.4. Tasas de consumo y producción de metabolitos

Al momento de evaluar la densidad celular (X) de las placas y de los spinner, se recuperó y preservó a -4°C , 1 [ml] de medio del sobrenadante. Utilizando el equipo ENOLOGY de medición de metabolitos y sus kits comerciales para medición, se evaluaron las concentraciones de glucosa, lactato y piruvato, las cuales permitieron calcular las tasas de consumo (q_c)/producción (q_p) desde la cantidad de células vivas (X_v). Se determinaron también los parámetros de velocidad específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (t_d) y densidad máxima alcanzada para cada uno de los cultivos establecidos (X_{max}).

Las siguientes ecuaciones permiten determinar los parámetros previamente descritos:

$$X_v = X \cdot V \quad (4.1)$$

$$\mu = \frac{1}{X_v} \cdot \frac{dX_v}{dt} \quad (4.2)$$

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} \quad (4.3)$$

$$q_c = \frac{-1}{X_v} \cdot \frac{dC}{dt} \quad (4.4)$$

$$q_p = \frac{-1}{X_v} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (4.5)$$

Para el cálculo de las tasas específicas de consumo/producción, primero se realiza una curva acumulativa, sumando las diferencias de cantidad de metabolito presente en el medio entre dos tiempos consecutivos con la cantidad total acumulada del tiempo previo. Posteriormente, a los datos acumulativos de la fase de crecimiento exponencial se les realizó un ajuste polinómico. Las tasas específicas se calculan como la derivada de la curva evaluada en el tiempo t , dividida por la densidad celular en dicho tiempo. Una vez determinados los ajustes, es posible calcular

la razón entre el generación de lactato y el consumo de glucosa ($\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$), según la siguiente ecuación:

$$\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc} = \frac{-q_{\text{lac}}}{q_{\text{glc}}} \quad (4.6)$$

4.5. Recursos y requerimientos

Los recursos necesarios para llevar a cabo la realización de la memoria son los presentados a continuación:

- Ácido ascórbico (Sigma, A4544)
- Azul tripán (Sigma, T8154)
- Bicarbonato de Sodio (Merk, 106392)
- Buffer fosfato salino (Gibco, 21600-010)
- Colorante Alzarin Red (ChemCruz, sc-205998)
- Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma, D2650)
- DMEM Alta glucosa (Gibco, 12100-046)
- Etaloamina (Sigma, E0135)
- Suero Bovino Fetal (FBS) (Biological Industries, 04-127-1A)
- GlutaMAX (100X) (Gibco, 35050-061)
- Ham's F12 Nutrient Mixture (Gibco, 21700-075)
- HEPES (1M) (Gibco, 15630-08)
- Kit medición glucosa (Biosystems, 12800)
- Kit medición lactato (Biosystems, 12802)
- Kit medición piruvato (Biosystems)
- MEM (1X) (Corning, 10-010-CMR)
- MEM NEAA (100X) (Gibco, 11140-050)
- Mercaptoetanol
- Penstrep
- Piruvato de Sodio (100mM) (Gibco, 11360-070)
- Pluronic F68 10 % (Gibco, 24040-032)
- Putrescina (Sigma, P5780)
- Selenito de Sodio (Sigma, S5261)
- TrypLE (10X) (Gibco, A12177)

4.5.1. Equipos

- Agitador magnético
- Analizador automático en Random Access. (Biosystem, Y15)
- Baño térmico (Labtech)
- Cámara de flujo laminar
- Centrífuga Boeco C-28
- Centrífuga Eppendorf 5403
- Incubadora
- Microscopio
- pHmetro (HANNA)
- Refrigerador -80°C (SO-LOW, U85-13)

4.5.2. Material de laboratorio

- Agua Desionizada
- Agua Destilada
- Botellas 250 y 500 mL
- Cámara Neubauer
- Contador
- Etanol
- Filtros 0,2 μm (Sigma)
- Jeringuas de 1, 5 y 20 ml
- Micropipetas p1000, p200 y p20
- Pipeta plástica estéril 2, 5, 10, 25 y 50 mL
- Placas 24 pocillos
- Placas Petri grado cultivo 60mm
- Propipeta (Drummond)
- Puntas p1000, p200 y p20
- Rotor de reacción (Biosystems, AC11485)
- Spinner flask
- T-flask 175, 75 y 25
- Tubos eppendorf 2, 1.5 y 0.6 mL
- Tubos falcon 15 y 50 ml

Capítulo 5

Resultados y Discusiones

5.1. Cultivo en adherencia

5.1.1. Curva de crecimiento en adherencia según condiciones basales de Veterquímica S.A

En la Figura 5.1 se muestra la curva de crecimiento basal para el cultivo de CHSE-214 en MEM Completo inoculando a una densidad celular según los protocolos entregados por VQ. Es posible identificar las 3 fases del crecimiento celular, donde se observa una fase lag hasta las 65 [h], seguido de una fase de crecimiento exponencial hasta las 186 [h], donde procede una fase de crecimiento estacionario, seguida de una fase de muerte celular.

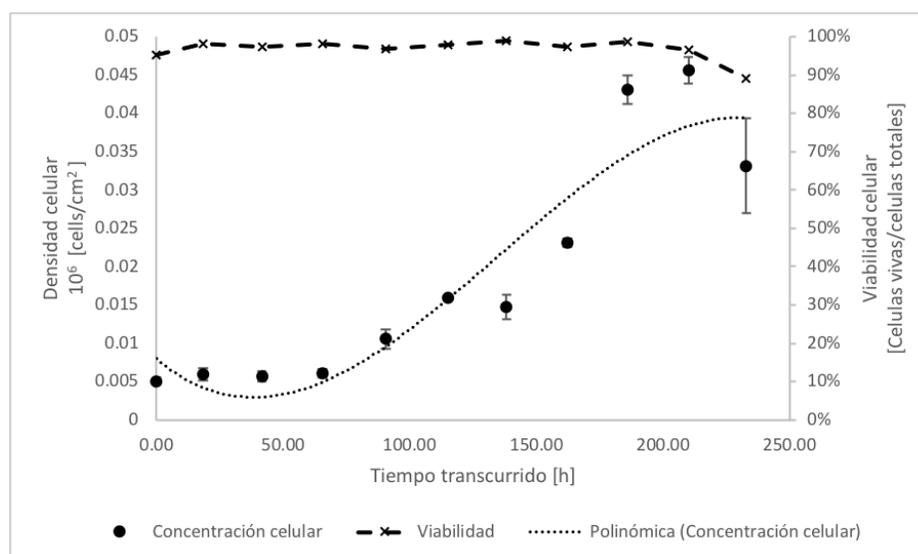


Figura 5.1: Curva de crecimiento de CHSE bajo condiciones basales establecidas por VQ, donde el medio utilizado es MEM Completo y la densidad celular de inoculación fue de $0,005 \cdot 10^6$ [células/cm²] o $12 \cdot 10^6$ [células/ml]

El cultivo tuvo una duración de 10 días, presentando una viabilidad celular siempre mayor a 89%, logrando alcanzar una densidad máxima de $0,046 \cdot 10^6$ [células/cm²] o $0,14 \cdot 10^6$ [células/ml], con una velocidad específica de crecimiento de 0.0134 [h⁻¹], representando un tiempo de duplicación del orden de las 52 [h].

Pese a que pareciera lograrse un aumento de la densidad celular a lo largo del tiempo, la técnica de conteo empleada, en este caso, el método de exclusión con azul tripán, es propenso a errores para mediciones de volúmenes con concentraciones menores a las de $1 \cdot 10^6$ [células/ml] [15]. Esto implica que los resultados obtenidos no son necesariamente representativos de la densidad celular real presente en cada tiempo de los cultivos. Por otro lado, la densidad mínima necesaria para la inoculación de un spinner con 50-60 ml de medio es de $1 \cdot 10^6$ [células/ml], dado esto, sería necesario un total de 50-60 T-flask de 25cm^2 en confluencia según estas condiciones.

Así, es necesario llevar a cabo la repetición de esta prueba, por un lado respondiendo a la densidad mínima establecida para poder aplicar de manera coherente la técnica de conteo disponible y por otro lado, buscando alcanzar mayores densidades celulares para permitir un desarrollo óptimo del trabajo de adaptación a suspensión.

5.1.2. Curva de crecimiento en adherencia: alta densidad celular MEM.

Dado los resultados previamente obtenidos, se procedió a realizar un cultivo de "alta densidad", con respecto a los parámetros establecidos en la prueba de condiciones de basales de la empresa. Para esto, la densidad celular inoculada fue de $1,06 \cdot 10^6$ [células/ml] o $0,042 \cdot 10^6$ [células/cm²], siendo así cercana a la densidad máxima alcanzada en las condiciones basales. La Figura 5.2 presenta las curvas de crecimiento y viabilidades obtenidas para este cultivo, tanto en [células/cm²] como en [células/ml].

