



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO  
DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**“Evaluación del cultivo de células HEK293  
suplementadas con ExCyte®: efecto sobre  
crecimiento celular, producción de vectores  
adenovirales y proteína recombinante”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN FARMACIA**

PRESENTA:

**GUSTAVO ROJAS ORTIZ**

DIRECTORA DE TESIS:

**DRA. ANGÉLICA MENESES ACOSTA**

**ASESOR TÉCNICO: M.F. CARLOS A. TAVIRA MONTALVÁN**

**Octubre 2020**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARIA DE DOCENCIA  
JEFATURA DE LA LICENCIATURA

Fecha: 17 de septiembre de 2020  
Asunto: VOTOS APROBATORIOS  
Medio de Notificación: Electrónica  
Folio: FF/D/SD/JLF/0136/2020

**DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**U.A.E.M**  
**PRESENTE**

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis **“Evaluación del cultivo de células HEK293 suplementadas con ExCyte®: efecto sobre crecimiento celular, producción de vectores adenovirales y proteína recombinante”** presentada por el pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. Gustavo Rojas Ortiz, (20131009764)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

Jurado	Firma
Dr. Jorge Alberto Reyes Esparza	_____
Dra. Delia Vanessa López Guerrero	_____
M. en F. Lorena Uribe Toledo	_____
Dr. Erick Ayala Calvillo	_____
M.en C. Angélica Ortega García	_____



**ATENTAMENTE**  
**“POR UNA HUMANIDAD CULTA”**

**M.P.D. Reyna América Serrano López**  
**Secretaria de Docencia**

Cp Archivo  
Cp. Bdm

Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.  
C.P. 62210 Tel. 777 329 7000 Ext. 3365

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ | Fecha:2020-09-17 17:58:13 | Firmante

Xdl9rHutjf3Apd816uS95tUX24Sqx/TeWMr9Ad3o1nQa7y0PjBSLLJntLQXrea3smUTS8bUQaD7x0MvydPOv+HnhdrMV6aoh8DN6QAabjbiuzzddd9XsApDpCjuh6AHYtQE5GvpJc9/ZbyB9hAanq+dkBTihXZnH7sQr/KTRXMIw86LcUedNOaDVTqZ6e7Q4clAP4f0gFi8oJe9WIOSbEFXPw9Z0askm2Sh04ryNSwdQotUEtcNzqqxOSmuJpPoVrt+BMov48IGjZN2kUc6Hda23szlh3X/BYhvMm+nSDKUSgjcVrDhdUXN4UzGfXJ3CxFKMBa8VwRa5SbliPX5ZZQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[SDzV0e](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mBXUbluHNtZjtue8qSEYtQ8ALqAk8eN>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2020-09-29 21:49:29 | Firmante**

WgzS6wmTeiuTCA31+zX8HS/Uh2lhWmOK1+/5KBBJsExyL7K5RhSz0YpZnj/EXhcl4Cys5qbUdyzPNKXDxjqPhBPcOtmlzxnGhafS4zJlqloMVcRooqn0/bVmB0Gg6TkbCwiTSfsmC3ORH/tp26VPq6GQQ9/hfL/7XlubsFfjXE3NiAGJbeJzFvrX8K/wPkjzGUZ6EVxTUW17ocXDbu9o/55sx8yf63iJQ+3M6u3SgXRWw9G41wY2/MWwWwf2t1LcBrbHhIEiZAUJM4XB2C PHbJKOU5/J43H1qEAbc3896Fwrr3CqZGLMI9e20X9tv3Ftr3JvGDrGndPKI88/Q9NZQ==

**LORENA URIBE TOLEDO | Fecha:2020-09-30 07:51:00 | Firmante**

MC1Oxok0oEHpBrvgjaG62.JhsWOC754go4HZBTptMwShKdRnLS1ndynP9asEow8lvWs9yAv4x5kBhClnF4R7H3w8S/1gA6b0v3qsmKXhyc4Fjp+mNdi6GulLMJCr8+Hr0hCbyRXsKyGdoLmIF95bcTWd9Gc84LgpJs14DfgtjPV+b/0Yw0h6O3s7/RcF3jO2jKyttwxP8c0MGlohn9NCDwF8lnxdRVZi06navWeVqEqWcb2Uv14+daei3JlVjV//VqSvSn/9mCa0cJnwp7R Sfla0p9kWr15HdiRhwXDTrdI9Hjky9Ot3CjCqxaKomqIXsiW3uDYGiD1uUkUd6Onew==

**JORGE ALBERTO REYES ESPARZA | Fecha:2020-09-30 15:08:39 | Firmante**

mkgdzCybQ2Yj+bauGsk5CEZLrFIf6ApTVCLjnrqXB+++fqaAW46ZTsmX64oK1fnVkd2Wq3knbeR4f245294Z41o0aMW9m59RLfSg2kfBvGtxu5I5K1ekhauhMsGKz+uk2VHz5EYAlANDD7itMii++dv1OF26wcvQT2qGIOhmg8pO827AzwqjI9MI4+EM/Aadu04KEey/eIv19+aWprwzu64egwFliYn15u5IZPLw5hKGVgWRwDKLH7MRM19ePenEsLaYyiO/GJcxEO QqxE2zGctJ0m8AmB/KILQpHDRdsl7kqojcyloZASnb0kqic/JmEg+kPowPRmXtEahpgQ==

**ANGELICA ORTEGA GARCIA | Fecha:2020-10-01 05:51:55 | Firmante**

Q0XZTVXwhvLnI2ER4Hea9c5TcJ5PgdqjgbKBxbGfkdNBYBF3crH/tkOsBRgaeNe/OAE2jMHSIA4skBn0o1Vm2jWeDG6trPROd3oTxSHBSe9qPR+8MRxz+tXUf+ZvguQ/VtF8JZTK EoR+MWUlcAcfBCdsCW+bbh594/1GTcsZ9oWN/aRRZlItNbfjlaV6HzVklTN7anO9xhY0gJA7o2hrUovOR4RdV8LkDMW/aQQJcoG9q6jWf15+i8Y1R8DY0m4YZ2c4S87AEXE4 3LnfhGsys3nH8MxLeOOI9sTXMaIvWPHvDKoih/mqJpqVypvRYdzg9PQpdM5RuorTssSHS+CQ==

**ERICK AYALA CALVILLO | Fecha:2020-10-01 07:13:32 | Firmante**

WwBG9znE3npoOVkx5k0TtkBUKpnm82VZUKrF6HzGqC0oLC2wIhuJreA+sBI+PiS58TScAr/QnHowMro8YkV18bfdxH404L6eqwppCyOVdWtSViTkH3KkKJZQGDxiPTjvLULHHC 6nw7fv4GquUgrP0Up793ytWkm7j/IMQ5VSS1mORSLr86Xlk7N2LirvnHnxutr9xc0TlZPSZP0inYGv+6M/qUEQXk0y8PZbT1mneSs22yguSOJGwLxiKUaHzBKOg734naW1Z6pivI7 MigZmgbR/dc6ZaL3ZmBxaDfRwFDUGjhb5K9ySO0byXFNKG9s3go8qyJpPwJ8n9N6ibzag==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



q1yD36

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/DaZkVlVuOO1VmCR9Ncd3tUvLrdXTA9>



El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio 7 de Biotecnología Farmacéutica en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), bajo la dirección de la Dra. Angélica Meneses Acosta y asesoría técnica del M.F. Carlos Alberto Tavira Montalván.

Este proyecto fue realizado gracias al apoyo financiero de la convocatoria de CB-2015 con número de proyecto 257408 titulado "Evaluación del sistema células HEK293-Adenovirus como alternativa para producción de proteínas recombinantes y de vectores para terapia génica" cuya responsable técnica es la Dra. Angélica Meneses Acosta de la Facultad de Farmacia-UAEM.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Angélica Meneses Acosta por aceptarme en el equipo “AMA”, muchas gracias por haberme enseñado el mundo de la biotecnología y permitirme aprender de usted.

A mi comité sinodal: el Dr. Jorge A. Reyes Esparza, la Dra. Delia Vanessa López Guerrero, la M.F. Lorena Uribe Toledo, el Dr. Erick Ayala Calvillo y la M. C. Angélica Ortega García, muchas gracias por el tiempo brindado y apoyo.

Le agradezco al M. en C. Mauricio Barrón Castillo de MERCK, S.A. de C.V. por la donación del suplemento ExCyte®.

A todos mis profesores a lo largo de la carrera, gracias por toda su enseñanza y por sembrar ese amor por la carrera en los alumnos.

A mis compañeros del laboratorio 7 de biotecnología farmacéutica, Cony, Yoa, Uriel, Esly, gracias por permitirme estar de curioso cada vez que trabajaban en laboratorio. Maxi y Mirns, muchas gracias por estar juntos en esta aventura, y sobre todo gracias Carlos por el apoyo brindado y tu paciencia. A los nuevos chicos, les deseo lo mejor.

Mis amigos en la Facultad de Farmacia:

Gracias por habernos econtramos. Pao, Diana, Adriel, Enrique, Ricardo, Rix, Ani, Nath, Gaona, Yelz y los que me faltan, su apoyo y amistad en las buenas pero sobre todo en las malas han hecho de esta experiencia la mas grande de todas.

## DEDICATORIAS

A mi familia:

A mis padres. Este trabajo es para ustedes. Mamá, me enseñaste a ser fuerte en la adversidad; papá, siempre alimentaste esas ganas de conocer más. Muchas gracias a los dos por traerme al mundo, su amor y por el apoyo brindado a lo largo de mi vida.

A mis hermanos. Liliana y Alberto, más que hermanos mayores siempre fueron unos segundos padres. Muchas gracias por su apoyo en todo momento y a todas horas, sus enseñanzas, su amor y su “*bullying*”, en verdad algún día espero llegar a ser como ustedes.

A todos aquellos que sin importar lo duro que fue la batalla siguieron la lucha hasta el final...

*“...Uno es valiente cuando, sabiendo que ha perdido ya antes de empezar, empieza a pesar de todo y sigue hasta el final pase lo que pase. Uno vence raras veces, pero alguna vez vence...”*

Harper Lee  
*Matar a un Ruiseñor (1960)*

Dr. Jorge A. Reyes Esparza, su recuerdo siempre estara presente ¡Gracias por todo!

## Tabla de contenido.

Tabla de contenido.....	I
Índice de tablas. ....	V
Índice de figuras.....	VI
Abreviaturas. ....	VIII
<b>1 Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Marco teórico. ....</b>	<b>3</b>
2.1 .... Cultivo de células animales. ....	3
2.1.1 Medio de cultivo.....	9
2.1.1.1 Bases de la formulación de un medio de cultivo. ....	10
2.1.1.2 Suero Fetal Bovino (SFB).....	11
2.1.1.3 Optimización de la formulación de medios de cultivos. ....	14
2.1.2 Crecimiento celular: cinética de crecimiento.....	16
2.1.3 Viabilidad celular.....	18
2.1.4 Actividad metabólica en el medio de cultivo. ....	20
2.2.... Línea celular HEK293 como sistema productor en la industria biotecnológica farmacéutica.....	22
2.2.1 Células HEK293. ....	24
2.3.... Adenovirus. ....	25
2.3.1 Vectores adenovirales. ....	26
2.4.... Interferón- $\gamma$ .....	28
2.4.1 Funciones biológicas del Interferón- $\gamma$ . ....	30
<b>3 Antecedentes. ....</b>	<b>32</b>

3.1 .... Construcción de un vector adenoviral que expresa interferón gamma con uso potencial para la producción de proteína recombinante. ....	32
3.2.... Estrategias para mejorar el cultivo y la productividad en células HEK293.....	33
3.2.1 Multiplicidad de infección y densidad celular para mejorar la producción de vectores adenovirales. ....	34
3.2.2 Suplemento a base de lipoproteínas Ex-Cyte.....	35
<b>4 Justificación.....</b>	<b>38</b>
<b>5 Hipótesis.....</b>	<b>39</b>
<b>6 Objetivo general.....</b>	<b>39</b>
6.1 .... Objetivos particulares.....	39
<b>7 Estrategia experimental. ....</b>	<b>40</b>
7.1 .... Primera fase de proyecto: efecto sobre crecimiento celular.....	40
7.2.... Segunda fase del proyecto: efecto sobre la producción de vectores adenovirales y proteína recombinante. ....	41
<b>8 Materiales y métodos. ....</b>	<b>42</b>
8.1 .... Línea celular.....	42
8.2.... Medios de cultivo.....	42
8.2.1 Medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con SFB. ....	42
8.3.... Suplemento ExCyte®.....	43
8.4.... Medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con ExCyte® y en condiciones de disminución de SFB. ....	43
8.5.... Descongelamiento celular. ....	44
8.6.... Subcultivo de células HEK293. ....	45
8.7 .... Conteo y viabilidad celular. ....	46