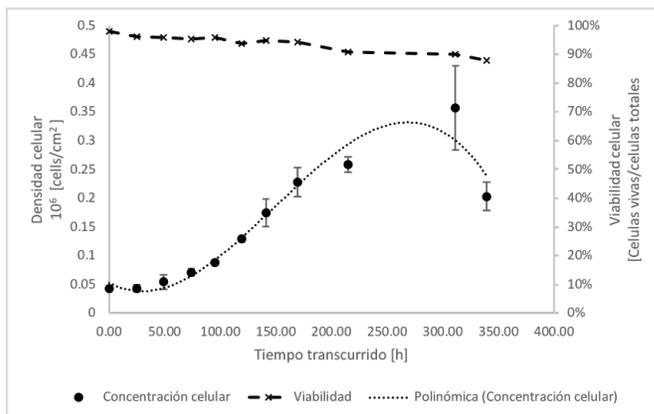


Figura 5.2: Curva de crecimiento de CHSE-214 donde el medio utilizado es MEM Completo y la densidad celular de inoculación fue de $0,042 \cdot 10^6$ [células/cm²] o $1,1 \cdot 10^6$ [células/ml]

Al comparar la densidad máxima alcanzada, se distingue que esta representa 7.8 veces la

densidad máxima previamente obtenida, siendo ahora de $0,36 \cdot 10^6$ [células/cm²] o $1,12 \cdot 10^6$ [células/ml]. Se presenta un comportamiento clásico de crecimiento celular, primero con una fase lag de adaptación al medio, acompañado de la activación de rutas metabólicas hasta las 74 [h], seguido de una fase de crecimiento exponencial hasta las 170-200 [h], finalizada por una fase estacionaria y de muerte celular, visibilizada por la disminución de la viabilidad celular. Así, el cultivo se extendió por un total de 14 días, presentando una viabilidad superior al 88 % y un tiempo de duplicación de 77,9 [h].

Sin embargo, es importante destacar que puede que la cantidad de células muertas este subestimada, dado que el pre tratamiento de conteo posee una etapa de lavado en la cual se descarta el sobrenadante. Las células sanas crecen adheridas a la superficie tratada de la placa, sin embargo, las muertas tienden a desprenderse, por lo que son descartadas al momento de realizar el lavado, implicando que el conteo de células muertas sea menor a la cantidad real.

Por otro lado, existen varios puntos que pueden estar al origen de una mayor concentración celular. En efecto, la inoculación de las placas con concentraciones celulares muy bajas pueden implicar tiempos de adaptación muy largos y en consecuencias densidades celulares muy bajas inicialmente. Esto puede deberse a que las interacciones células-células están al origen de una serie de parámetros claves en la proliferación celular, dado la síntesis de factores de autocrinos y endocrinos. Así, una baja densidad celular utilizada para la inoculación, se traduce en una dilución importante de estos factores, evitando la señalización entre células y en consecuencia dificultando su proliferación [15]. Es importante evidenciar que las velocidades específicas de crecimiento se mantienen constante en ambos casos, poniendo en evidencia que existe un estado metabólico celular similar para ambas pruebas.

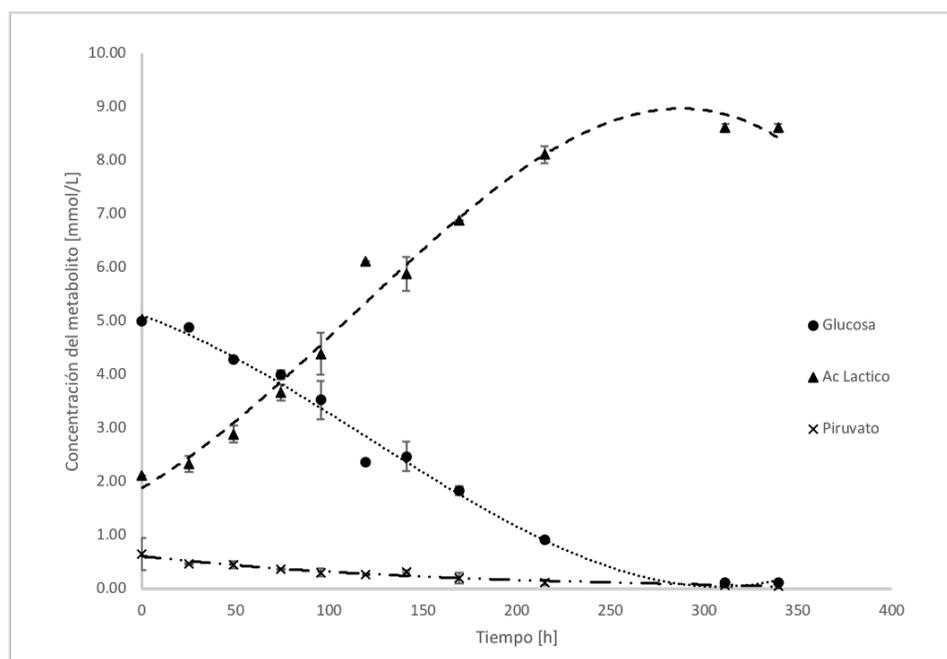


Figura 5.3: Curva de concentración de glucosa, ácido láctico y piruvato en función del tiempo en el cultivo de CHSE-214 de alta densidad en MEM Completo.

Por otro lado, se llevo a cabo el análisis del consumo y producción de glucosa, lactato y piruvato, los cuales quedan presentados en la Figura 5.3.

Se observa una disminución de la glucosa a lo largo del tiempo, pasando de los 5 [mM] a 0 [mM] en un tiempo cercano a las 300[h] (o 12,5 días). De igual manera, en este mismo plazo de tiempo, existe una disminución del 90 % en la concentración piruvato, el cual disminuye de 0,6 [mM] a 0,06[mM]. Finalmente, se observa un aumento mantenido de la concentración de ácido láctico, deteniéndose igualmente a las 300 [h], con una concentración cercana a los 10 [mM].

Dado los resultados anteriores, es posible determinar que existe un consumo de la glucosa y del piruvato como fuente de carbono, tal como queda explicitado en bibliografía [27]. El consumo de la fuente de carbono se traduce tanto en el crecimiento de biomasa, lo cual queda reflejado por el aumento de esta a medida, pero también en la producción de ácido-láctico. De aquí se distingue que el agotamiento de la glucosa se acompaña de la muerte celular, pudiendo ser entonces la falta de una fuente de carbono la principal explicación en la detención de la proliferación del cultivo. Sin embargo, existen estudios que demuestran que las CHSE, a diferencia de la gran mayoría de las células mamíferas, son capaces de crecer sin glucosa, lo que se logra a través del consumo de aminoácidos, siendo inicialmente el consumo de glutamina. Pese a que no se realizó una cuantificación de este aminoácido, su concentración supera los 2.5 [mmol/L] presentes en el DMEM-F12, dado la adición de GlutaMAX, por lo que no debería de existir un agotamiento de esta fuente de carbono. Sin embargo, la literatura estipula que se presenta una inhibición del crecimiento de esta línea celular para concentraciones de glutamina mayores a 0.6 [mmol/L]. Así, pese a la disponibilidad de este aminoácido como fuente alternativa de carbono, la inhibición generada por sus altas concentraciones y por la falta de glucosa podrían explicar el aumento en la tasa de muerte celular [41] [42].

Con respecto a la razón entre producción de lactato y consumo de glucosa, se observa un $\Delta Lac/\Delta Glc = 1,44$. En la teoría, los hibridomas presentan un *yield* entre estos metabolitos del orden de 1.4-2 moles de lactato por mol de glucosa consumido [43], en particular en las CHSE-214, para 1 [g/L] de glucosa y 0,1 [g/L] de glutamina, se tiene una razón de $\Delta Lac/\Delta Glc = 1,39$ [41], estando dentro del mismo orden que para las condiciones trabajadas. Es importante destacar que a mayor sea esta tasa, peor es el estado metabólico de la célula, donde esta última tiene peor eficiencia en el consumo de glucosa, dado que a mayor *yield*, mas es la cantidad de glucosa derivada en la producción de lactato en vez de otras funciones.

Dado los resultados previamente presentados, la densidad celular a alcanzar podría ser mayor según la disponibilidad de nutrientes, en particular de la fuente de carbono. Así, se evaluaron los parámetros de crecimiento de CHSE-214 cuando no exista agotamiento de la fuente de carbono, para lo cual se llevo a cabo el crecimiento en DMEM-F12 suplementado.

5.1.3. Curva de crecimiento en adherencia: alta densidad celular DMEM-F12.

A continuación, se procedió a evaluar el crecimiento en DMEM-F12 suplementado, el cual es un medio mucho mas rico en glucosa, vitaminas y aminoácidos, con el fin de determinar

Tabla 5.1: Parámetros de cultivo obtenidos para CHSE-214 en DMEM - F12 suplementado.

<i>Parámetro</i>	<i>Valor</i>
Densidad máxima alcanzada	0,56 [células/cm ²] y 1,75 [células/ml]
Velocidad específica de crecimiento	0,01 [h ⁻¹]
Tiempo de duplicación	67,3 [h]
$\Delta Lac/\Delta Glc$	1,31 – 0,81

tanto la curva como los nuevos parámetros de crecimiento. La Figura 5.4 y la Tabla 5.1 presentan los resultados obtenidos.

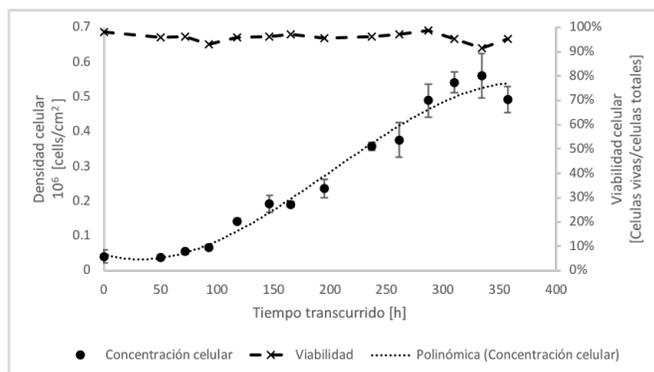


Figura 5.4: Curva de crecimiento de CHSE-214 donde el medio utilizado es DMEM-F12 suplementado y la densidad celular de inoculación fue de $0,041 \cdot 10^6$ [células/cm²] o $1 \cdot 10^6$ [células/ml]

Al comparar las curvas de la Figura 5.5, se observa que existe un comportamiento muy similar para la fase de crecimiento exponencial hasta un tiempo 250 [h], que coincide con una concentración baja de glucosa y piruvato para el cultivo en MEM. Desde ese punto, existe la detención del crecimiento del cultivo en MEM, sin embargo, para el caso de DMEM-F12, se distingue un aumento mantenido de la densidad celular hasta las 334 [h]. Al comparar las densidades máximas alcanzadas, se observa que el cultivo en el medio rico llega a $0,56 \cdot 10^6$ [células/cm²] o $1,75 \cdot 10^6$ [células/ml], representando una concentración de 1.57 veces la alcanzada en MEM. La viabilidad celular se mantiene siempre por sobre el 90 % y se llevo a cabo el cultivo en un tiempo de 15 días.

Así, en una primera instancia, la obtención de una mayor biomasa a mayor disponibilidad de glucosa coincide con los estudios previos, donde cultivos de CHSE-214 inoculados a $0,4 \cdot 10^6$ [células/ml] alcanzan densidades cercanas a $1,6 \cdot 10^6$ [células/ml] al disponer de glucosa y amino ácidos frente a las $0,7 \cdot 10^6$ [células/ml] obtenidas sin glucosa ni glutamina pero con otros amino ácidos [41].

Pese a que se alcancen densidades mayores, existe un aumento en 25 % del tiempo de duplicación, lo cual se opone a la tendencia de las curvas, muy similares para la fase de crecimiento exponencial. Existen varias razones que pueden estar al origen de este fenómeno, en particular, una explicación corresponde a los puntos utilizados. En efecto, el punto posterior al de las 214 [h] en MEM está disponible a las 311 [h], y dado que las velocidades específicas

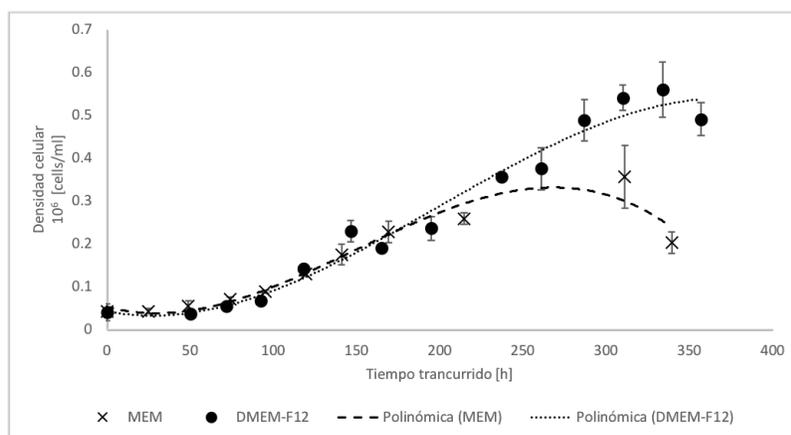


Figura 5.5: Comparación del crecimiento de CHSE-214 en DMEM-F12 suplementado y MEM Completo.

de crecimiento se calculan según los puntos y no según la aproximación polinómica, entonces existe un error asociado a la falta de información en ese tramo, pudiendo explicar la diferencia entre los parámetros de crecimiento.

Para dilucidar si los metabolitos del DMEM-F12 son los que están al origen de las mayores concentraciones alcanzadas, se realizó la medición de las concentraciones tanto de glucosa como de lactato. En la Figura 5.6 se observa la variación de las concentraciones de dichos metabolitos. Se observa una disminución sostenida de la glucosa una vez terminada la fase lag, bajando desde 16,56 [mM] hasta 9,86 [mM], mientras que se distingue un aumento sostenido del lactato consecuencia del metabolismo celular, pasando de 1,28 [mM] a 8,22 [mM]. Así, en una primera instancia, se podría pensar que la mayor cantidad de células obtenidas con respecto al caso con MEM puede estar asociado a la disponibilidad de una fuente de carbono.

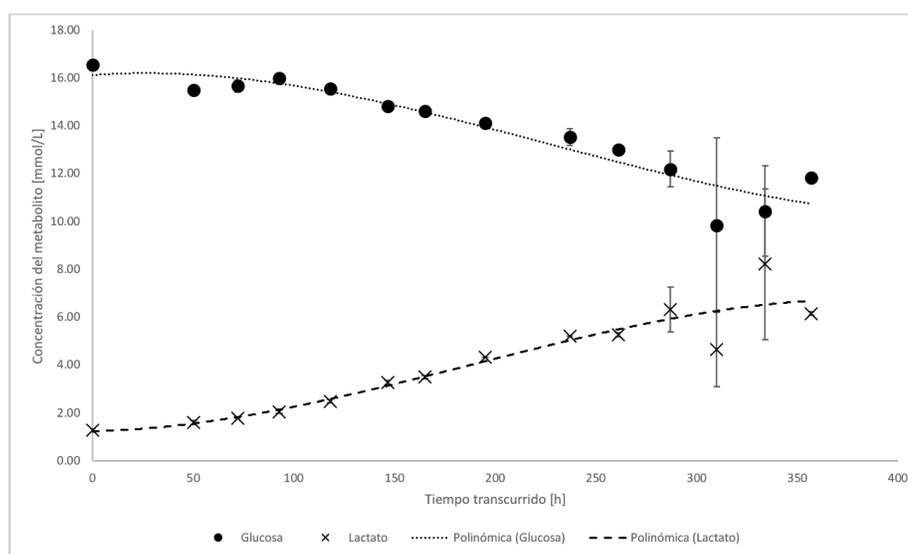


Figura 5.6: Curva de concentración de glucosa y ácido láctico en función del tiempo en el cultivo de CHSE-214 de alta densidad en DMEM-F12 suplementado.

Se destaca que pese a que se haya alcanzado una mayor cantidad de [células/ml] con el uso de DMEM, sigue existiendo una detención del crecimiento celular. Ya que sigue habiendo disponibilidad de glucosa, se descartó la falta de este como principal fuente. Sin embargo, al igual que en el uso de MEM, se alcanzan concentraciones cercanas a los 8 [mM] de lactato. La acumulación de lactato en el medio posee un efecto inhibitorio en la proliferación celular, sin embargo, está reportado para otras líneas celulares que esto solo ocurre para altas concentraciones, superiores a los 20 [mM] [44]. Estudios en CHSE-214 ponen en evidencia que existe un factor inhibitorio en la proliferación celular para concentraciones superiores a 6,1 [mM] de lactato en el medio. Dado que la concentración de este metabolito llegó a valores superiores a la cota desde las 287 [h], pudiendo ser un factor en la detención en la proliferación

Además, cuando los cultivos alcanzan altas densidades, puede ocurrir el fenómeno de inhibición por contacto, llegando a un hacinamiento celular, donde las células ya no disponen de más superficie o matriz sobre la cual crecer. En este punto puede ocurrir la modificación de la morfología de la célula, la cual usualmente se acompaña de la detención de la proliferación [15]. La observación microscópica de los cultivos de altas densidades ponen en evidencia el *cell crowding*, ya que no se observa espacio de la placa libre de célula, además de que ocurre una modificación del tamaño de las células dado la alta densidad alcanzada, pasando de presentar una morfología epitelial extensa a reservarse únicamente a una circular con radio menor al de baja densidad. Así, es posible que la fase estacionaria se alcanza debido a la falta de disponibilidad de matriz para adherirse, generando la detención de la proliferación acompañado de una modificación morfológica de la célula.