8.8....Adaptación de células HEK293 en medio DMEM-F12 suplementado con ExCyte en condiciones de 10% y disminución de 2, 3 y 5% de SFB. ....	47
8.9.... Cinética de crecimiento de células HEK293.....	49
8.9.1 Velocidad específica de crecimiento de una cinética de crecimiento. ....	49
8.10.. Cinética de infección de cultivos de HEK293 10 % SFB y disminución de 2% SFB más ExCyte.....	50
8.11.. Cuantificación de metabolitos de las muestras de los medios de cultivo normales, adaptados e infecciones.....	52
8.12.. Detección de la infección con Ad5/IFN- $\gamma$ en cultivos de HEK293. ....	54
8.12.1 Extracción de ARN de HEK293. ....	54
8.12.2 Remoción de ADN genómico en extracción de ARN.....	55
8.12.3 Síntesis de la primera cadena de cADN. ....	56
8.12.4 Reacción de PCR. ....	56
8.13.. Detección del IFN- $\gamma$ mediante Western Blot.....	58
8.13.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida. ....	58
8.13.2 Electrotransferencia en cámara húmeda. ....	60
8.13.3 Bloqueo, incubación con anticuerpos y revelado de membrana.....	62
8.14.. Obtención del título viral por End Point Dilution. ....	63
<b>9 Resultados. ....</b>	<b>65</b>
9.1....Morfología celular en condiciones normales, suplementadas y en disminución de SFB. ....	65
9.2.... Efecto en el crecimiento celular. ....	67
9.2.1 Cinética de crecimiento HEK293 en condiciones control, suplementadas y con disminución de SFB. ....	67
9.3.... Consumo metabólico de los cultivos de células HEK293.....	75

9.3.1	Glucosa y Lactato.....	75
9.3.2	Glutamina y glutamato.....	78
9.4	.... Efecto de la suplementación de ExCyte en la producción de vectores adenovirales y proteína recombinante. ....	81
9.4.1	Morfología de cultivos de HEK293 infectados con Ad5/IFN- $\gamma$ . ....	81
9.4.2	Infección de cultivos de HEK293 a 10% SFB y 2% SFB + ExCyte/ITS/albúmina. ....	84
9.4.3	Viabilidad celular post infección en cultivos de HEK293: condición normal de crecimiento vs disminución a 2% SFB + ExCyte/ITS/albúmina. ....	85
9.5	.... Consumo metabólico de HEK293 en infecciones con Ad5/IFN- $\gamma$ .....	87
9.6	.... Producción de vectores adenovirales.....	89
9.7	.... Detección y producción de interferón gamma. ....	91
9.7.1	RT-PCR de células HEK293 infectadas con Ad5/IFN- $\gamma$ .....	91
9.7.2	Detección de la producción de la proteína IFN- $\gamma$ por WB. ....	92
<b>10</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>94</b>
<b>11</b>	<b>Conclusión. ....</b>	<b>102</b>
11.1	.. Conclusiones particulares. ....	102
<b>12</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>103</b>
<b>13</b>	<b>Referencias. ....</b>	<b>104</b>
<b>14</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>113</b>

## Índice de tablas.

TABLA 1 COMPOSICIÓN DEL SUERO FETAL BOVINO (SFB), EXTRAÍDO DE FRESHNEY 2010.....	13
TABLA 2 MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS PRODUCIDOS EN CÉLULAS HEK293 Y SU ESTATUS APROBATORIO ANTE LA FDA Y LA EMA. MODIFICADO DE DUMONT ET AL., 2016.....	23
TABLA 3 TIPOS CELULARES IMPLICADOS EN EL SISTEMA INMUNE, INFLAMATORIO U OTRAS RESPUESTAS CUYA ACTIVACIÓN, CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN SON PROMOVIDAS POR EL IFN- $\gamma$ . MODIFICADO DE WALSH, 2007 P. 219. ....	30
TABLA 4 RECOPIACIÓN LITERARIA DEL EMPLEO DE EXCYTE. SUPLEMENTO EN EL CULTIVO EN DISTINTOS TIPOS CELULARES ANIMALES.....	36
TABLA 5 REACTIVOS PARA LA REMOCIÓN DE ADN GENÓMICO EN EXTRACCIÓN DE ARN. EL VOLUMEN DE CADA COMPONENTE ES EQUIVALENTE PARA UNA REACCIÓN. ....	55
TABLA 6 PREPARACIÓN PARA LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE CADN. EL VOLUMEN DE CADA COMPONENTE ES EQUIVALENTE PARA UNA REACCIÓN.....	56
TABLA 7 PREPARACIÓN DE REACCIÓN DE PCR. EL VOLUMEN DE CADA COMPONENTE ES EQUIVALENTE PARA UNA REACCIÓN. ....	57
TABLA 8 PROTOCOLO DE PCR PARA VERIFICAR LA PRESENCIA DEL GEN IFN- $\gamma$ EN CULTIVOS DE HEK293 TRANSDUCIDOS. ....	57
TABLA 9 PROTOCOLO DE PCR AMPLIFICACIÓN DE CONTROL GAPDH.....	58
TABLA 10 REACTIVOS PARA LA PREPARACIÓN DEL GEL RESOLUTIVO AL 12.5 %. LA PREPARACIÓN DE CADA COMPONENTE SE ENCUENTRA EN EL ANEXO III. ....	59
TABLA 11 REACTIVOS PARA LA PREPARACIÓN DEL GEL ESPACIADOR-CONCENTRADOR AL 4 %. LA PREPARACIÓN DE CADA COMPONENTE SE ENCUENTRA EN EL ANEXO III. ....	60
TABLA 12 COMPARACIÓN DE PARÁMETROS DE CONSUMO DE NUTRIMENTOS Y FORMACIÓN DE LACTATO Y GLUTAMATO EN CULTIVOS DE HEK293 A DISTINTAS SUPLEMENTACIONES EN MEDIO DMEM-F12.....	78
TABLA 13 COMPARACIÓN DE PARÁMETROS DE CONSUMO DE NUTRIMENTOS Y FORMACIÓN DE LACTATO Y GLUTAMATO EN CULTIVOS INFECTADOS CON Ad5/IFN-	

Γ DE HEK293 A 10% DE SFB Y 2% DE SFB + EXCYTE/ITS/ALBÚMINA EN MEDIO DMEM-F12. ....	89
--	----

## Índice de figuras.

Figura 1 Representación de los factores necesarios para inducir la proliferación y el mantenimiento de un cultivo de células animales .....	4
Figura 2 Sistemas de expresión usadas en la producción de glicoproteínas por la industria farmacéutica biotecnológica. ....	8
Figura 3 Fases de una cinética de crecimiento celular animal. ....	16
Figura 4 Nutrimientos necesarios para el crecimiento de células animales. ....	21
Figura 5 Estructura del Adenovirus. ....	26
Figura 6 Vectores empelados en ensayos clínicos en terapia génica. ....	27
Figura 7 Resultados de la eficiencia en la transducción del vector Ad5/IFN-γ y producción de IFN-γ. ....	32
Figura 9 Estrategia experimental en la primera fase del proyecto. ....	40
Figura 10 Estrategia experimental en la segunda fase del proyecto. ....	41
Figura 10 Diagrama del sándwich para la transferencia de proteínas. ....	61
Figura 11 Diagrama placa de 96 pozos. ....	64
Figura 12 Morfología de células HEK293. ....	66
Figura 13 Cinética de crecimiento de células HEK293 cultivo control en medio DMEM-F12 a 10% de SFB. ....	68
Figura 14 Cinéticas de crecimiento células HEK293. ....	71
Figura 15 Parámetros cinéticos obtenidos de los cultivos de células HEK293 en las distintas suplementaciones del medio de cultivo DMEM-F12. ....	72
Figura 16 Comparación entre las densidades celulares totales alcanzadas en los cultivos de células HEK293 en medio DMEM-F12. ....	72
Figura 17 Porcentaje de viabilidad celular de cultivos de células HEK293 .....	74
Figura 18 Concentración de glucosa de los cultivos de HEK293 con las distintas suplementaciones y disminuciones de SFB evaluadas. ....	76

Figura 19 Concentración de lactato de los cultivos de HEK293 con las distintas suplementaciones y disminuciones de SFB evaluadas. ....	77
Figura 20 Concentración de glutamina de los cultivos de HEK293 con las distintas suplementaciones y disminuciones de SFB evaluadas. ....	79
Figura 21 Concentración de glutamina de los cultivos de HEK293 con las distintas suplementaciones y disminuciones de SFB evaluadas. ....	80
Figura 22 Morfología de la monocapa celular en cinética de infección de HEK293 en medio de cultivo DMEM-F12 a 10% de SFB. ....	82
Figura 23 Morfología de la monocapa celular en cinética de infección de HEK293 en medio de cultivo DMEM-F12 a 2% de SFB + ExCyte + 1X ITS + albúmina. ....	83
Figura 24 Cinética de infección de células HEK293, cultivo control a 10% de SFB y cultivo a 2% SFB más suplemento ExCyte. ....	84
Figura 25 Viabilidad de cinética de infección de cultivos de células HEK293. ....	86
Figura 26 Concentración de glucosas y lactato en infecciones de cultivos de células HEK293 a 10% de SFB y a 2% de SFB + ExCyte/ITS/albumina. ....	87
Figura 27 Concentración de glutamina y glutamato en infecciones de cultivos de células HEK293 a 10% de SFB y a 2% de SFB + ExCyte/ITS/albumina. ....	88
Figura 28 Determinación del número de partículas virales infectivas de cultivos al 10% SFB y 2% SFB + ExCyte/ITS/Albumina a 120 h. ....	90
Figura 29 Título viral de cultivos HEK293. ....	90
Figura 30 Identificación de los mARN de IFN- $\gamma$ en cultivos infectados a 10% de SFB y 2% SFB + ExCyte a 72 y 120 h post infección. ....	91
Figura 31 Western Blot de sobrenadante de células infectadas con Ad5/IFN- $\gamma$ . ....	93

## Abreviaturas.

°C	.....	Grados centígrados.
μ	.....	Velocidad específica de crecimiento.
μL	.....	Microlitro.
μg	.....	Microgramos.
Adv	.....	Adenovirus.
a.a.	.....	Aminoácidos.
Ad5	.....	Adenovirus tipo 5.
ADN	.....	Ácido desoxirribonucleico.
ATCC	.....	American Type Culture Collection.
CAR	.....	Receptor Coxsackie de adenovirus.
cel/mL	.....	Células por mililitro.
cm <sup>2</sup>	.....	Centímetro cuadrado.
CO <sub>2</sub>	.....	Dióxido de carbono.
CV	.....	Células viables.
g/L	.....	Gramo/litro.
g/cel*h	.....	Gramo/celula*hora.
HEK293	.....	Human embryonic kidney 293.
h	.....	Horas.
IFN-γ	.....	Interferón gamma.
IL 2	.....	Interleucina 2.
IL 12	.....	Interleucina 12.
ITS	.....	Insulina, transferina y selenito de sodio.
NK	.....	Células natural killers.
mg	.....	Miligramos.
min	.....	Minutos.
PBS	.....	Buffer de sales de fosfato.
PCR	.....	Reacción en cadena de polimerasa.
pb	.....	Pares de bases.
qGlucosa (g/cel*h)	.....	Velocidad específica de consumo de glucosa.
qLactato (g/cel*h)	.....	Velocidad específica de consumo de lactato.
SFB	.....	Suero fetal bovino.
td	.....	Tiempo de duplicación.
WB	.....	Western blot.

# 1 Resumen.

El cultivo de células animales es uno de los sistemas típicos más usados para realizar diversos ensayos celulares en las ciencias biológicas y, en la biotecnología, para el desarrollo de biofármacos teniendo un uso masivo dentro del ámbito farmacéutico. Por ejemplo, en la última década, los medicamentos formulados con estos productos se han posicionado como “blockbusters” dentro de la industria farmacéutica, creando la necesidad de innovación en los procesos para eficientar los rendimientos y dar mayor seguridad al producto. Además, su uso en laboratorios para pruebas de citotoxicidad, receptores, proliferación, etc. es cotidiano para la evaluación de compuestos. Bajo este contexto, la eliminación de Suero Fetal Bovino (SFB) es un requerimiento que en algunos casos todavía ha sido complicado de cumplir dado que este compuesto provee miles de compuestos que han sido difíciles de suplir en medios definidos. Por ello, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la adición del suplemento ExCyte® (MERCK, concentrado de colesterol, lipoproteínas y ácidos grasos) como posible alternativa para la disminución de la concentración de suero fetal bovino (SFB) en cultivo de células HEK293 en medio DMEM-F12. De esta manera se evaluó el comportamiento de los cultivos a 2, 3, 5 y 10% de SFB. Se utilizaron ITS y albúmina como suplementos adicionales en los cultivos a 2 y 3% de SFB. Se empleó el vector adenoviral recombinante Ad5/IFN- $\gamma$  que incorpora el transgén de la proteína humana interferón gamma para determinar las capacidades productivas de los cultivos celulares infectados a 10 % SFB y 2% SFB más ExCyte, ITS y albúmina. Los cultivos suplementados con 10% de SFB sirvieron como control de una suplementación estándar para el cultivo de HEK293. Los resultados mostraron que la morfología celular presentada en los cultivos cambió cada que se disminuía el SFB, ya que gradualmente se perdía la forma estrellada característica de las células a ser un poco más alargadas. Los parámetros cinéticos obtenidos en el cultivo a 10 % SFB y ExCyte demostraron una reducción de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) del 12.6% y un aumento del 14.5% en el tiempo de duplicación (Td). La disminución del 5% SFB y suplemento demostraron un descenso del 20.3% en la velocidad

específica de crecimiento y un aumento del tiempo de duplicación del 25.5%, sin embargo, se obtuvo la mayor densidad celular entre los cultivos con las disminuciones de SFB sin ser equiparable al cultivo suplementado sólo con 10% de SFB. Los cultivos con 3 y 2% SFB más ExCyte/ITS/albúmina presentaron grandes cambios respecto a los demás cultivos; se observó una disminución de la  $\mu$  del 56.5 % dando un aumento del 129.7 % en el Td para el cultivo de 3% SFB; y en cultivo a 2% SFB una disminución del 58.8% de  $\mu$  y por tanto, una Td del 142.9% superior, a pesar de las variaciones encontradas la viabilidad presentada en los cultivos fue mayor al 90%. En cuanto al metabolismo, ningún cultivo presentó un reactivo limitante para el crecimiento. Por otro lado, se realizó la evaluación de cultivos infectados con el virus Ad/IFN- $\gamma$  a MOI 5. En la condición crítica a 2% SFB el proceso de infección presentó una viabilidad estable y un comportamiento infectivo normal comparado con el cultivo control, y metabólicamente no se presentó un reactivo limitante para el crecimiento. Se obtuvo una mayor producción de vectores adenovirales en el cultivo de 10 % SFB a 120 h ( $6.04 \times 10^7$  PVI/mL), mientras que a 2% SFB más ExCyte, ITS y albúmina obtuvo una concentración ( $4.32 \times 10^7$  PVI/mL), la cual no representa una diferencia significativa con respecto al control. Mediante un rt-PCR se demostró la infección del vector y la producción de los transcritos para la codificación de la proteína recombinante interferón gamma. El Western Blot (WB) realizado demostró que efectivamente se llevó a cabo la producción de la proteína en los cultivos a 72 y 120 h.

Estos resultados plantean que el suplemento ExCyte es un adecuado adyuvante en el mantenimiento del cultivo de células HEK293 en medio DMEM-F12 a 5, 3 y 2% de SFB, aunque en cuanto al crecimiento celular, no demuestra un comportamiento equiparable a un cultivo con solo 10 % de SFB. Sin embargo, la producción de vectores adenovirales resultó muy similar por lo que, si bien, el crecimiento celular no se promueve, la cantidad de partículas virales se eficiente.

## 2 Marco teórico.

### 2.1 Cultivo de células animales.

El cultivo de células animales comprende a un conjunto de técnicas que en condiciones asépticas y bajo un ambiente controlado permite mantener en condiciones *in vitro* (fuera de su organismo) un tipo celular previamente aislado e identificado, manteniendo las propiedades fisiológicas, metabólicas y genéticas de la célula en óptimas condiciones (Freshney, 2010).

Los cultivos de células animales pueden derivarse de explantes primarios, o suspensiones de células dispersadas, obtenidas mediante tratamientos físicos y enzimáticos. La formación de una línea celular a partir de un cultivo primario implica un aumento en el número total de células a lo largo de varias generaciones (aumento de la población celular); como resultado se obtendrá un aislado de células de un sólo tipo, con todas sus funciones en óptimas condiciones. Cuando las células se seleccionan de un cultivo, por clonación o por algún otro método, la sublínea se conoce como línea celular. Las líneas celulares animales pueden propagarse en forma de monocapa adherente o en suspensión, esto dependiendo de las características del tipo celular aislado (Freshney, 2010).

Inicialmente el desarrollo del cultivo de células animales se debe principalmente a dos grandes disciplinas de la investigación médica cómo son la producción de vacunas antivirales y el entendimiento de las neoplasias (Freshney, 2010). Sin embargo, con el paso del tiempo las técnicas se reforzaron y, con la llegada de la ingeniería genética y el desarrollo de la tecnología de hibridomas se convirtió en la manera preferida para la producción de anticuerpos monoclonales y un significativo número de producción de glicoproteínas recombinantes complejas empleadas cómo biofármacos para uso en nuevas terapias (Palomares et al., 2011).

Para obtener un adecuado mantenimiento y una excelente función de un cultivo de células animales se requieren de condiciones apropiadas equivalentes a las

fisiológicas en un ambiente *ex vivo*, así, es necesario mantener las condiciones adecuadas, tales como la temperatura, pH, osmolaridad y el suministro de oxígeno; brindar un sustrato en el que se mantengan las células adheridas en el cultivo, es decir, la superficie que permite la unión y proliferación celular; y, agregar medio de cultivo, que le proporcione las moléculas necesarias como nutrientes, sales, hormonas, factores de crecimiento que son necesarias para crear un micro ambiente que mantenga al cultivo viable (Brunner et al., 2010) siendo este último, uno de los factores más importantes para el mantenimiento de un cultivo de células animales (Figura 1).

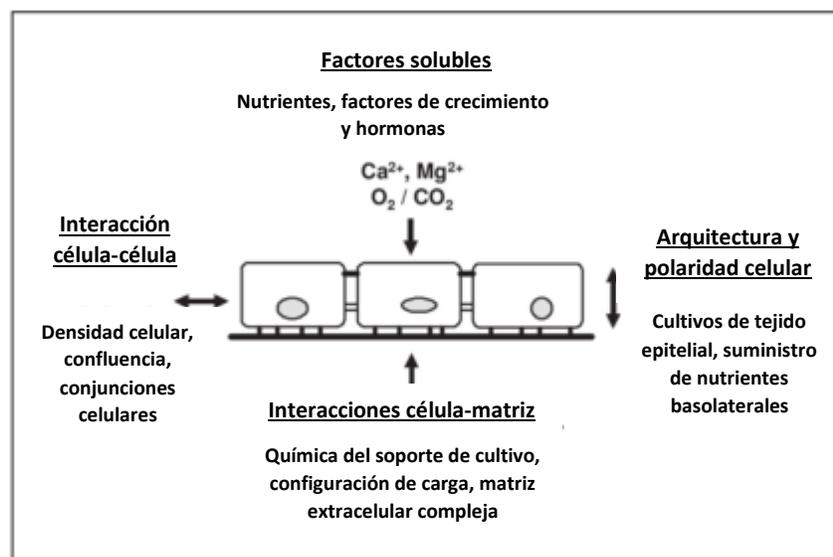


Figura 1 Representación de los factores necesarios para inducir la proliferación y el mantenimiento de un cultivo de células animales. Modificado de Brunner et al., 2010.

Durante la última década, el desarrollo tecnológico para el cultivo de células animales ha permitido su uso dentro de diversas áreas de la biotecnología, como la evaluación de la eficacia y la toxicidad en nuevos fármacos, y el desarrollo de vacunas y productos conocidos como biofármacos.

**Evaluación citotóxica.** Los modelos citotóxicos tienen grandes ventajas en el estudio de procesos celulares simples y moleculares, permitiendo medir los cambios asociados con los procesos fisiológicos en las células animales aunados por una

molécula puesta a prueba, para determinar la seguridad y los mecanismos de acción para el desarrollo de un fármaco. Para estos ensayos se utilizan cultivos celulares animales tratados con la molécula a prueba, un control definido expuesto a un tratamiento que causa un daño conocido y un control donde no ha sido expuesto a ningún tratamiento. Posteriormente son tratados con técnicas colorimétricas, fluorimétricas, bioluminiscencias o por medio de isótopos que permiten medir la inhibición del crecimiento y proliferación del 50% (IC<sub>50</sub>) del cultivo, permitiendo la evaluación no sólo de la molécula a prueba, sino además de evaluar la seguridad de los excipientes utilizados para el desarrollo del medicamento. De igual manera, los cultivos de células animales son especialmente usados para el estudio del efecto del estrés oxidativo, causado por la liberación de radicales libres que promueven la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares, resultando en la desorganización de la membrana celular y la formación de aldehídos reactivos como el 4-hidroxinonenal (4-HNE) (generado en grandes cantidades en el curso de afecciones inflamatorias). Tanto la formación de peróxido de hidrógeno como la de 4-HNE son considerados como agentes causales de enfermedades neurodegenerativas, aterogénesis, diabetes, diferentes tipos de cáncer, inflamación crónica y enfermedades cardiovasculares (Amelian et al., 2017; Pilon et al., 2012). Las células animales de origen cancerígeno son comúnmente empleadas en ensayos citotóxicos para el estudio del mecanismo y la acción de fármacos contra el cáncer, midiendo la quimiosensibilidad de las células, así como para determinar los fenómenos de resistencia presentados en tejidos primarios radiados (Amelian et al., 2017; Lieberman et al., 2001).

Estudios de permeabilidad e inflamación. Los cultivos de células epiteliales de intestino humano representan un óptimo ambiente fisiológico para el estudio de la absorción de un fármaco. La línea celular Caco-2 es considerada un equivalente a los enterocitos del intestino delgado. Debido a que las células Caco-2 producen proteínas de resistencia a la glucoproteína P y múltiples fármacos, que son esenciales para el transporte *in vitro* de un fármaco, por lo que son modelo estándar para la predicción de la viabilidad de un fármaco (Amelian et al., 2017). La evaluación de la habilidad de los medicamentos neurológicos para cruzar la barrera

hematoencefálica es de suma importancia debido a que permite elucidar el funcionamiento de ésta y valorar la toxicidad y permeabilidad de los fármacos. Para ello se ha utilizado modelos basados en líneas de células endoteliales de cerebro de origen porcino, bovino, rata o ratón, para simular la actividad protectora de esta barrera y proveer de información fisiológica o patológica sobre el medicamento en desarrollo (Amelian et al., 2017; Helms et al., 2016). El desarrollo de nuevos modelos para la evaluación de la respuesta inflamatoria de los productos farmacéuticos y cosméticos utilizando cultivos de células animales ha incrementado en los últimos años. El uso de animales para pruebas cosméticas y farmacéuticas es un punto de discusión para los derechos animales, distintos grupos científicos han conseguido disminuir el uso de animales optando por la búsqueda de nuevas alternativas en los que se obtengan los mismos resultados, sin perder la reproducibilidad y la fiabilidad de los resultados, sin embargo, a pesar de ser un área que aún sigue en desarrollo las expectativas son altas. Con el desarrollo de una tecnología de cultivo conocida como filtro de pozos, varios modelos de piel y córnea han aparecido. Por ejemplo, utilizando las propiedades que el cultivo por filtro de pozos permite, se ha cultivado en conjunto dos tipos de células animales en donde la interacción de un alérgeno o un irritante con un objetivo primario (por ejemplo la epidermis) inicia una respuesta paracrina (señalización celular que altera el comportamiento o diferenciación de células cercanas) que desencadena una liberación de citocinas a un segundo componente estromal (por ejemplo la dermis) haciendo posible la cuantificación de estas citocinas por medio de un ELISA y de esta manera monitorear el grado de respuesta presentado (Freshney, 2010).

Vacunas y biofármacos. La vacunación es una de las estrategias de prevención más efectivas en contra de agentes infecciosos, esta protección se lleva a cabo por medio de la exposición del sistema inmune a algún componente del patógeno o el patógeno entero atenuado o inactivado, permitiendo que el sistema inmune desarrolle una respuesta preventiva y de memoria inmunológica para combatir el agente infeccioso en caso de ser expuesto al patógeno real. La vacuna contra la polio fue la primera vacuna basada en la tecnología del cultivo de células animales para su producción empleando cultivos de células de riñón de mono. Hoy en día, la

producción de vacunas utiliza células de origen primario (como en huevos de gallina), líneas celulares continuas, diploides o recombinantes (líneas celulares de origen humano o insecto) y gracias a los avances en microbiología y biología molecular también son empleadas células bacterianas. En cuanto a los biofármacos (principalmente proteínas recombinantes), el uso de células animales en comparación de cualquier otro sistema productor (ver Figura 2), es debido a la capacidad de un correcto plegamiento y modificaciones postraduccionales durante la biosíntesis de estas macromoléculas (Wurm, 2004). Se le considera a un biofármaco a toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga actividad farmacológica, que se identifique por sus propiedades físicas, químicas y biológicas y que reúna la condiciones para ser empleada como principio activo de un medicamento biotecnológico (Reglamento de insumos para la salud, 2014), por lo que un biofármaco o medicamento biotecnológico podría estar constituido por: proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales, péptidos (constituidos por menos de cuarenta aminoácidos producidos por técnicas de biotecnología molecular), ácidos nucleicos o de plásmidos y los demás que, en su caso, determine mediante acuerdo la secretaría, conforme a los avances técnicos y científicos. Las células CHO son ampliamente usadas para la producción de biofármacos, siendo el sistema productor de cerca del 70 % de proteínas recombinantes (Jee Yon et al., 2012), debido a que ha sido una de las líneas mejor caracterizadas, presentando un buen desempeño productor en el sector farmacéutico biotecnológico, sin embargo, son incapaces de producir algunas glicosilaciones de tipo humano, y producir ciertos glicanos que no son propios del humano pudiendo despertar una respuesta inmune que pueda causar inmunogenicidad o neutralizar la proteína producida, incrementar la purificación y reducir la eficacia del biofármaco (Lalonde & Durocher, 2017); de igual manera tenemos a las células PER.C6 (derivadas de retina de embrión humano transformadas con una región E1 adenoviral) que han demostrado altas densidades celulares y un correcto perfil de glicosilación debido a que pertenecen a células de tipo humano; por último también se encuentran las células HEK293 las cuales han sido ampliamente usadas en la investigación para la producción de proteína

recombinante y empleadas principalmente como un sistema de expresión transitoria de proteínas recombinantes (Butler & Meneses-Acosta, 2016; Lalonde & Durocher, 2017).