Pese a lo anterior, no es posible descartar el agotamiento de amino ácidos u elementos trazas claves para el crecimiento de esta línea celular. Sin embargo, dado que el metabolismo de las células CHSE-214 ha sido poco estudiado, no es posible determinar que factores se podrían requerir en mayor concentración. Así, queda propuesto la realización de un perfil de consumo de amino ácidos, para así establecer un análisis de flujo metabólico de la célula, el cual permitiría alimentar el cultivo de manera de responder a sus necesidades [41].

5.1.4. Tolerancia a Pluronic.

Tabla 5.2: Concentración final y viabilidad de células para cultivo de CHSE-214 para distintas concentraciones de Pluronic-F68.

Pulornic-F68 en el medio	Densidad celular final [células/cm²]	Viabilidad
0,05 %	0,35 ± 0,06	91 %
0,1 %	0,37 ± 0,04	94 %
0,2 %	0,33 ± 0,05	86 %
Control	0,36 ± 0,05	93 %

Con el fin de adaptar las células a crecer en suspensión, se suelen agregar agentes surfactantes al medio de cultivo, para así disminuir el daño generado por la agitación mecánica del *spinner*. En particular, el disponible para este caso correspondió al Pluronic F-68, el cual, según la concentración agregada al medio, puede ser tóxico para las células. La Tabla 5.2

permite evaluar la densidad celular y viabilidad obtenida después de un cultivo de 12 días para diferentes concentraciones de surfactante.

Las concentraciones de las densidades celulares alcanzadas para los cultivos crecidos con Pluronic difieren en menos de 10 % de la densidad obtenida en control. A esto se le agrega que la viabilidad celular se encuentra siempre por sobre el 86 %, difiriendo como máximo en 7 % del control. Dado esto, pareciera que, para concentraciones del surfactante menores a 0,2 % no se presenta un efecto citotóxico importante en la línea celular CHSE-214. Sin embargo, para un 0,2 % p/v se distinguen tanto la densidad celular como la viabilidad mas baja, pese a que estas diferencias con respecto al control sean menores al 10 %. Así, se opto por trabajar en la adaptación con el mejor de los resultados obtenidos, siendo en este caso una concentración de 0,1 % p/v de Pluronic, en donde se obtuvo 0,37 [células/cm²], con una viabilidad del 86 %.

5.2. Infección con IPNv

5.2.1. Infección de cultivos CHSE-214 en alta y baja densidad celular

Uno de los principales resultados corresponde a la determinación del titulo viral obtenido según diferentes condiciones de cultivo, ya que las condiciones que permitan obtener el mayor titulo viral en el menor tiempo/costo corresponderá al mas conveniente en términos de producción. Así, se llevo a cabo la infección de IPNv en cultivos de baja densidad (según las condiciones de infección utilizadas en la empresa) y en altas densidades, según los resultados previamente obtenidos, cuantificando según la metodología de Reed & Muench. La observación microscópica de los cultivos permitió determinar la presencia de efecto citopático en los cultivos, tal como se puede apreciar en la Figura 5.7.

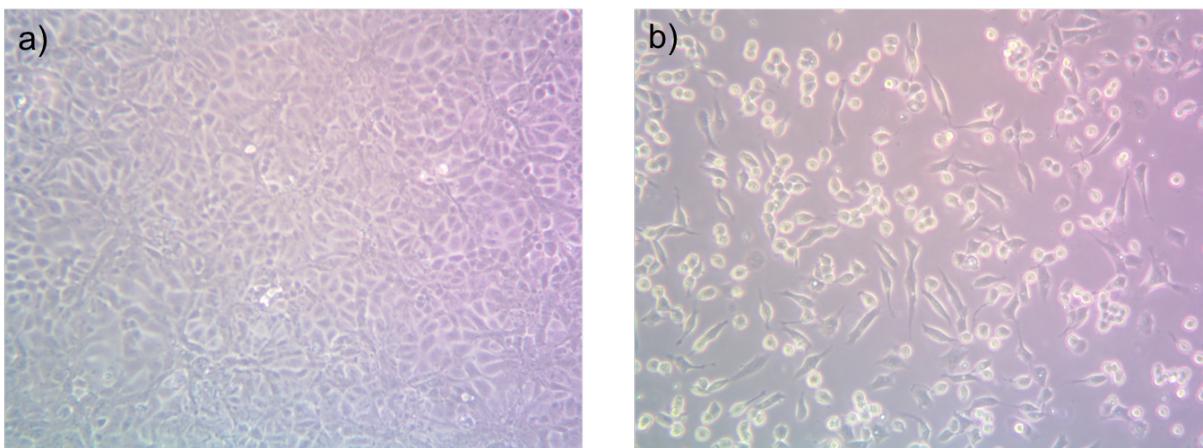


Figura 5.7: Observación microscópica de cultivos CHSE-214 una semana post infección. a) Cultivo de alta densidad sin infectar, presentando *cell crowding*. b) cultivo de alta densidad infectado con IPNv, presentando las características típicas del efecto citopático generado por el virus.

El efecto citopático observado en ciertos cultivos infectados responde a lo reportado en estudios de infección con IPNV. En efecto, en b) se distingue una pérdida de la integridad celular, donde las células cambian su morfología, pasando a presentar una organización circular, lo cual se acompaña del desprendimiento de las células, perdiendo monocapa celular [5][45]. Además, se observa debris celular, consecuencia de la acción lítica producida por el virus en su ciclo de multiplicación. Así, es posible justificar que, al momento de infectar, si se lleva a cabo la endocitosis y multiplicación viral.

Ya determinada la correcta infección se evaluó el efecto de la concentración celular al infectar (CCI), a través de la comparación del título viral obtenido para las infecciones en MEM Completo a $0,41 \cdot 10^6$ [células/ml] y a $0,82 \cdot 10^6$ [células/ml]. Los resultados obtenidos son los presentados en la Tabla 5.3, en donde es posible observar que se obtiene una mayor cantidad de [UFP/ml] para cultivos con un mayor CCI, siendo 3.16 veces más grande cuando el CCI correspondió solamente al doble. Una explicación al origen de estos resultados corresponde al mecanismo de multiplicación del virus. En efecto, este último lleva a cabo inhibición del 85 % de la síntesis de DNA una vez alcanzadas las 9-10 hpi, disminuyendo de manera importante la proliferación celular. Ya que el virus es de carácter lítico, podría haber un punto en que ya no hay disponibilidad de células a infectar, traduciéndose en un menor título viral para menores CCI [45].

Dado que lo que se busca es alcanzar las mayores concentraciones virales, pareciera ser conveniente infectar cuando la densidad celular es al menos el doble que la establecida en el protocolo basal.

Tabla 5.3: Título viral de IPNV obtenido para infección de cultivo CHSE-214 a bajo CCI y alto CCI

CCI [células/ml]	[$TCID_{50}/ml$]	[UFP/ml]
0,41	$3,16 \cdot 10^5$	$2,21 \cdot 10^5$
0,82	$1,00 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^5$

5.2.2. Infección de cultivos CHSE-214 en MEM Completo y DMEM-F12 suplementado

La próxima etapa correspondió a la comparación entre el título viral obtenido al infectar un cultivo de alta densidad crecido en MEM Completo y otro en DMEM-F12 suplementado. Los resultados obtenidos son los presentados en la Tabla 5.4, en donde es posible observar que se obtiene una mayor cantidad de [UFP/ml] para cultivos en MEM, siendo 3,64 veces mayor que cuando se lleva a cabo el cultivo en un medio más rico en nutrientes, siendo el DMEM-F12. Cabe destacar que existe una mantención del título viral en MEM para ambos experimentos, lo que es consecuente, ya que se operó dentro de las mismas condiciones.

Pese a lo anterior, las pruebas realizadas por Veterquímica para baja densidad en MEM entregan un título viral menor. En efecto, el stock presente en las pruebas de laboratorio de la empresa $7 \cdot 10^7$ [UFP/ml], versus los $2,21 \cdot 10^5$ [UFP/ml], siendo 316 veces mayor que la

prueba realizada para esta iteración. Lo anterior puede deberse a una pérdida de infectividad por parte del stock, dado las condiciones en las cuales es almacenado. Estudios demuestran que existe una pérdida exponencial de la infectividad del virus al ser almacenado a 4°C en medio de cultivo una vez alcanzadas las 7 semanas [46], pudiendo justificar el fenómeno observado.

Tabla 5.4: Titulo viral de IPNV obtenido para infección de cultivo CHSE-214 en MEM Completo y DMEM-F12

Medio Utilizado	$[TCID_{50}/ml]$	$[UFP/ml]$
MEM completo	$1 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^5$
DMEM-F12 suplementado	$2,74 \cdot 10^5$	$1,92 \cdot 10^5$

Dado los resultados previamente obtenidos, pareciera ser conveniente llevar a cabo la infección de CHSE-214 en MEM Completo e infectar cuando la densidad celular sea mayor a la utilizada como referencia actualmente.