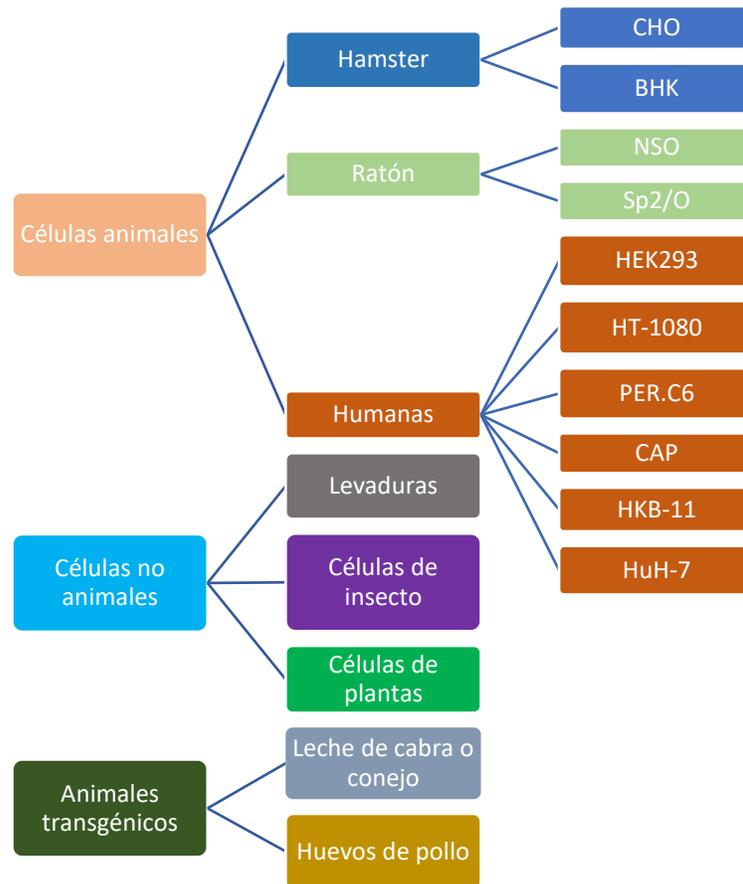


Figura 2 Sistemas de expresión usadas en la producción de glicoproteínas por la industria farmacéutica biotecnológica. Tomado de Lalonde & Durocher, 2017.

### **2.1.1 Medio de cultivo.**

Inicialmente, el cultivo de células animales se realizaba empleando medios naturales basados en extractos de los tejidos y fluidos corporales tales como fluidos de embriones de pollo, plasma, suero y linfa. Al extenderse la variedad de líneas celulares se incrementó la demanda de grandes cantidades de medio permitiendo de esta manera el mejorar la calidad, basándose en el análisis del crecimiento celular y sus necesidades bioquímicas (Freshney, 2010; Yao & Asayama, 2017).

El medio de cultivo es un elemento crucial en el cultivo de células animales, ya que éste le provee una serie de componentes generales y específicos en una concentración adecuada; así, el ambiente creado promueve el crecimiento celular y su adecuado funcionamiento. Entre los elementos básicos que se encuentran en un medio de cultivo para células animales son: sales inorgánicas, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, lípidos, ácidos orgánicos, proteínas, hormonas y micronutrientes (Masters, 2000).

La clasificación de un medio de cultivo se lleva a cabo de acuerdo con la formulación que presenta, brindando propiedades particulares que permiten el crecimiento de un tipo celular. Dentro de los grupos clasificados se encuentran: los medios suplementados, tal como aquellos que contienen suero, los cuales necesitan de una suplementación de suero bovino, de caballo o incluso humano; los medios libres de suero, los cuales contienen fracciones de proteínas crudas como albúmina de suero bovino; también están los medios libres de suplementación de origen animal, los cuales utilizan recursos humanos como albúmina humana; los medios libres de proteína, que usan como suplementación hidrolizados de proteínas; y por último, los medios químicamente definidos, los cuales no contienen proteínas, hidrolizados o algún otro desconocido, utilizando componentes altamente purificados como hormonas o factores de crecimiento obtenidos de animales, plantas o de manera recombinante. Sin importar el medio, la decisión de utilizar uno u otro es con base en el propósito de su uso (Yao & Asayama, 2017).

### 2.1.1.1 Bases de la formulación de un medio de cultivo.

El medio de cultivo provee de nutrimentos esenciales para el crecimiento y proliferación celular. Tales como precursores biosintéticos para el anabolismo de la célula, catabolismo de substratos para el metabolismo de energía, vitaminas y oligoelementos, cuyas funciones son tanto catalíticas como fisiológicas para mantener el pH y la osmolaridad del medio, dentro de los límites que permiten el mantenimiento celular (Brunner et al., 2010). Entre los constituyentes más frecuentes en un medio de cultivo se pueden presentar los siguientes (Freshney, 2010; Lodish et al., 2016; Yao & Asayama, 2017):

*Aminoácidos.* Son aminoácidos esenciales tales como la cisteína, arginina, glutamina y tirosina; algunos de éstos pueden variar dependiendo del tipo de línea celular. La concentración de aminoácidos usualmente limita la concentración celular máxima alcanzable y su balance puede influir en la sobrevivencia celular y la tasa de crecimiento.

*Vitaminas.* Ayudan al mantenimiento del crecimiento celular, algunas de éstas se incrementan en los medios libres de suero. La limitación de vitaminas reduce la sobrevivencia celular y la tasa de crecimiento.

*Sales.* Las sales principales son  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{3-}$  y  $\text{HCO}_3^-$ . Éstas le propician una adecuada osmolaridad al medio. Algunas células requieren del  $\text{Ca}^{2+}$  para la adhesión celular y por igual actúa como intermediario en la señal de transducción, además de influir en la proliferación o diferenciación celular.

*Glucosa.* Se incluye en la mayoría de los medios como una fuente de energía, siendo metabolizada principalmente por glicólisis.

*Suplementos orgánicos.* Varios componentes como proteínas, péptidos, nucleósidos, intermediarios del ciclo del ácido cítrico, piruvato y lípidos se encuentran en medios complejos, de igual manera son necesarios cuando la concentración de suero es reducida ayudando en el mantenimiento de ciertas células especializadas.

*Hormonas y factores de crecimiento.* Varían de acuerdo con el tipo de célula, entre las más utilizadas se encuentran: estradiol, tirosina, insulina, cortisol, dexametasona, progesterona, glucagón. Algunos factores de crecimiento para algunos tipos celulares son: EGF, bGF, FGF, IGF-I, NGF.

### **2.1.1.2 Suero Fetal Bovino (SFB).**

Hasta la fecha, el SFB es el aditivo sérico más comúnmente empleado para el crecimiento y mantenimiento de una variedad de tipos celulares (Hemeda et al., 2014). Es derivado de sangre entera coagulada o plasma de fetos bovinos y se usa ampliamente como un suplemento de medio para el cultivo de células *in vitro* animales o humanas (Mojica-Henshaw et al., 2013). Es esencial para el crecimiento celular y el metabolismo estimulando la proliferación del cultivo (efecto mitótico), siendo los más empleados los de origen bovino adultos, recién nacido o de origen fetal. El empleo del SFB es debido a que contiene una mezcla de factores necesarios para el crecimiento y proliferación celular y es utilizado en el cultivo de una gran cantidad de células humanas, de animales e insecto, sin embargo, el uso de éste presenta una serie de desventajas tales como (Gstraunthaler, 2003; Hemeda et al., 2014):

- Al ser una mezcla no definida de componentes séricos, la calidad entre los lotes es variada uno con otro, obteniendo un resultado no reproducible en el cultivo.
- El SFB puede contener moléculas y agentes que afecten la seguridad del producto como endotoxinas, micoplasma, contaminaciones virales o proteínas de priones.
- La calidad del producto depende al lote, debido a variaciones estacionales y continentales que afectan al animal de donde se obtienen.
- Debido a la gran cantidad de moléculas que lo conforma, el proceso de purificación es más complicado.

- La estandarización del protocolo experimental es complicada debido al lote de SFB, debido a que pueden surgir variaciones al cambiar de uno a otro.
- En ocasiones el SFB representa la mayor parte del costo de una preparación de medio de cultivo.
- Si bien, es utilizado por promover el crecimiento celular, también contiene componentes que pueden inhibir el crecimiento, por lo que se obtiene una mezcla impredecible de ambas, estimulantes e inhibitorias (la presencia de componentes estimulantes es predominante, sin embargo, esto puede variar del tipo celular).
- En términos relacionados con la protección y derechos animales, es un conflicto ético el proceso de obtención y recolección.

Teniendo en cuenta lo anterior, debido a la oferta y demanda del SFB se han empleado una serie de estrategias para reducir o sustituirlo en los medios de cultivo. Con el surgimiento en los avances de la biomedicina e ingeniería de cultivos, se ha creado una demanda en alternativas séricas que sean de origen humano para la proliferación celular y reimplante de células autólogas; ya que, en la producción de moléculas terapéuticas para uso humano, los componentes derivados de origen animal no pueden ser empleados en el proceso de obtención de estos biofármacos (Gstraunthaler, 2003; Price et al., 1982). En la Tabla 1 se presenta la composición molecular que contiene el SFB.

Tabla 1 Composición del Suero Fetal Bovino (SFB), extraído de Freshney 2010.

<b>Composición del SFB</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Rango de concentración</b>
<b>Proteínas y polipéptidos</b>	40-80 mg/mL
Albúmina	20-50 mg/mL
Fetuina	10-20 mg/mL
Fibronectina	1-10 µg/mL
Globulinas	1-15 mg/mL
Inhibidores de proteasas: α <sub>1</sub> -antitripsina, α <sub>2</sub> -macroglobulinas	0.5-2.5 mg/mL
Transferrina	2-4 mg/mL
<b>Factores de crecimiento</b>	
EGF, PDGF, IGF-I y II, FGF, IL-1, IL-6	1-100 ng/mL
<b>Aminoácidos</b>	0.01-1.0 µM
<b>Lípidos</b>	2-10 mg/mL
Colesterol	10 µM
Ácidos grasos	0.1-1.0 µM
Ácido linoleico	0.01-0.1 µM
Fosfolípidos	0.7-3.0 mg/mL
<b>Carbohidratos</b>	1.0-2.0 mg/mL
Glucosa	0.6-1.2 mg/mL
Hexosamina	0.6-1.2 mg/mL
Ácido láctico	0.5-2.0 mg/mL
Ácido pirúvico	2-10 µg/mL
<b>Poliaminas</b>	
Putrescina, espermidina	0.1-1.0 µM
<b>Urea</b>	170-300 µg/mL

*(Continuación)*

Tabla 1 (Continuación)

<b>Inorgánicos</b>	0.14-0.16 M
Calcio	4-7 mM
Cloruros	100 µM
Hierro	10-50 µM
Potasio	5-15 mM
Fosfato	2-5 mM
Selenio	0.01 µM
Sodio	135-155 mM
Zinc	0.1-1.0 µM
<b>Hormonas</b>	0.1-200 nM
Hidrocortisona	10-200 nM
Insulina	1-100 ng/mL
Triyodotironina	20 nM
Tiroxina	100 nM
<b>Vitaminas</b>	10 ng-10 µg/mL
Vitamina A	10-100 ng/mL
Folato	5-20 ng/mL

### 2.1.1.3 Optimización de la formulación de medios de cultivos.

Todo tipo celular tiene diferentes receptores que involucran el crecimiento, la diferenciación y la sobrevivencia, además de la capacidad de liberar diversos tipos de moléculas al medio (productos del metabolismo celular). Mejorar un medio de cultivo implica encontrar condiciones favorables que promuevan el crecimiento celular o la expresión de alguna molécula dentro el cultivo, por lo que se necesitan cambiar algunos componentes del medio para obtener una nueva formulación.

La concentración de nutrimentos y sales en el medio de cultivo permite el adecuado crecimiento, por lo que para el mantenimiento y proliferación del cultivo de células animales, los medios basales se suplementan con varios factores que puedan mejorar las condiciones (Valk et al., 2010) La mayoría de las células necesitan suplementos adicionales para sobrevivir, proliferar y/o diferenciarse, como factores de crecimiento, proteínas, vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos o lípidos entre otros, que mantengan la viabilidad celular, sin embargo, si la concentración es mayor a la recomendada, esto promueve que el excedente sea metabolizado y forme una acumulación de metabolitos tóxicos (Butler, 2015), por tal motivo, la optimización del cultivo células animales es dependiente de la línea celular. Algunas clonas derivadas presentan su propio fenotipo metabólico (J. Zhang, 2010), por esto, se identifican los requerimientos nutricionales de las células diseñando pequeños modelos experimentales en los cuales se prueban distintas combinaciones y concentraciones de diversos componentes que puedan ayudar al desarrollo del medio, empleando herramientas informáticas y diseños estadísticos para comparar los resultados obtenidos se aísla y selecciona la clona con mayores índices productores para el desarrollo de un cultivo de alto rendimiento, (Shirsat et al., 2015). Por medio de la investigación básica se han identificado ciertos genes característicos para diseñar células productoras más eficientes y en conjunto con el medio mejor evaluado, se obtiene una eficiencia en el metabolismo celular que minimiza la producción de metabolitos de desecho (lactato, amoníaco) que permite mantener un aumento en el periodo de vida y producción (Lim et al., 2010).