5.3. Cultivo en suspensión

5.3.1. Adaptación inicial

La primera etapa de adaptación correspondió a una selección de las células mejor adaptadas a crecer despegadas de una matriz. Para ello, se inoculó un *spinner* con DMEM-F12 suplementado con 7% de suero y 0,1% p/v de Pluronic-F68, el cual estuvo a $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ bajo agitación a 70 RPM, y se cuantificó y seleccionó cada una semana las células presentes en sobrenadante, descartando los agregados celulares visibles y las células que decantaron. Al momento de realizar el conteo celular, se pudo apreciar la formación de agregados celulares (Figura 5.8), conocidos como esferoides, los cuales aumentan su diámetro a medida que transcurre el tiempo.

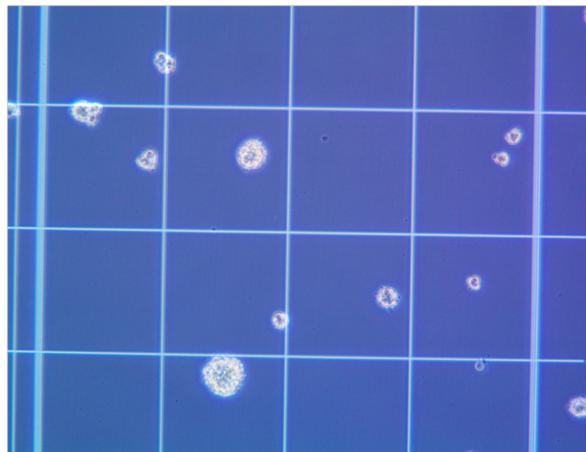


Figura 5.8: Esferoides observados a los 8 días del comienzo de la adaptación a suspensión.

Las densidades y viabilidades obtenidas en cada pasaje son las presentadas en la Figura 5.9.

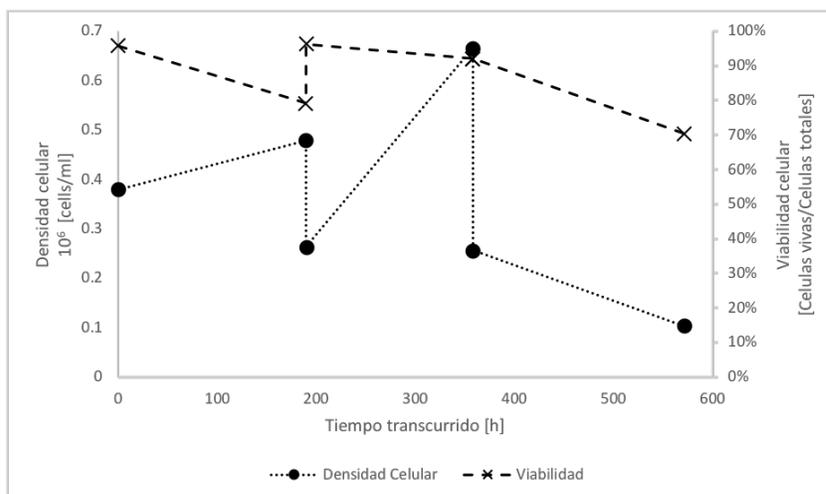


Figura 5.9: Densidad celular del cultivo celular en suspensión CHSE-214 en DMEM-F12 suplementado, medido cada una semana con re inoculación de células seleccionadas.

El primer pasaje presento un aumento de 0.26 % de la densidad celular a los 8 días, sin embargo, hubo una disminución importante en la viabilidad celular, pasando de 96 % a 79 %. Durante el próximo pasaje, el aumento de la densidad celular fue mas importante, llegando a 2,53 veces la densidad inicial, presentando además una viabilidad celular inicial de 96 %, la cual disminuyo hasta 92 %. Lo anterior permite esperar una posible adaptación a suspensión por parte de las células, debido a no solamente una tasa de viabilidad superior al 70 %, sino que también se observo constantemente un aumento de la densidad celular pese al descarte de las células sedimentadas. Sin embargo, el 3er pasaje presento un decaimiento hasta 70 % en la viabilidad celular, acompañado de la muerte del cultivo, el cual alcanzo una densidad de $0,1 \cdot 10^6$ [células/ml], debiendo entonces ser descartado consecuencia de la inviabilidad de este.

5.3.2. Punto a Punto

Con las células recuperadas y crecidas en adherencia desde el pasaje 2 de adaptación a suspensión, se llevo a cabo la inoculación del spinner bajo las mismas condiciones previamente descritas, variando únicamente la agitación, siendo de 90 RPM para el primer pasaje, y de 70 RPM para el segundo. Pese a observar un aumento cercano al 15 % de la densidad inicial en el primer pasaje una vez alcanzadas las 40 (Figura 5.10), se observo un decaimiento de la densidad celular, llegando hasta $0,26 \cdot 10^6$ [células/ml]. Para el segundo pasaje, pese a haber realizado una reinoculación a las 67 [h], hubo una disminución mantenida de la densidad celular, pasando de $0,69 \cdot 10^6$ a $0,22 \cdot 10^6$ en 7 días. Durante este cultivo, se observo un numero importante de células muertas en el conteo celular, sin embargo, este último disminuyo en los próximos días.

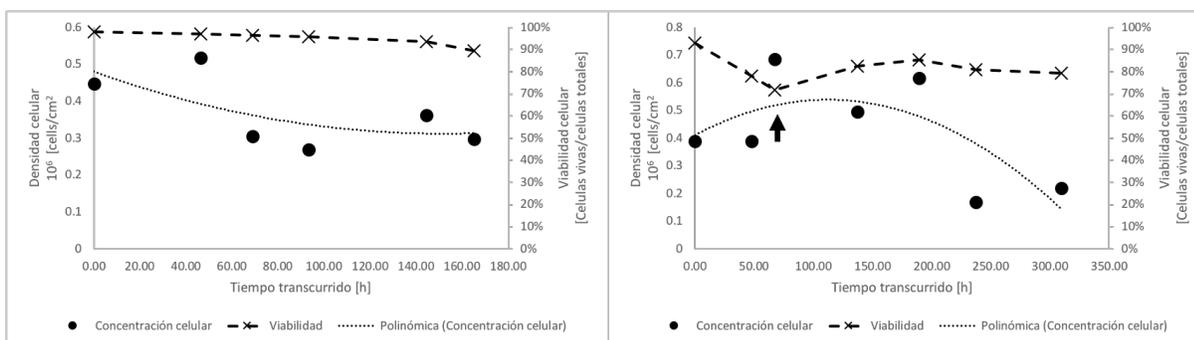


Figura 5.10: Densidad celular del cultivo celular en suspensión CHSE-214 en DMEM-F12 suplementado, medido cada 24 [h]. A la izquierda el pasaje 1 y a la derecha el pasaje 2. La flecha indica el momento en que se llevo a cabo una reinoculación con células en adherencia.

Pese a que la viabilidad celular se mantuvo superior al 90% en el pasaje 1 y superior al 81% en el pasaje 2 (a excepción de a las 67 horas, donde hubo descarte de células muertas y reinoculación), la viabilidad celular puede estar subestimada. En efecto, el rompimiento de las células muertas previamente cuantificadas implica una disminución en los próximos puntos, pudiendo entonces tener un cultivo que se encuentra en constante muerte celular, pero con una viabilidad constante.

Otro factor a considerar corresponde a la disponibilidad de glucosa. Así, se evaluó el consumo del cultivo, observando que existe una disminución constante del consumo de glucosa Figura 5.11. Sin embargo, la concentración de glucosa alcanza un valor mínimo de 12 [mM], por lo que la muerte celular no es consecuencia de un agotamiento en la fuente de carbono.

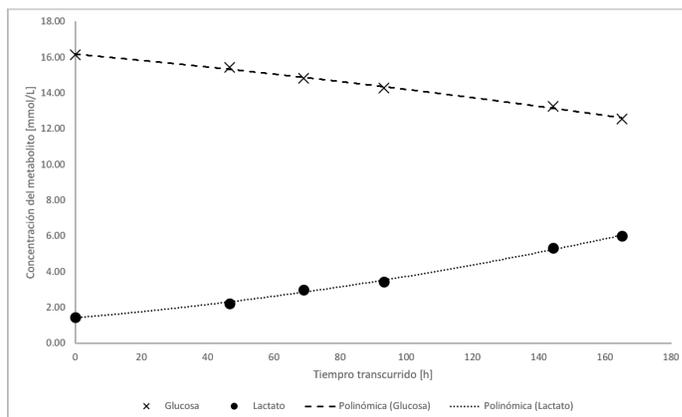


Figura 5.11: Consumo de glucosa y producción de lactato del cultivo celular en suspensión CHSE-214 en DMEM-F12 suplementado, medido cada 24 [h] (Pasaje 1 punto a punto).

A esto se le agrega que la concentración de lactato no supera los 6 [mM], por lo que tampoco existe una inhibición por este metabolito. Durante la adaptación a suspensión, es posible que se pierdan ciertas características que se poseían en adherencia. En particular, es posible que haya ocurrido un cambio en el metabolismo celular después de dos pasajes en suspensión, lo cual puede haber implicado la ausencia de producción de algún factor de

crecimiento que si se disponía previamente en adherencia. Otra posible explicación puede ser que este cambio en el metabolismo requiriera el consumo a una mayor tasa de ciertos nutrientes, agotándolos en el medio y decayendo rápidamente.

5.3.3. Propuestas futuras

Pese a que no se logro llevar a cabo la adaptación a suspensión de la línea celular, existen varios puntos que no fueron evaluados o probados que podrían mejorar las condiciones para permitir la adaptación de las células a suspensión.

Un primer punto a evaluar corresponde a la agitación impuesta al cultivo. En efecto, una agitación muy baja se traduce en sedimentación y agregación celular, evitando la adaptación, mientras que una agitación muy alta puede llegar a generar estrés y hasta daño en las células. En los cultivos realizados, se observo formación de agregados y sedimentación importantes por parte de las células para agitaciones entre 60-70 RPM, pese a que esta fuera la agitación utilizadas en bibliografía en el cultivo de células CHSEsp adaptadas a suspensión [47]. El impeler utilizado en estudios previos consistió en un agitador de paletas [40], sin embargo, en la evaluación realizada en esta tesis se utilizo un impeler con imán de agitación, lo que genera un patrón de agitación diferente, posiblemente menos turbulento, pese a disminuir el el efecto de corte. Esto podría explicar el porque ocurre la formación de agregados celulares de tamaño importante pese a trabajar con la misma velocidad de agitación.

Frente a esto, se propone la realización de pruebas de adaptación con una modificación del tipo de impeller a alguno pendular o de paletas, tal como los de la Figura 5.12, variando la velocidad de agitación, con el fin de determinar los RPM que permiten mantener pequeños agregados celulares sin dañar a las células.

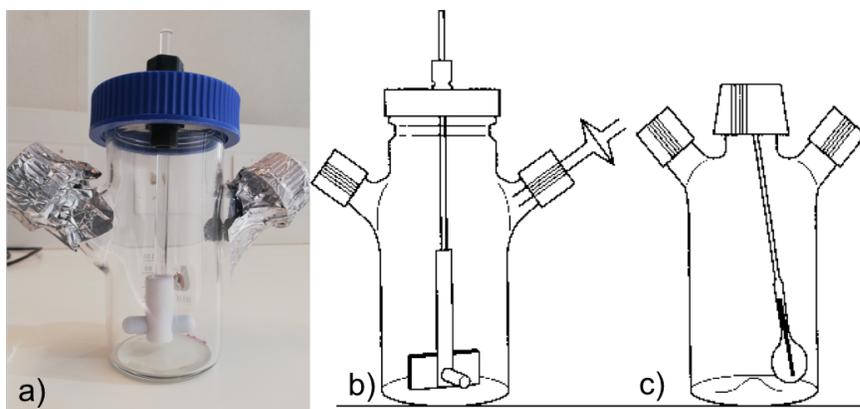


Figura 5.12: Spinners con diferentes tipos de impellers para agitación, siendo de a) Tipo imán (utilizado para las pruebas de laboratorio) b) Paletas c) Péndulo (a la derecha)

Otro factor importante corresponde a las necesidades de las células frente a un cambio en sus condiciones de cultivo. Es usual utilizar medios ricos en vitaminas y amino ácidos para facilitar una adaptación a suspensión. En particular, para la adaptación de CHSE-214, se

utilizan medios ricos en nutrientes, tales como el Waymouth o se suplementan ciertas vitaminas, tales como cloruro de colina (compuesto precursor de la membrana), clorhidrato de tiamina, vitamina C [42] y varios amino ácidos. Estos compuestos se emplearon en concentraciones menores a las utilizadas en otros estudios de adaptación a suspensión, en efecto, la concentración de cloruro de colina en los medios de adaptación es 27 veces la presente en DMEM-F12, mientras que la de clorhidrato de toinaína es casi 5 veces [40]. Por otro lado, se observa la ausencia de ácido ascórbico, en MEM y DMEM-F12, el cual es alimentado en concentraciones del orden de 0,02 [g/L]. Dado la interacción de la vitamina C con radicales libres y en consecuencia con su rol en la disminución del estrés oxidativo, entonces los medios previamente descritos carecen del efecto antioxidante entregado por la vitamina [48]. Así, existe una serie de vitaminas y amino ácidos que podrían llegar a tener un rol importante en el proceso de adaptación, que sin embargo, fueron alimentados a tasas menores que las utilizadas según lo reportado.

Dado lo anterior, se propone suplementar el medio de cultivo utilizado con el fin de responder a las concentraciones de los medios que presentaron resultados positivos en la adaptación. En particular, se puede llevar a cabo la comparación de las formulaciones de los medios aplicados con la de Waymouth MB 752/1, determinando que nutrientes claves podrían estar subalimentados. Aún más, se podría llevar a cabo un análisis del consumo/producción de amino ácidos, para poder determinar cuáles están en abundancia y cuáles se agotan rápidamente, para así determinar como suplementarlos.

Pese a que pareciera ser que ciertos componentes del medio están en concentraciones subóptimas, este no es el caso para todos los metabolitos. En efecto, tanto el MEM como el DMEM-F12 empleados para el crecimiento de las CHSE-214 poseen una concentración de al menos 2,5 [mmol/L]. Sin embargo, se ha reportado que a concentraciones mayores a 0,6 [mmol/L] de glutamina, podría ocurrir un *shift* metabólico en la línea CHSE-214 [42]. Este último generaría un estado metabólico menos eficiente, en donde el $\Delta Lac/\Delta Glc$ podría aumentar hasta un 25 %, la proliferación celular se vería inhibida, dado una disminución del $yield_{X/Glu}$ a menos de 1/3, lo cual se acompañaría de un aumento desde 42 % de la q_{Lac} , pudiendo llegar a generar inhibición por lactato si este supera los 6 [mmol/L]. Todo lo anterior se acompañaría de un aumento máximo en 167 % de la tasa de consumo de glutamina, por lo que pareciera que la modificación en el metabolismo de las CHSE-214 podría derivar en parte de la metabolización de este aminoácido [42].

Así, con el fin de evitar la inhibición del crecimiento de las células por un *shift* metabólico consecuencia de las altas concentraciones de glutamina, se podría llevar a cabo la adaptación desde un medio sin glutamina, tal como ciertas variantes de MEM.

Otro factor importante corresponde al calcio, el cual posee una serie de funciones de señalización, pero también promueve la adhesión celular. En los protocolos de adaptación, se lleva a cabo el trabajo en medios libres de calcio, sin embargo, se podría trabajar con concentraciones bajas que permitan un desarrollo óptimo de las células, tal como una concentración de Ca^{+2} de 100 [μM] [49], a través de la quelación a base de EDTA. Así, se podría disminuir la formación de agregados celulares, respondiendo a los requisitos mínimos de calcio para la señalización celular.

Finalmente, un último punto a mejorar corresponde al protocolo de adaptación empleado.

En efecto, tanto patentes de adaptación a suspensión [37] como los protocolos particulares de las CHSE-214 implementan una alternación entre pasaje en suspensión con pasaje en adherencia. Lo anterior con el fin probable de no perder ciertas características presentes en adherencia que son perdidas a veces al trabajar en suspensión, tales como la síntesis de ciertos factores de crecimiento. Para las CHSE-214, se realizaron 5 iteraciones con 15 días de crecimiento en suspensión y 15 días en adherencia [40], extendiendo solamente el proceso de crecimiento a 5 meses. Dado la restricción de tiempos asociados a la tesis, no fue posible la realización de dicho protocolo. Por lo tanto, se propone la extensión de los plazos de cultivo, tomando en consideración todas las recomendaciones previamente propuestas, para así permitir una nueva prueba de adaptación a suspensión de las células.

Conclusión

La caracterización del cultivo en adherencia según las condiciones empleadas por la empresa mostraron alcanzar densidades celulares pequeñas, lo cual hacía inviable siquiera las pruebas de adaptación a suspensión. Aún mas, la técnica de conteo empleada, el método de exclusión con azul tripán, no permitía la correcta determinación de la densidad celular dado el bajo numero de células presentas en las cámaras al momento de cuantificar. Frente a esto, el aumento de la densidad celular inoculada a $0,042 \cdot 10^6$ [células/cm²] produjo cultivos con 7,8 veces la densidad máxima alcanzada previamente, presentando un tiempo de duplicación de 53,4 [h], permitiendo así la acumulación de biomasa para las próximas pruebas.