Las estrategias para la formulación y optimización de un medio de cultivo incluyen la investigación en la literatura para identificar los posibles requerimientos de crecimiento para en un linaje celular, intercambio y valoración de suplementos para mejorar el desempeño del cultivo, y combinaciones entre medios para seleccionar la mejor composición de una manera evolutiva (J. Zhang, 2010).

## 2.1.2 Crecimiento celular: cinética de crecimiento.

El cultivo de células animales a lo largo del tiempo se ha convertido en una herramienta fundamental en la investigación básica y aplicada, así como para el entendimiento de distintos procesos moleculares (metabolismo, envejecimiento celular), para medir los efectos de un compuesto químico o fármaco (efectos citotóxicos) en líneas celulares tumorales, cultivo de células para uso en la ingeniería de tejidos, y de igual manera, como desarrollo de un sistema a pequeña escala para la producción de compuestos de uso terapéutico, ya sea para pruebas en terapia o a escalamiento a nivel industrial. Por este motivo, la evaluación de los medios empleados para el mantenimiento celular determina si un componente del medio puede estimular o inhibir el crecimiento y la viabilidad del cultivo, parámetros que afectan el ensayo donde el cultivo pudiera ser empleado (Assanga & Luján, 2013).

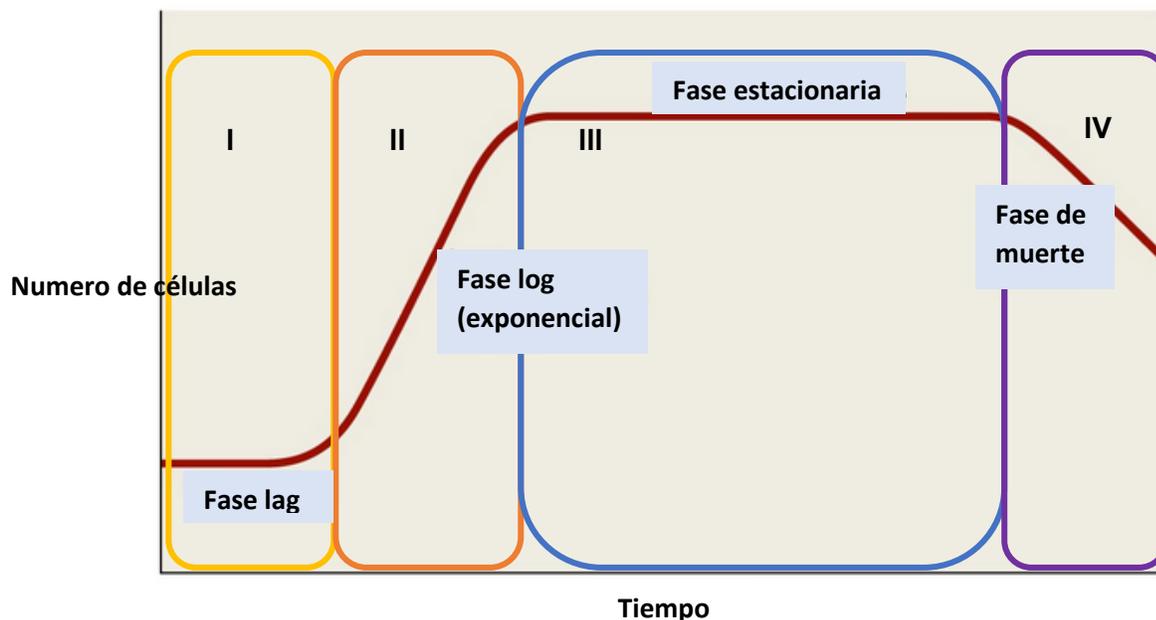


Figura 3 Fases de una cinética de crecimiento celular animal. I) Fase Lag o de adaptación, II) Fase Log o crecimiento exponencial, III) Fase estacionaria y IV) Fase de muerte. Modificado de Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings, 2006.

Los cultivos varían significativamente en muchas de sus propiedades entre la fase Lag (fase de latencia), la fase de crecimiento exponencial (fase Log) y su fase estacionaria. Por lo tanto, es importante conocer el comportamiento del crecimiento para deducir algún cambio por el cual el cultivo está siendo afectado y así determinar si está proliferando o no, además de poder calcular la duración del tiempo de duplicación ( $T_d$ ), la velocidad específica de crecimiento, el porcentaje de viabilidad celular y el consumo específico de nutrimentos (Lodish et al., 2016).

Por lo tanto, una cinética de crecimiento sirve como una herramienta de monitoreo en el comportamiento del cultivo, y también es empleada para el diseño o predicción de algún requerimiento del cultivo, un efecto positivo o negativo en él e inclusive para conocer el tiempo apropiado para llevar a cabo un subcultivo. La cinética de crecimiento se encuentra dividida por cuatro fases las cuales se presentan a continuación (Freshney, 2010; Masters, 2000; Oyeleye et al., 2016) y están esquematizadas en la Figura 3:

*Fase Lag:* Este es el periodo de adaptación después de un pase o un subcultivo, en el cuál, las células al pasar por un proceso de tripsinización (proceso por el cual se pierden las moléculas de adhesión celular o CAMs) vuelven a sintetizar los elementos de la superficie celular y matriz extracelular adhiriéndose nuevamente a la superficie del sustrato y comenzando a proliferar. En este punto, el crecimiento no es muy notorio, por lo cual se regulariza hasta que las células se encuentren en condiciones óptimas metabólicamente.

*Fase Log:* Esta fase se presenta al término del periodo de adaptación, en la cual el número de células aumenta de manera exponencial; su duración depende del número inicial de células y la tasa de crecimiento, siendo el punto en el que la población celular es más uniforme al igual que una alta viabilidad. Durante esta fase el consumo metabólico celular es mayor, debido a la naturaleza del crecimiento, por lo que la cantidad de energía empleada aumenta a comparación de las demás fases y el consumo de glucosa es mayor. Esta fase termina en cuanto se alcanza la densidad máxima.

*Fase estacionaria:* Esta fase se encuentra al terminar del crecimiento exponencial, en donde el cultivo llega a confluencia, es decir, cuando llega a una cantidad máxima de células a lo largo de toda la superficie, por lo que el crecimiento se reduce o en ocasiones es casi nulo, formando una especie de meseta en el registro del crecimiento que recae hasta llegar a la fase de muerte. En este punto, el consumo energético es menor por lo que el consumo de nutrimentos se mantiene y comienza la acumulación de metabolitos secundarios tóxicos como el lactato y amoniaco, provenientes del metabolismo de la glucosa y la glutamina suplementados en el cultivo y en algunos casos durante esta fase puede ocurrir una alta productividad de secreción de proteínas.

Fase de muerte: Por último, se tiene la parte de muerte celular, en donde al consumirse la mayoría de los nutrimentos que proporciona el cultivo y a la acumulación de metabolitos secundarios tóxicos la viabilidad celular recae llevando al fin del cultivo.

Dentro de los parámetros cinéticos que se pueden obtener de una cinética de crecimiento se encuentra la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ), el cual mide la tasa del aumento del número de células partiendo de una cierta concentración celular. También se calcula el tiempo de duplicación ( $T_d$ ), definido como el tiempo que tarda una población celular en duplicar su número. Ambos parámetros sirven para cuantificar la respuesta de las células en distintas condiciones de cultivo (efecto estimulantes o inhibitorios), así como la respuesta ante variaciones en la concentración o cambio de nutrimentos y/o suplementación adicional al medio, efectos hormonales o efectos inhibitorios causantes por pruebas por fármacos u otros compuestos químicos (Butler & Butler, 2004; Freshney, 2010; Masters, 2000).

### **2.1.3 Viabilidad celular.**

Al desarrollar un medio de cultivo (mantenimiento de células animales, estimular la proliferación o con la intención de optimizar la producción de un cultivo) el parámetro

más importante es la viabilidad celular. Una adecuada formulación con una suplementación con suero, reducción de suero o medio libre de suero debe de promover altos parámetros de viabilidad; por lo que, un deceso del porcentaje de viabilidad sugiere que alguno de los componentes empleados es deficiente o incompatible con el cultivo; de igual manera se le puede atribuir a una acumulación de productos metabólicos, una excesiva fuerza de corte (en cultivos en agitación) e incluso hipoxia.

Generalmente, la muerte celular dentro de un biorreactor es producida por apoptosis, una muerte celular programada resultante de un estímulo no letal que activa una cascada de señalizaciones intracelulares culminando en muerte. Morfológicamente se aprecia una contracción de la cromatina, seguida por la formación de burbujas en la membrana plasmática, encapsulando contenido citosólico y nuclear, finalmente, estos fragmentos se desprenden en forma de cuerpos apoptóticos. Sin embargo, puede ocurrir una muerte por necrosis cuando los estímulos son extremos y generan un daño físico a las células, éstas rompen la membrana liberando el contenido intracelular al medio (Arden & Betenbaugh, 2004; Butler, 2005).

La viabilidad celular representa la cantidad de células vivas funcionales en un cultivo, durante el cultivo o después de haber pasado por un estrés de diferente naturaleza. Los ensayos de viabilidad pueden basarse en el uso de colorantes, los cuales prueban la capacidad que tienen las células por absorber o rechazar ciertos tipos de tintes, las células muertas son permeables a estos debido a que la integridad de la membrana se encuentra comprometida; siendo la tinción por exclusión de azul de tripano una de las más empleadas (Freshney, 2010; Masters, 2000). También, los colorantes que dependen de la actividad metabólica han ganado popularidad debido a la versatilidad, el número de muestras que pueden ser procesadas, la capacidad de trabajar con células en adherencia (evitando así llevarlas en suspensión); el ensayo más conocido es con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol o MTT, basado en la conversión de tetrazolio soluble en cristales insolubles de azul de formazán, reducción que es llevada a cabo

en la mitocondria por células funcionales. (Stoddart, 2011). Asimismo, se encuentran los ensayos basados en la determinación de los niveles de ATP; el ensayo con sulforodamina B (colorante que en las condiciones adecuadas se une a proteínas de metabolismo celular); los ensayos de marcador de viabilidad de proteasa; los basados en la supervivencia clonogénica, basados en determinar la capacidad celular de proliferar conservando su capacidad reproductiva para formar una gran colonia; por cuantificación de los niveles y síntesis de ADN; y por espectroscopía RAMAN como método no invasivo para distinguir los estados del ciclo celular y células vivas de muertas (Adan et al., 2016). Debido a la amplia gama de ensayos para determinar la proliferación y viabilidad celular, siempre hay que verificar el propósito y la finalidad para determinar el ensayo que mejor se ajuste al experimento propuesto.

#### **2.1.4 Actividad metabólica en el medio de cultivo.**

El metabolismo de la mayoría de las células animales empleadas para la producción de proteínas terapéuticas se caracteriza por las altas tasas de absorción de glucosa y glutamina, presentando un incremento en la secreción de lactato y amonio, por lo que esta acumulación de subproductos puede detener el crecimiento y llevarlo a fase estacionaria provocando efectos nocivos sobre la viabilidad y la calidad de la molécula a producir (Quek et al., 2010).

Nutrientes como glucosa, glutamina y los ácidos grasos son moléculas que forman mayoritariamente parte de la producción de ATP y síntesis de metabolitos no esenciales en los cultivos celulares animales, sin embargo, las células carecen de la capacidad biosintética de producir los metabolitos necesarios para regular sus funciones de ahí la importancia de la obtención de estos por fuentes extracelulares.

Como se muestra en la Figura 4, las células son capaces de obtener diversos subproductos a través de las macromoléculas que obtienen del propio medio. Las células sintetizan intracelularmente ácidos nucleicos (ADN y ARN) a partir de la

glucosa y glutamina (también algunos aminoácidos no esenciales). Además de la glucosa, se obtienen algunos sacáridos y los grupos nitrogenados son donados por la glutamina. Para la síntesis de proteínas, los aminoácidos (a.a) se encuentran libremente o pueden obtenerse por medio del catabolismo de proteínas extracelulares. En cuanto a los lípidos extracelulares, estos son liberados por las lipoproteínas y las albúminas séricas; y aunque la mayoría no son esenciales, también pueden ser generados a partir de glucosa y glutamina (Palm & Thompson, 2017).