Al analizar el consumo y producción de metabolitos, se observo que la detención del crecimiento coincidía tanto con el agotamiento de la glucosa. Por lo tanto, se opto por pasar de MEM Completo a un medio mas rico, siendo este DMEM-F12 suplementado. Las densidades obtenidas fueron 1,57 mayores al crecimiento en MEM, fenómeno asociado a la disponibilidad de nutrientes y al no agotamiento de la fuente de carbono. Sin embargo, sigue existiendo una detención del crecimiento celular, lo cual puede deberse a múltiples razones. Entre las opciones barajadas, se encuentra la inhibición por contacto dado el *cell crowding* generado, el agotamiento de algún metabolito o la inhibición por alta concentración de lactato en el medio.

Las pruebas de tolerancia al surfactante mostraron una mantención de la densidad celular final para las concentraciones evaluadas, sin embargo, los cultivos con 0,2 % p/v de Pluronic-F68 presentaron la viabilidad celular mas baja, del 86 % versus los 94 % con 0,1 %. Así, se opto por trabajar utilizando la concentración que aseguraba la mejor viabilidad para el proceso de adaptación.

Al momento de realizar los análisis del título viral para diferentes condiciones, se pudo determinar con que medio y densidad celular era conveniente trabajar. Las infecciones a densidades mayores reportaron un concentración de virus 3.16 veces mayores, mientras que la comparación entre células crecidas con MEM y DMEM-F12 mostraron una cantidad 3,64 veces mayor de virus en células crecidas en MEM. Así la combinación de alta densidad y crecimiento celular en MEM pareciera ser la óptima para la obtención de un mayor título viral.

A continuación, las pruebas de cultivos llevados a cabo en suspensión no permitieron adaptar las células a las nuevas condiciones de crecimiento. En efecto, durante los primeros 2 pasajes se observo un aumento de la densidad celular, sin embargo, a partir del 3^{ero} solamente se distinguió una disminución de la densidad celular, pasando. Aún frente a una reinocula-

ción el decaimiento en el conteo total siguió ocurriendo. Por lo tanto, para las condiciones planteadas, no fue posible llevar a cabo una adaptación de la línea CHSE-214 a suspensión.

Frente a esto, se realizó una revisión bibliográfica con el fin de proponer mejoras para próximas pruebas de adaptación a crecimiento en suspensión. Lo primero corresponde a la realización de pruebas con diferentes impellers, dado que el cultivo adaptado se logró utilizando un *shafle* de paletas, los cuales generan una agitación diferente a la obtenida en este trabajo. Segundo, se observó que los medios utilizados en otros estudios disponían de ciertos compuestos en concentraciones mayores que los utilizados. Aun más, si estos no estaban presentes, eran suplementados. Para esto, se propone evaluar las diferencias con los medios utilizados y suplementar ciertos compuestos claves, tales como cloruro de colina, clorhidrato de tomaína, entre otros. Los amino ácidos también difieren en concentraciones, por lo que la medición y determinación del consumo de estos podría permitir suplementar al cultivo según sus necesidades.

Pero existen otros compuestos que tienen un efecto inhibitor en el crecimiento de las CHSE-214. El MEM y DMEM-F12 trabajados poseen al menos 2,5 [mM] de glutamina, lo cual afecta la proliferación de las células, dado que concentraciones por sobre las 0,6 [mM] disminuyen el rendimiento entre glucosa y biomasa [42]. Además, aumenta en más de un 100% la producción de lactato, pudiendo entonces provocar una inhibición por este metabolito [42]. Así, se propone trabajar con un medio libre de glutamina y alimentar a concentraciones menores al acotado.

Dentro de la misma línea, el calcio promueve la adhesión celular, o sea la formación de agregados, pero al mismo tiempo cumple un rol fundamental en la señalización. Los cultivos de adaptación exitoso trabajaron sin calcio, sin embargo, se propone el trabajo con una concentración mínima de 100[μ M] calcio que permita un desarrollo de las funciones de señalización.

Como recomendación final, se propone llevar a cabo una alternación entre cultivos en suspensión y cultivos en adherencia, permitiendo mantener las características de proliferación de las células y extendiendo el número de ciclos de selección de las adaptadas.

Pese a que el trabajo estuvo en una fase netamente exploratoria, y aunque se obtuvieron resultados negativos asociados a la adaptación a suspensión, se logró llevar a cabo la caracterización de las células en aspectos que permitirán un mejor trabajo con la línea celular. Se mejoraron las densidades alcanzadas y se recopiló información con respecto a que condiciones favorecen o perjudican la proliferación celular. Así, se espera haber facilitado las próximas iteraciones de pruebas para adaptación a suspensión del cultivo.

Bibliografía

- [1] Salmon Chile. *Quienes somos*. [en línea]. URL: <https://www.salmonchile.cl/es/quienes-somos.php> (visitado 19-08-2017).
- [2] RG Malsberger y CP Cerini. “Characteristics of infectious pancreatic necrosis virus”. En: *Journal of bacteriology* 86.6 (1963), págs. 1283-1287.
- [3] PROSPECTUS SpA. *La Salmonicultura en Chile: Situación Actual y Estrategia de Desarrollo al 2030*. [en línea]. URL: <http://www.chiletransforma.agenciabigblue.com/wp-content/uploads/2017/08/Resumen-ejecutivo-Hoja-de-Ruta-PEM-SS-Version-final.pdf> (visitado 16-08-2017).
- [4] Jaime Figueroa y col. “Addressing viral and bacterial threats to salmon farming in Chile: historical contexts and perspectives for management and control”. En: *Reviews in Aquaculture* 11.2 (2019), págs. 299-324.
- [5] Celene Salgado-Miranda. “Infectious pancreatic necrosis: an emerging disease in the Mexican trout culture”. En: *Veterinaria México* 37.4 (2006), págs. 467-477.
- [6] Eann S Munro, Paul J Midtlyng y col. “Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses”. En: *Fish diseases and disorders* 3 (2011), págs. 1-65.
- [7] Roar Gudding, Atle Lillehaug y Oystein Evensen. *Fish vaccination*. John Wiley & Sons, 2014.
- [8] LF Vega y col. “Evaluación de la respuesta clónico-patológica inmune humoral en crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas experimentalmente con el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV)”. es. En: *Archivos de medicina veterinaria* 43 (de 2011), págs. 27-34. ISSN: 0301-732X. URL: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2011000100004&nrm=iso.
- [9] B Damsgård, A Mortensen y A-I Sommer. “Effects of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) on appetite and growth in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.” En: *Aquaculture* 163.3-4 (1998), págs. 185-193.
- [10] Kuen-Ching Tu, Rex S Spendlove y Ron W Goede. “Effect of temperature on survival and growth of infectious pancreatic necrosis virus”. En: *Infection and immunity* 11.6 (1975), págs. 1409-1412.
- [11] D Tapia y col. “Detection and phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in Chile”. En: *Diseases of aquatic organisms* 116.3 (2015), págs. 173-184.
- [12] Sandra Bravo y Paul J Midtlyng. “The use of fish vaccines in the Chilean salmon industry 1999-2003”. En: *Aquaculture* 270.1-4 (2007), págs. 36-42.
- [13] Hetron Mweemba Munang’andu y col. “Antigen dose and humoral immune response correspond with protection for inactivated infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L)”. En: *Veterinary research* 44.1 (2013), pág. 7.