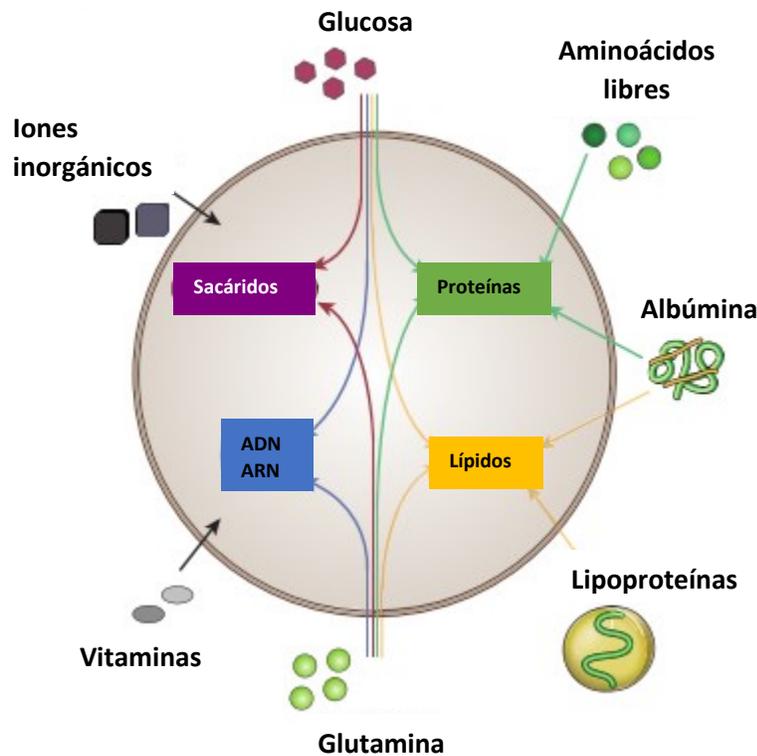


Figura 4 Nutrientes necesarios para el crecimiento de células animales. Modificado de Palm & Thompson, 2017.

La glutamina sirve como combustible respiratorio en aquellas células que se dividen rápidamente y que usan glucosa de manera ineficiente, sin embargo, su degradación y metabolismo genera la producción y acumulación de amoníaco el cual actúa como agente tóxico durante el cultivo de células animales (Lao & Toth, 1997; Valk et al., 2010). También proporciona una fuente importante de nitrógeno

para la síntesis de nucleótidos no esenciales, donando nitrógeno en forma de grupo amida para convertirse en ácido glutámico que proporciona la fuente principal de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos (Finley & Thompson, 2015).

La glucosa y los aminoácidos son nutrientes de bajo peso molecular y de naturaleza hidrofílica por lo que no pueden difundirse a través de la membrana plasmática y, por lo tanto, son transportados por medio de transportadores de nutrientes. Seis isoformas diferentes de transportadores de glucosa han sido aisladas en diferentes tejidos. El transportador de glucosa GLUT1 es el más abundante en el cuerpo y es expresado a cierto nivel en todos los tejidos, por lo que podría ser transportador responsable en el mayor de los casos de glucosa. Como ya se ha mencionado, la glutamina es el segundo mayor componente en el medio de cultivo, siendo identificados diferentes transportes implicados en su metabolismo, en general han sido clasificados dentro dos categorías principales: dependientes de  $\text{Na}^+$  e independientes de  $\text{Na}^+$ . La primera categoría emplea un gradiente químico de  $\text{Na}^+$ , mantenido por  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, para cotransportar glutamina y  $\text{Na}^+$  contra de su gradiente de concentración. La segunda categoría facilita el movimiento selectivo de aminoácidos a través de la membrana plasmática independientemente del gradiente de  $\text{Na}^+$  (Ozturk & Hu, 2006; Palm & Thompson, 2017).

## **2.2 Línea celular HEK293 como sistema productor en la industria biotecnológica farmacéutica.**

De acuerdo a lo presentado en los apartados anteriores, las células animales son el sistema preferido para la producción de proteínas recombinantes complejas, debido al correcto plegamiento de proteínas y un patrón de glicosilación semejante al humano, características a las que se atribuye la calidad y eficacia de una proteína (Hossler et al, 2009). Las células HEK293 (obtenidas por Graham en 1977, en las cuales se les incorporó la región E1 de adenovirus) funcionan como sistema productor para vectores adenovirales deficientes de replicación (Gálvez et al.,

2012), recientemente han sido relevantes como sistemas productores de adenovirus recombinantes para ser usados como vacunas y en terapia génica (Ertl, 2016; Henry et al., 2004). Así como modelos en la producción de inmunoglobulinas y de transfección transitoria para la expresión de proteínas (Baldi et al., 2007) o para la producción de partículas virales (Liste-Calleja et al, 2014; Ginn et al., 2013; Lasaro & Hildegund, 2009; Delenda et al., 2007; Nallet et al., 2012).

Este tipo celular ha presentado altas densidades celulares en cultivos a mayor escala, buena reproducibilidad en la producción de proteínas recombinantes y un metabolismo muy eficiente debido a su capacidad de consumir fuentes de carbono y sus derivados a la vez (Liste-Calleja, 2015).

Drotrecogin alfa (XIGRIS®) una proteína C activada recombinante para el tratamiento de pacientes con sepsis grave, fue la primer glicoproteína producida en HEK293 aprobada por la FDA y la EMA en el 2001 y 2002, se trató de producirla en células CHO pero las modificaciones post-traduccionales fueron inadecuadas, sin embargo, fue removido del mercado en 2011 por mostrar bajos efectos benéficos (Lalonde & Durocher, 2017). En la Tabla 2 se señalan los agentes terapéuticos que han sido aprobados y producidos en la línea celular HEK293.

*Tabla 2 Medicamentos biotecnológicos producidos en células HEK293 y su estatus aprobatorio ante la FDA y la EMA. Modificado de Dumont et al., 2016.*

<b>Medicamento</b>	<b>Indicación</b>	<b>Estatus</b>	
		<b>aprobatorio en FDA</b>	<b>aprobatorio en EMA</b>
Drotrecogin alfa (XIGRIS®)	Septicemia severa y choque séptico severo	Aprobado en 2001; retirado en 2011	Aprobado en 2002; retirado en 2011
rFVIII Fc (ALPROLIX®)	Hemofilia A	Aprobado en 2014	Presentado 2014

*(Continuación)*

Tabla 2 (Continuación)

rFIVFc (ELOCTATE®)	Hemofilia B	Aprobado en 2014	No aprobado
Dulaglutide (TRULICITY®)	Diabetes tipo 2	Aprobado en 2014	Presentado 2014
Human-cl rhFVIII (NUWIQ®)	Hemofilia A	Presentado a FDA	Aprobado en 2014

Debido al interés para la producción de macromoléculas con uso terapéutico, los avances tecnológicos para mejorar la eficiencia de producción y mantener la estabilidad de las proteínas desde su obtención hasta el producto final, para la industria farmacéutica el uso de líneas celulares de origen humano es cada vez más prometedor para ser una de las plataformas preferidas en la producción de proteínas terapéuticas o biofármacos (Dumont et al., 2016).

### 2.2.1 Células HEK293.

La línea celular HEK293 fue obtenida en 1973 a partir de células de riñón de un aborto de embrión humano donado cuyo origen familiar es desconocido al momento. Esta línea celular se transformó por la inserción de un fragmento de ADN de adenovirus tipo 5 (Ad5) de aproximadamente 4 KPb integrados dentro del cromosoma 19 de la línea celular, dicha región es conocida como E1 y consta de dos subunidades de transcripción que codifican a las proteínas E1A y E1B que están implicadas con las vías del ciclo celular y contrarrestan la apoptosis celular.

La identificación de las células HEK con el número 293 es debido al número de experimentos para poder llevar a cabo la transformación exitosa de las células. Durante el proceso de la transformación de la línea celular se emplearon células de rata y hámster sin ser eficientes, sin embargo, dentro de los experimentos realizados en HEK sólo dos platos de cultivo mostraron el cambio morfológico de una colonia

transformada después de la exposición al ADN del Ad5. Posteriormente, se dieron a la tarea de la obtención de las células transformadas sobre las células no transformadas por medio de una serie de pasos de aislamiento celular, cultivando sólo las colonias transformadas hasta obtener una densidad significativa con las características fenotípicas de las células (Graham et al, 1977).

Su empleo ha aumentado debido a la capacidad de la replicación de vectores virales recombinante carentes de la capacidad de replicación así como el estudio de la señal de transducción vírica sobre el empaquetamiento viral y de igual manera como una sistema productor a baja escala de proteína recombinante con potencial uso terapéutico (Louis et al., 1997; Lin et al., 2014).

## **2.3 Adenovirus.**

La importancia del tratado y estudio de los adenovirus se instaura en la eficiencia de estos para la transmisión de infecciones de distinta índole; es decir, los adenovirus actúan como vehículos de amplio espectro que afectan por ejemplo las vías respiratorias, el área ocular, el sistema gastrointestinal, e inclusive el sistema urinario. El antecedente que se tiene parte de la identificación del agente viral aislado en humanos, principalmente en las adenoides de los niños (Rowe et al., 1953), y hasta el momento se han identificado un total de 57 serotipos humanos (Legorreta-Herrera et al., 2012). Estos eran clasificados con base en las pruebas de hemaglutinación, y más tarde se categorizaron por análisis de restricción y secuenciación (Volpers & Kochanek, 2004).

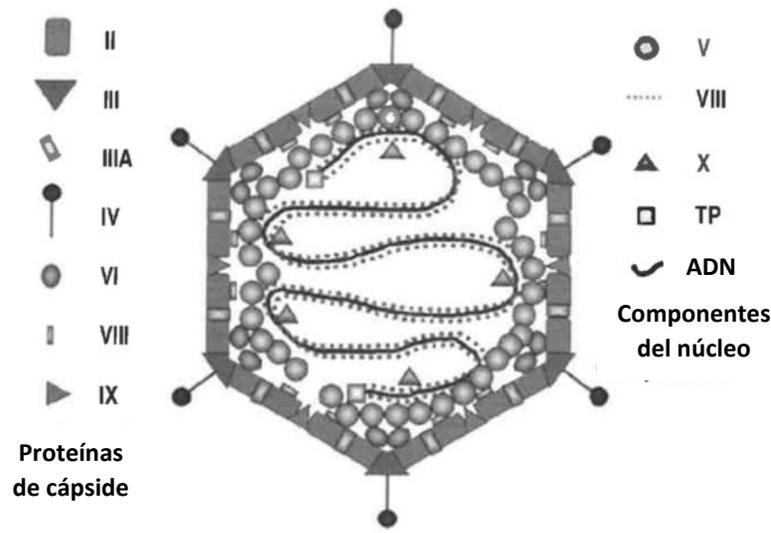


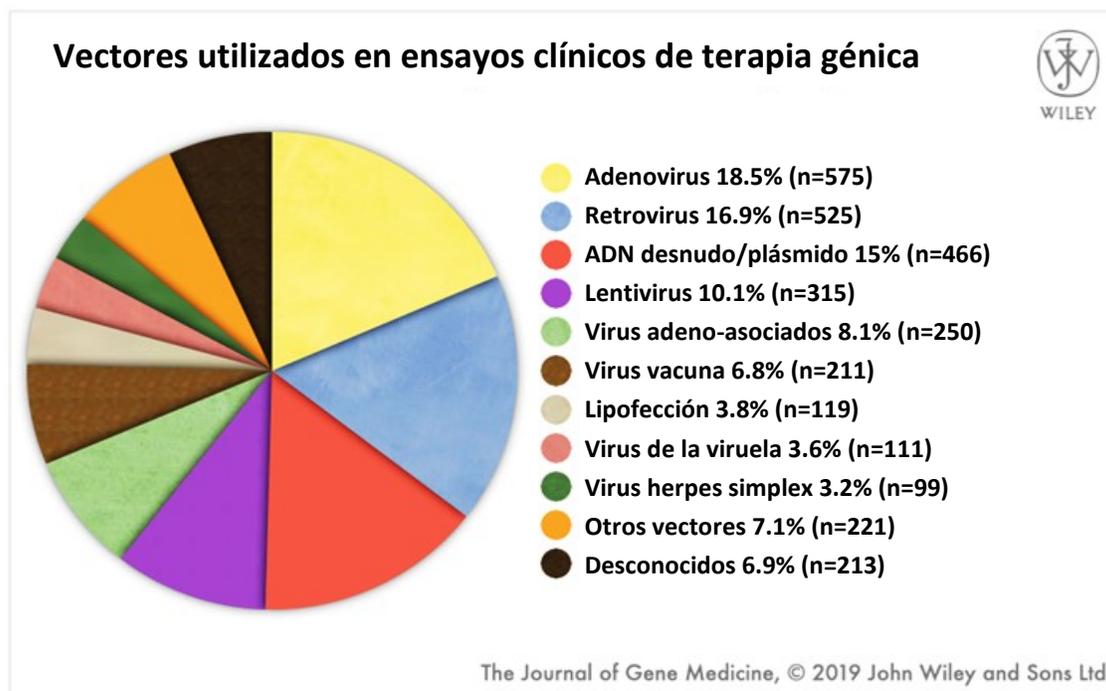
Figura 5 Estructura del Adenovirus. Se muestran los componentes del núcleo como el ADN y proteínas del núcleo identificadas en la imagen con los prefijos V, VII, X y proteínas terminales (TP). Las proteínas de cápside denominados hexones (II), bases de pentona (III), fibras (IV) y las proteínas asociadas al hexón (IIIa, VI, VIII y IX). Modificado de Delenda et al., 2007.

Cómo se representa en la Figura 5, los adenovirus son viriones sin envoltura con un diámetro de 60 a 90 nm y con genoma de ADN de doble cadena lineal de 30-40 kb; están compuestos por 240 capsómeros formando 20 caras triangulares las cuales estructuran la forma icosaédrica del virus, además de contar con 12 pentonas en la región de los capsómeros que sirven como base para las 12 fibras responsables a la unión primaria del receptor coxsackie adenoviral (CAR) en la superficie celular (Volpers & Kochanek, 2004)(Delenda et al., 2007).

### 2.3.1 Vectores adenovirales.

La introducción de material genético ajeno a células somáticas en el organismo tiene grandes promesas como una herramienta terapéutica (Zhang & Zhou, 2016; Gerard & Meidell, 1993). Los vectores adenovirales son de gran importancia por ser una herramienta para el estudio de la expresión génica en una amplia variedad de tejidos

(Suchanek & Salati, 2015), son un vehículo potencial para estrategias de inmunización, así como en terapia génica para la corrección de enfermedades genéticas y adquiridas comparados con otros vectores virales como lentivirus, retrovirus, adeno-asociados, etc ( Zhang & Zhou, 2016; Lukashev & Zamyatnin, 2016). Existe una gran variedad de vectores empleados en los ensayos clínicos de TG, siendo los vectores adenovirales con un 18.5 % los más empleados (ver Figura 6), debido a sus capacidades para una alta eficiencia de transducción, altos niveles de expresión génica (expresión transitoria) y la capacidad de transducir células quiascentes y en división (Ginn et al., 2018).



*Figura 6 Vectores empleados en ensayos clínicos en terapia génica en todo el mundo hasta diciembre 2019. Los adenovirus como principales vectores virales como énfasis en la búsqueda de un sistema eficiente para la producción del vector. Tomado y modificado de Wiley & Sons, 2019.*

Los adenovirus serotipo 2 y 5, han sido los más utilizados en ensayos clínicos de terapia génica (TG) y en vacunas (Liebert, 2004). Tienen una capacidad de transducir células en replicación como quiascentes, capaces de entregar transgenes hasta de 8 kpb; y como su ADN no se integra dentro del genoma y reside

de manera episomal en el núcleo, esto impide el riesgo de una mutagénesis insercional, sin integración directa en el genoma de la célula hospedadora, realizando una expresión transitoria y siendo vulnerable a mecanismos de silenciamiento celular. Como primer mecanismo de seguridad en la construcción de estos vectores se hizo la eliminación de genes esenciales en la replicación viral; así, a los vectores adenovirales de primera generación se les eliminó la región E1 (E1a y E1b), donde se codifican los primeros factores reguladores transcripcionales. La eliminación de esta región resultó en vectores deficientes de replicación. En los vectores de segunda generación, se eliminaron además de la región E1, los genes no estructurales E2, E3 y E4, demostrando un incremento en la capacidad de clonación y reducción de la citotoxicidad celular, sin embargo, aún desencadenaron respuestas inmunológicas. El desarrollo de vectores menos inmunogénicos y de mayor capacidad resultó en los vectores de tercera generación denominados como vectores adenovirales de alta capacidad (HC-AdVs) y también conocidos como AdVs dependientes-ayuda, los cuales sólo mantienen las repeticiones terminales invertidas (ITRs) 5' y 3' además de una señal de empaquetamiento, minimizando la citotoxicidad lo que permite la expresión prolongada de genes terapéuticos, lo que convierte al HC-AdVs en un vector prometedor para ser usado en terapia génica hasta la fecha (Lee et al., 2017).

## **2.4 Interferón- $\gamma$ .**

Se le atribuye a Isaacs y Linderman en 1957 el descubrimiento de los interferones (IFN); son miembros de la familia de las citocinas siendo glicoproteínas de bajo peso molecular, producidas por diferentes tipos celulares por medio de la regulación inmune en respuesta de infecciones virales y tumorales. Una de las funciones que se les atribuye es la supresión de la proliferación celular inhibiendo la replicación viral de células infectadas, y actividad inmunomoduladora mejorando la actividad fagocítica de macrófagos y aumento de la especificidad en el efecto citotóxico de linfocitos a células blanco. Anteriormente fueron clasificados por el tipo celular que

los secretaba sin embargo hoy en día se les clasifica por el tipo de receptor al cual se unen de manera específica, dividiéndose como IFN tipo I, II y III (Orion & Wolf, 1957; Schroder et al., 2004).

El IFN- $\gamma$  o interferón tipo II suele denominarse interferón inmune. Inicialmente se purificó de linfocitos de sangre periférica humana. Es producido predominantemente por linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, células T gamma/delta y de igual manera por células NK al presentarse un estímulo inmune o inflamatorio. La producción por estas células se reduce cuando entran en contacto con el antígeno presentado. Citocinas adicionales, incluyendo IL-2 y IL-12, también pueden inducir la producción de IFN- $\gamma$ . En el cuerpo, la producción de IFN- $\gamma$  es debido principalmente a la presencia de patógenos, el entrecruzamiento de algunas moléculas de superficie y antígenos específicos (Mata-Espinosa & Hernández-Pando, 2008). Existe un único gen IFN- $\gamma$  constituido por cuatro exones y tres intrones, siendo localizado en el cromosoma 12 en el humano. Este gen codifica a un polipéptido maduro que contiene 143 a.a con una masa molecular de 17 kDa, siendo una molécula glicosilada (Walsh, 2007).

El IFN- $\gamma$  es biológicamente activo en su forma de homodímero formado por una asociación de dos subunidades de polipéptidos maduros que están asociadas de una forma antiparalela estabilizada por fuerzas no covalentes, teniendo una masa aproximadamente de 40 a 70 KDa. Durante la biosíntesis los péptidos son N-glicosilados; mediante un análisis por SDS-PAGE se revelan tres bandas de un peso molecular de 16-17, 20 y 25 kDa que difieren debido al grado de glicosilación. La banda perteneciente a 20 kDa es por una glicosilación en la asparagina 97, la representación de 25 kDa presentan glicosilaciones presentes en asparagina 25 y 97, mientras que las pertenecientes a 16-17 kDa no presenta glicosilación alguna, debido a estos resultados se indica que las dos formas monoméricas son subespecies de origen natural, que fueron derivadas por alguna modificación postranscripcional o de un único producto génico (Chroboczek et al., 1984; Mata-Espinosa & Hernández-pando, 2008; Walsh, 2007).

### 2.4.1 Funciones biológicas del Interferón- $\gamma$ .

Al encargarse de estimular las células inmunes y ayudar en la activación de macrófagos que lisan o restringen el crecimiento de células infectadas, el IFN- $\gamma$  también se produce bajo ciertas circunstancias como: inflamación crónica, distintas infecciones virales, cáncer y problemas de autoinmunidad. Los mecanismos antivirales que induce el IFN- $\gamma$  son debido al estímulo de enzimas con actividades antivirales que tienen un impacto en la replicación de los virus. Los factores que median el crecimiento y la actividad proapoptótica limitan la proliferación celular, y por ende, regulan la replicación viral evitando la diseminación células circundantes (Mata-Espinosa & Hernández-pando, 2008; Schroder et al., 2004; Wu et al., 2009).

En comparación con los otros interferones, el IFN- $\gamma$  induce una distinta gama de actividades biológicas. A pesar de poseer una débil actividad antiviral, está involucrado en la regulación de aspectos inmunes y respuesta inflamatoria, ya que promueve la activación, crecimiento y diferenciación de diversos tipos celulares para efectuar una actividad protectora, presentados en la Tabla 3.

*Tabla 3 Tipos celulares implicados en el sistema inmune, inflamatorio u otras respuestas cuya activación, crecimiento y diferenciación son promovidas por el IFN- $\gamma$ . Modificado de Walsh, 2007 p. 219.*

#### ***Tipo celular***

---

*Macrófagos/monocitos*

*Neutrófilos polimorfonucleares*

*Linfocitos T*

*Linfocitos B*

*Células NK*

*Fibroblastos*

*Células endoteliales*

---

Como principal función se encuentra la activación de macrófagos influyendo principalmente en: destrucción de microorganismos invasores, destrucción de patógenos intracelulares, citotoxicidad de células tumorales y aumento en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) por lo que potencia la activación de los linfocitos mediante la presentación del antígeno promoviendo la fagocitosis de células dañadas (Walsh, 2007; Orion & Wolf, 1957) .

### 3 Antecedentes.

#### 3.1 Construcción de un vector adenoviral que expresa interferón gamma con uso potencial para la producción de proteína recombinante.

La eficiencia en la secreción y producción de proteínas recombinantes utilizando vectores de expresión transitorios, es regulada por varios factores genéticos, cómo el número de copias del transgén, la eficiencia transcripcional, la fuerza del promotor y los péptidos señal que regulan la secreción de proteínas (Román et al., 2016).

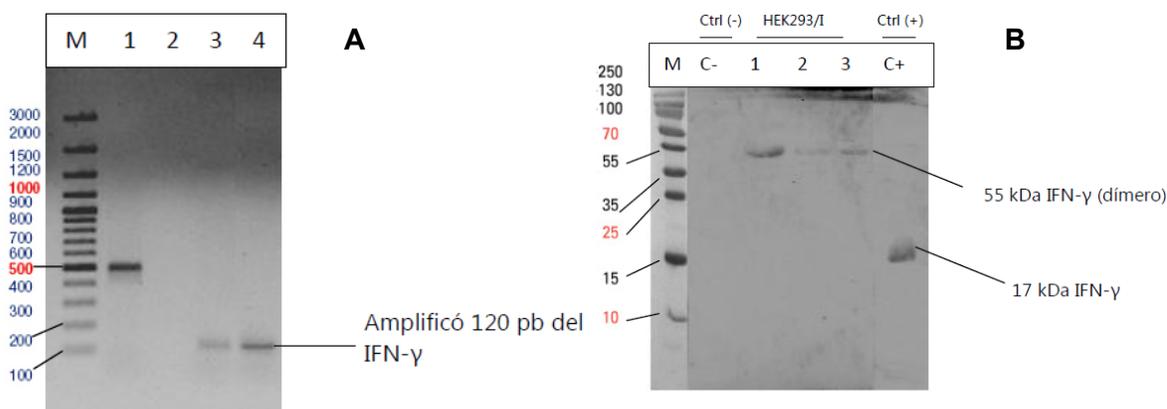


Figura 7 Resultados de la eficiencia en la transducción del vector Ad/IFN- $\gamma$  y producción de IFN- $\gamma$  por la Mtra. Romero-Martínez en 2014. Figura 7A) gel de ARN demuestra a 120 pb la transcripción de los mARN del IFN- $\gamma$  en células HEK293 infectadas; M) marcador de peso molecular Gene Ruler 100 pb plus ADN ladder, 1) control positivo plásmido pUC57IFN- $\gamma$ , 2) control negativo células HEK293 sin infectar, 3) mARN de HEK293 cuarta amplificación, 4) mARN HEK293 quinta amplificación. Figura 7B) Western Blot para la identificación de la producción del dímero de IFN- $\gamma$  en cultivos infectados, gel en condiciones nativas; M) marcador PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, C-) sobrenadante de células Hek293, 1) sobrenadante de células HEK293 infectadas tercera amplificación, 2) sobrenadante de células Hek293 infectadas cuarta amplificación, 3) sobrenadante de células HEK293 infectadas quinta amplificación, C+) IFN- $\gamma$  de referencia (Recombinant Human IFN- $\gamma$ ).

Debido al potencial uso de los vectores adenovirales cómo herramientas para la expresión de proteína recombinante y cómo principales vectores en la terapia

génica, el presente trabajo utilizó un vector adenoviral tipo 5 de primera generación que expresa como transgene la proteína interferón gamma como instrumento en la investigación básica, para mejorar su producción con fines de investigación. Este vector se construyó en el laboratorio de biotecnología farmacéutica de la Facultad de Farmacia (UAEM) por la M.F. Romero-Martínez en 2014.

La construcción se realizó utilizando el kit AdenoX expression system 1, mediante el plásmido pAdenoIFN- $\gamma$  con el inserto del interferón gamma linearizado. Se realizó un complejo con lipofectamina 2000/ pAdenoIFN- $\gamma$  y se transfectaron placas de 6 pozos con células HEK293. Una vez observado el efecto citopático se cosecharon los cultivos y se procesaron las muestras para la obtención de los vectores adenovirales construidos. Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación de dichos vectores en frascos T 75 cm<sup>2</sup> con HEK293 sucesivamente hasta una quinta amplificación de los vectores. El título viral se calculó mediante la técnica de End-Poin dilution con la cosecha proveniente de la quinta amplificación, el cual fue de  $1.57 \times 10^6$  PVI/mL. La evaluación de la construcción del vector se realizó mediante un PCR para el gen de IFN- $\gamma$  garantizando que efectivamente el vector contenía el gen. Por último, para analizar la expresión de la proteína, por medio de RT-PCR se identificó que en efecto los transcritos a IFN- $\gamma$  se estuvieran expresando y por WesternBlot en condiciones nativas se detectó la producción de la proteína secretada al medio (Figura 7).

### **3.2 Estrategias para mejorar el cultivo y la productividad en células HEK293.**

Dentro de la industria, uno de los objetivos para la producción y comercialización de biomoléculas con actividad terapéuticas es encontrar una alta productividad volumétrica y/o alta titulación de la molécula, manteniendo un margen estándar rentable con base al proceso. Debido a esto se han manipulado y combinado diversas estrategias novedosas e innovadoras para optimizar el proceso de cultivo de células animales, ya que de esta manera se elevan los beneficios económicos

que conllevan la producción de biofármacos manteniendo un impacto positivo económicamente (Jesus & Wurm, 2011).