- [14] Veterquímica S.A. *IPE-VAC Microdosis*. [en línea]. URL: <https://www.veterquimica.cl/wp-content/uploads/2019/04/401892-ET-Vacuna-Ipe-vac-Microdosis-572-01.pdf> (visitado 19-08-2017).
- [15] R Ian Freshney. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons, 2015.
- [16] Veterquímica S.A. *Quienes somos*. [en línea]. URL: <https://www.veterquimica.cl/empresa/quienes-somos.html> (visitado 19-12-2017).
- [17] Peter Dobos. “The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)”. En: *Annual Review of Fish Diseases* 5 (1995), págs. 25-54.
- [18] Ken Wolf y col. “Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout”. En: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 104.1 (1960), págs. 105-108.
- [19] R Labraña, JC Espinoza y J Kuznar. “Detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en sedimentos de agua dulce”. En: *Archivos de medicina veterinaria* 40.2 (2008), págs. 203-205.
- [20] Irene Ørpetveit y col. “Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from salmonid fish enters, but does not replicate in, mammalian cells”. En: *Virology journal* 9.1 (2012), pág. 228.
- [21] Jorge Levican y col. “Infectious pancreatic necrosis virus enters CHSE-214 cells via macropinocytosis”. En: *Scientific reports* 7.1 (2017), pág. 3068.
- [22] “Chapter 16 - Birnaviridae and Picobirnaviridae”. En: *Fenner’s Veterinary Virology (Fifth Edition)*. Ed. por N. James MacLachlan y Edward J. Dubovi. Fifth Edition. Boston: Academic Press, 2017, págs. 319-325. ISBN: 978-0-12-800946-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00016-7>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128009468000167>.
- [23] Jiann-Ruey Hong, Ya-Li Hsu y Jen-Leih Wu. “Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis due to down-regulation of survival factor MCL-1 protein expression in a fish cell line”. En: *Virus research* 63.1-2 (1999), págs. 75-83.
- [24] SAG. *PRODUCTOS BIOLÓGICOS INMUNOLÓGICOS CON REGISTRO PROVISIONAL USO EN SALMÓNIDOS*. [en línea]. URL: https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/lista_salmonidos_registro_provisional_13-12-2019.pdf (visitado 19-12-2019).
- [25] John L Fryer y CN Lannan. “Three decades of fish cell culture: a current listing of cell lines derived from fishes”. En: *Journal of Tissue Culture Methods* 16.2 (1994), págs. 87-94.
- [26] Catherine N Lannan, James R Winton y JL Fryer. “Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids”. En: *In vitro* 20.9 (1984), págs. 671-676.
- [27] Ken Wolf y Winfried Ahne. “Fish cell culture”. En: *Advances in cell culture*. Vol. 2. Elsevier, 1982, págs. 305-328.
- [28] Thermo Fisher. *DMEM/F12 - Dulbecco’s Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*. [en línea]. URL: <https://www.thermofisher.com/cl/es/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/classical-media/d-mem-f12.html> (visitado 21-10-2017).
- [29] Meenakshi Arora. “Cell culture media: A review”. En: *Mater methods* 3.175 (2013), pág. 24.
- [30] Mirtha Henríquez y col. “A novel liquid medium for the efficient growth of the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* and optimization of culture conditions”. En: *PloS one* 8.9 (2013), e71830.

- [31] T Harry Birkbeck y col. "Growth of *Piscirickettsia salmonis* to high titers in insect tissue culture cells". En: *Infection and immunity* 72.6 (2004), págs. 3693-3694.
- [32] Ron P Hedrick, JC Leong y JL Fryer. "Persistent infections in salmonid fish cells with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)". En: *Journal of Fish Diseases* 1.4 (1978), págs. 297-308.
- [33] Zhanqiu Yang y Hai-Rong Xiong. "Culture conditions and types of growth media for mammalian cells". En: *Biomedical Tissue Culture* 1 (2012), págs. 3-18.
- [34] RD Systems. *HEPES Buffer Solution (1 M)*. [en línea]. URL: https://www.rndsystems.com/products/hepes-buffer-solution-1-m-_b35110 (visitado 19-08-2019).
- [35] Olga Liliana Rubio Mejia. "The CHSE-214 salmon cell line as a model to study molecular regulation of long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in salmonids". En: (2015).
- [36] DL Makrinos y TJ Bowden. "Growth characteristics of the intracellular pathogen, *Piscirickettsia salmonis*, in tissue culture and cell-free media". En: *Journal of fish diseases* 40.8 (2017), págs. 1115-1127.
- [37] William R Tolbert y Joseph Feder. "Large-scale cell culture technology". En: *Annual reports on fermentation processes*. Vol. 6. Elsevier, 1983, págs. 35-74.
- [38] M Jordan y col. "Interactions between animal cells and gas bubbles: the influence of serum and Pluronic F68 on the physical properties of the bubble surface". En: *Biotechnology and bioengineering* 43.6 (1994), págs. 446-454.
- [39] Masaaki Mori y col. "Application of a suspension-cultured salmonid cell line CHSE-sp to cytotoxicity test". En: *Fisheries science* 64.6 (1998), págs. 991-992.
- [40] H Karasawa y col. "Development of a suspension culture of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) embryo (CHSE-214) cells in a spinner flask". En: *Bull. Eur. Asso. Fish Pathol* 11 (1991), págs. 142-144.
- [41] Juxing Chen, Xiangming Sun y Yuanxing Zhang. "Growth and metabolism of marine fish Chinook salmon embryo cells: response to lack of glucose and glutamine". En: *Biotechnology letters* 27.6 (2005), págs. 395-401.
- [42] Juxing Chen y col. "Mass cultivation of marine fish Chinook salmon embryo cells in bioreactor with low-serum medium". En: *Aquaculture* 249.1-4 (2005), págs. 35-45.
- [43] Katie F Wlaschin y Wei-Shou Hu. "Fedbatch culture and dynamic nutrient feeding". En: *Cell Culture Engineering*. Springer, 2006, págs. 43-74.
- [44] T Hassell, S Gleave y M Butler. "Growth inhibition in animal cell culture". En: *Applied biochemistry and biotechnology* 30.1 (1991), págs. 29-41.
- [45] C Ortega y R Enriquez. "Factores asociados a la infección celular por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV)". En: *Archivos de medicina veterinaria* 39.1 (2007), págs. 7-18.
- [46] RG Malsberger y CP Cerini. "Characteristics of infectious pancreatic necrosis virus". En: *Journal of bacteriology* 86.6 (1963), págs. 1283-1287.
- [47] Hideki Nakano, Yasushi Wada y Masahide Hasobe. "Chinook salmon embryo (CHSE-sp) cells for fish virus research". En: *In vitro cellular & developmental biology. Animal* (1993), págs. 265-267.
- [48] Michael J Ryan y col. "Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats". En: *Experimental gerontology* 45.11 (2010), págs. 882-895.
- [49] Pablo Caviedes y col. "Methods for cell therapy". En: (2012).

.1. ANEXO: Composición medios MEM y DMEM-F12

Tabla 5: Composición de medios de cultivo MEM completo y DMEM-F12 suplementado

Compuesto	MEM [g/L]	DMEM-F12 [g/L]
Sales Inorgánicas		
CaCl ₂	0.2	0.116
CuSO ₄ · 5H ₂ O	-	0.0000013
Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	-	0.00005
FeSO ₄ · 7H ₂ O	-	0.000417
MgCl ₂ · 4H ₂ O	-	0.02864
MgSO ₄	0.0977	0.04884
KCl	0.4	0.3118
NaCl	6.8	6.996
Na ₂ HPO ₄	-	0.07102
NaH ₂ PO ₄	0.14	0.0543
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	-	0.000432
Aminoácidos		
L - Acido Aspartico	-	0.00665
L - Acido Glutamico	-	0.00735
L - Alanina	-	0.00445
L - Arginina	0.1264	0.1475
L - Asparagina · H ₂ O	-	0.0075
L - Cisteina · 2HCl	0.0312	0.03129
L - Cisteina · HCl · H ₂ O	-	0.01756
L - Fenilalanina	0.0325	0.03548
Glicina	-	0.01875
L - Glutamina	0.292	0.365
L - Histidina	0.0419	0.03148
L - Isoleucina	0.0525	0.05447
L - Leucina	0.0525	0.05905
L-Lisina·HCl	0.0725	0.09125
L - Metionina	0.015	0.01724
L - Prolina	-	0.01725
L - Serina	-	0.02625
L - Tirosina · 2Na · 2H ₂ O	-	0.05579
L - Treonina	0.0476	0.05345
L - Triptofano	0.01	0.00902
L - Valina	0.046	0.05285
Vitaminas		
Acido ascorbico	-	-
Acido folico	0.001	0.00265
D - Acido pantotenico	0.001	0.00224
D - Biotina	-	0.0000035

Compuesto	MEM [g/L]	DMEM-F12 [g/L]
Vitaminas		
Cloruro de colina	0.001	0.00898
Mioinositol o i-Inositol	0.002	0.0126
Niacinamida	-	0.00202
Piridoxal · HCl	-	-
Piridoxina · HCl	0.001	0.002031
Riblofavina	0.001	0.000219
Tiamina · HCl	0.001	0.00217
Vitamina B12	-	0.00068
Otros		
Acido linoleico	-	0.000042
Acido lipoico	-	0.000105
Acido piruvico · Na	-	0.055
Hipoxantina	-	0.0024
Putrascina	-	0.000081
Timidina	-	0.000365
Glucosa	1	3.151

Por cada litro de MEM Completo se utilizaron con:

- 10 [ml] de GlutaMAX (100X) (Gibco), siendo en la solución un total de 0.584 [g/L] o 4 [mM] de glutamina
- 10 [ml] de MEM NEAA (100X) (Gibco)
- 10 [ml] de HEPES (1M) (Gibco)
- 10 [ml] de Sodio Piruvato (100mM) (Gibco)
- 10 [ml] de Penstrep (100x) (Gibco)
- 100 [ml] de FBS (BI)

Por cada litro de DMEM-F12 suplementado se utilizaron con:

- 10 [ml] de HEPES (1M) (Gibco)
- 10 [ml] de Penstrep (100x) (Gibco)
- 100 [ml] de FBS (BI)