Algunas de estas mejoras son el aumento del tiempo de la concentración celular viable o aumentar la productividad específica: a mayor tiempo en que la célula se encuentre viable proveerá de un mayor tiempo para que produzca más; por lo que parte de la investigación para mejorar la viabilidad se ha enfocado en los mecanismos intracelulares como la muerte celular, el metabolismo y el ciclo celular, con el objetivo de desarrollar un mejor ambiente al cultivo que le brinde las cualidades deseadas (Baek et al, 2015).

Al diseñar un modelo que mejora la productividad en el cultivo, a veces, el proceso desarrollado dentro del laboratorio al llegar a escala nivel industrial raramente llega a ser transferible, inclusive si pudiera ser muy productivo, por lo que las características deseadas tanto de medio empleado, línea celular y el proceso deberán de cumplir con cierta investigación adicional para ser implementados (Kretzmer, 2002). Este trabajo se basa en la investigación de las células HEK293 utilizando una multiplicidad de infección y un suplemento para el cultivo de células animales (ExCyte®) en la búsqueda de poder mejorar la producción por medio del sistema Ad5/IFN- $\gamma$  para la producción de la proteína IFN- $\gamma$  recombinante y vectores adenovirales.

### **3.2.1 Multiplicidad de infección y densidad celular para mejorar la producción de vectores adenovirales.**

Los vectores adenovirales han ganado interés durante la última década, los cuales son empleados especialmente en ensayos TG suicida (también conocida como terapia profármaco), estrategias de reemplazo genético utilizando vectores recombinantes para transferir genes dentro del humano, en nuevas estrategias que combinan la TG con agentes quimioterapéuticos y como herramientas en la inmunoterapia. Por lo que se ha incrementado el interés en el desarrollo de nuevos

procesos, análisis y métodos de obtención (Altaras et al., 2005; Blanche et al., 2000; Viswanathan et al., 2015).

Los parámetros para una adecuada productividad vírica dependen de: el diseño general del vector adenoviral, la línea celular para propagar el virus, la formulación del medio, la escala y una efectiva multiplicidad de infección (MOI). De este modo el ciclo de replicación de virus es exitoso obteniendo grandes cantidades de él, permitiendo una reproducibilidad lote a lote y además se optimiza una MOI que garantice una adecuada producción sin utilizar grandes cantidades del virus en stock (Altaras et al., 2005).

En el trabajo realizado por la M.F. Sosa-García (2018), mediante el diseño de una matriz experimental se evaluaron cultivos celulares de células HEK293 a densidades celulares de  $0.6 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^6$  y  $1.5 \times 10^6$  CV/mL infectados con el vector adenoviral Ad5/IFN- $\gamma$  a diferentes MOI (0.1, 1 y 5), midiendo el crecimiento celular post infección, el título viral y la producción de IFN- $\gamma$  como proteína recombinante. De acuerdo con los resultados obtenidos, la densidad celular de  $0.6 \times 10^6$  CV/mL a una MOI 5 produjo un mayor título viral e identificó que en esta misma condición la producción de proteína IFN- $\gamma$  recombinante fue mayor de entre los cultivos evaluados. Por lo que se determinó que a una densidad de  $0.6 \times 10^6$  CV/mL a una MOI 5 hay una mayor producción de vectores virales y de proteína recombinante.

### **3.2.2 Suplemento a base de lipoproteínas Ex-Cyte.**

El suplemento empleado para los fines de este proyecto ExCyte es producido por Merck Millipore, su función principal es para el cultivo de células animales que se encuentran en bajas concentraciones de suero o en cultivos libres de suero para mejorar el crecimiento y la producción de proteínas recombinantes.

Es una microemulsión color ámbar claro de lipoproteínas bovinas y colesterol en un concentrado líquido. Se fabrica empleando suero bovino, utilizando una técnica patentada de origen estadounidense, teniendo una variante llamada Ex -Cyte NZ en

donde el único cambio en el proceso de su obtención es la utilización de suero bovino exclusivo de Nueva Zelanda (Millipore, 2015). Su utilidad está relacionada al hecho de que el empleo de un suplemento pueda reducir la concentración de SFB teniendo impacto directo en el cultivo, debido a la reducción de costos que conlleva, el mantenimiento de la calidad en el cultivo y un mejor control en la purificación de producción de proteína.

En la Tabla 4 se presenta una recopilación de las publicaciones en los cuales se ha empleado el mismo principio que ExCyte como suplemento en el cultivo de distintas líneas celulares.

*Tabla 4 Recopilación literaria del empleo de ExCyte. Suplemento en el cultivo en distintos tipos celulares animales.*

<b>Tipo celular</b>	<b>Efecto sobre el cultivo de células animales</b>	<b>Referencia</b>
CHO 320	Empleo del suplemento ExCyte en medio libre de suero para mejorar la producción y glicosilación de interferón gamma a partir de células CHO 320; se minimizó el efecto del deterioro en la glicosilación durante el proceso y mejorándola en contraste a otro suplemento comercial.	(Jenkins et al., 1994)
CHO	Reporte técnico IV de pare de CELLline. Uso del ExCyte como suplemento de medio de cultivo para la adaptación de células CHO a suspensión, para optimizar la producción de proteína recombinante empleando una alta densidad celular.	(Wolf, 2003)
Tejidos tumorales y no tumorales de endometrio	Suplemento de medio DMEM-F12 para el cultivo de explantes de tejido endometrial normal y maligno.	(Parekh et al., 2002)
Tejidos tumorales y no tumorales de endometrio	Suplemento en medio libre de suero DEM-F12 para el mantenimiento y cultivo de tejido tumoral y normal de endometrio.	(Bruner-tran et al., 2002)
Epitelio bronquial	Empleado como suplemento de medio para el crecimiento de tejido primario de epitelio de bronqueo.	(Kafoury et al., 1999)

*(Continuación)*

Tabla 4 (Continuación)

Células estromales de endometrio	Como suplemento de medio DMEM-Ham's F-12 para el cultivo de células aisladas de endometrio murino.	(Zheng et al., 2000)
SF-9	Auxiliar en el cultivo de células de insecto SF-9 para producción de proteína recombinante obteniendo un incremento en la densidad y la viabilidad en los medios de cultivo en los cuales ExCyte fue empleado, a comparación de los medios de cultivos suplementados con SFB y aquellos medios libres de suero.	(Hink, 1991)
Especies de <i>Mollicutes</i>	Cómo auxiliar en el cultivo de especies de Mollicutes, obteniendo un crecimiento considerable a comparación de los suplementados con SFB, por ende, se obtuvo una reducción en el costo del cultivo y control en la eficiencia del crecimiento.	(Mycoplasmas, 1993)
Pre-adipositos	Auxiliar en medio de cultivo para la diferenciación de preadipositos de oveja, obteniendo una mejora en la diferenciación celular.	(Soret et al., 1999)
A49 y B9	Suplemento en medio de cultivo en dos líneas celulares de hibridomas. Se reporta un incremento en la densidad y viabilidad de A49 a comparación de las B9, sin embargo, se presentó un aumento en la productividad en la línea celular B9 en contraste de la A49 por lo que concluye que el efecto del suplemento ExCyte puede variar dependiendo a la línea celular.	(Zeghari et al., 1996)

## 4 Justificación.

Actualmente, el cultivo de células animales es ampliamente utilizado en biotecnología farmacéutica con diferentes fines. Su uso puede estar considerado desde el establecimiento de metodologías de análisis relacionadas con pruebas preclínicas *in vivo* hasta ser el hospedero en la producción de biofármacos y biológicos, por lo que es indispensable que se desarrolle bajo óptimas condiciones. Por ello, siempre se ha buscado mantener a las células en ambientes adecuados que satisfagan todos sus requerimientos nutricionales con la finalidad de no tener limitantes en su desarrollo y producción, siendo el desarrollo de medios de cultivo un área de gran interés en biotecnología. Así, el suplemento ExCyte es una propuesta para el mantenimiento celular, que pretende mejorar el crecimiento celular y la producción de proteína recombinante, además, de la capacidad de disminuir la suplementación con SFB ya que este último presenta una calidad variable dependiente del lote y una gran cantidad de biomoléculas innecesarias que interfieren en el proceso de purificación.

Bajo este criterio, en este trabajo se plantea estudiar la respuesta del suplemento del medio de cultivo ExCyte para el mantenimiento del cultivo de células HEK293 el cual puede ser considerado como un potencial sistema productor de proteínas recombinantes y/o de vectores virales con la finalidad de mejorar o presentar nuevas condiciones de cultivo que apoyen en el desarrollo de la investigación de nuevas moléculas que puedan servir en un futuro como terapia farmacológica.

## **5 Hipótesis.**

La suplementación de ExCyte en el medio DMEM-F12 ayuda al mantenimiento y crecimiento de cultivos celulares de HEK293 ante la disminución de 2, 3 y 5% de SFB, y permite la producción de vectores adenovirales y proteína recombinante.

## **6 Objetivo general.**

Analizar el efecto del suplemento ExCyte a diferentes concentraciones de SFB sobre el mantenimiento celular, producción de vectores adenovirales y proteína recombinante en cultivos de células HEK293.

### **6.1 Objetivos particulares.**

- Adaptar las células HEK293 con el suplemento ExCyte a concentraciones del 2, 3 y 5 % de SFB para poder evaluar.
- Los parámetros cinéticos, el porcentaje de viabilidad y analizar el comportamiento metabólico de células HEK293 en medio suplementado con ExCyte a diferentes concentraciones de SFB.
- Evaluar el efecto del suplemento ExCyte, en cultivos de células HEK293 infectados con el vector Ad5/IFN- $\gamma$  a MOI 5 en cultivos a 10 % SFB y 2 de SFB + ExCyte sobre la producción del vector adenoviral y de IFN- $\gamma$  para determinar su efecto en la producción de estos.

## 7 Estrategia experimental.

### 7.1 Primera fase de proyecto: efecto sobre crecimiento celular.

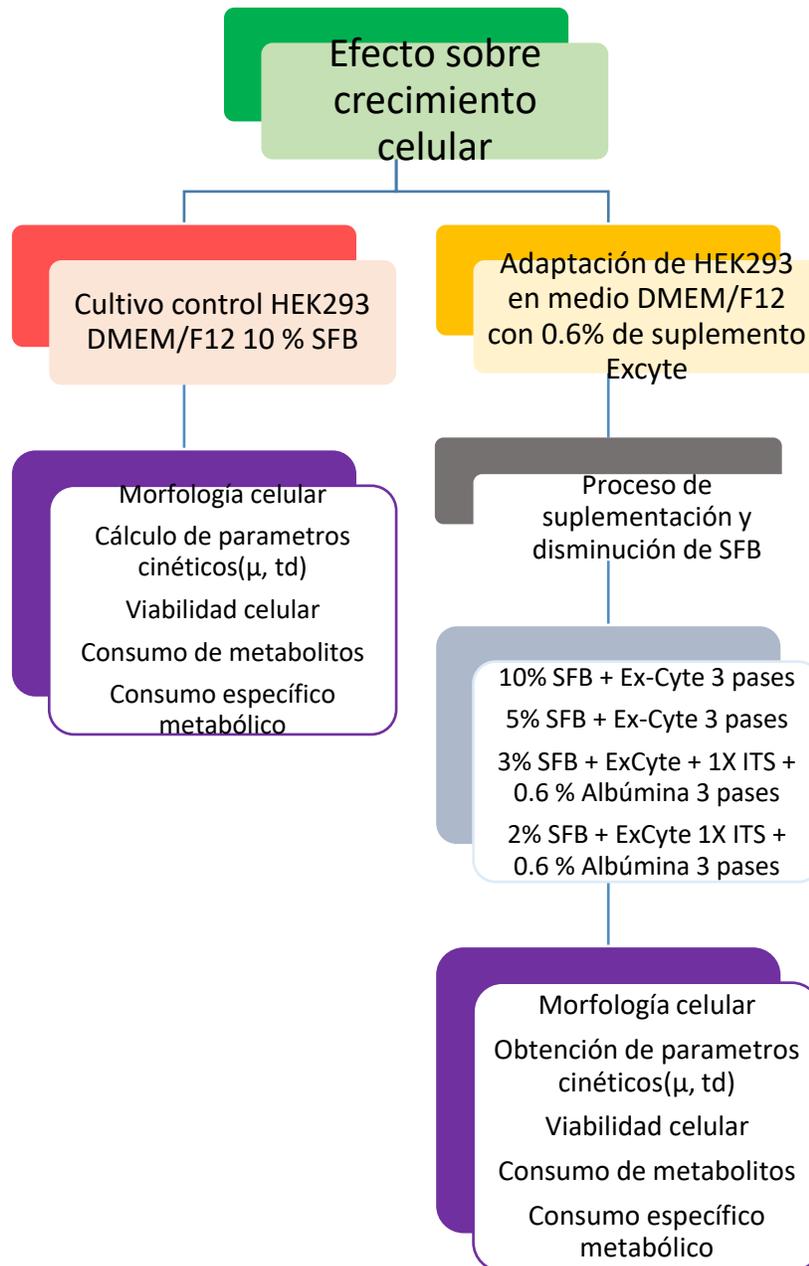


Figura 8 Estrategia experimental en la primera fase del proyecto, efecto del suplemento ExCyte en cultivos de células HEK293 en todas las etapas de disminución de SFB.

## 7.2 Segunda fase del proyecto: efecto sobre la producción de vectores adenovirales y proteína recombinante.

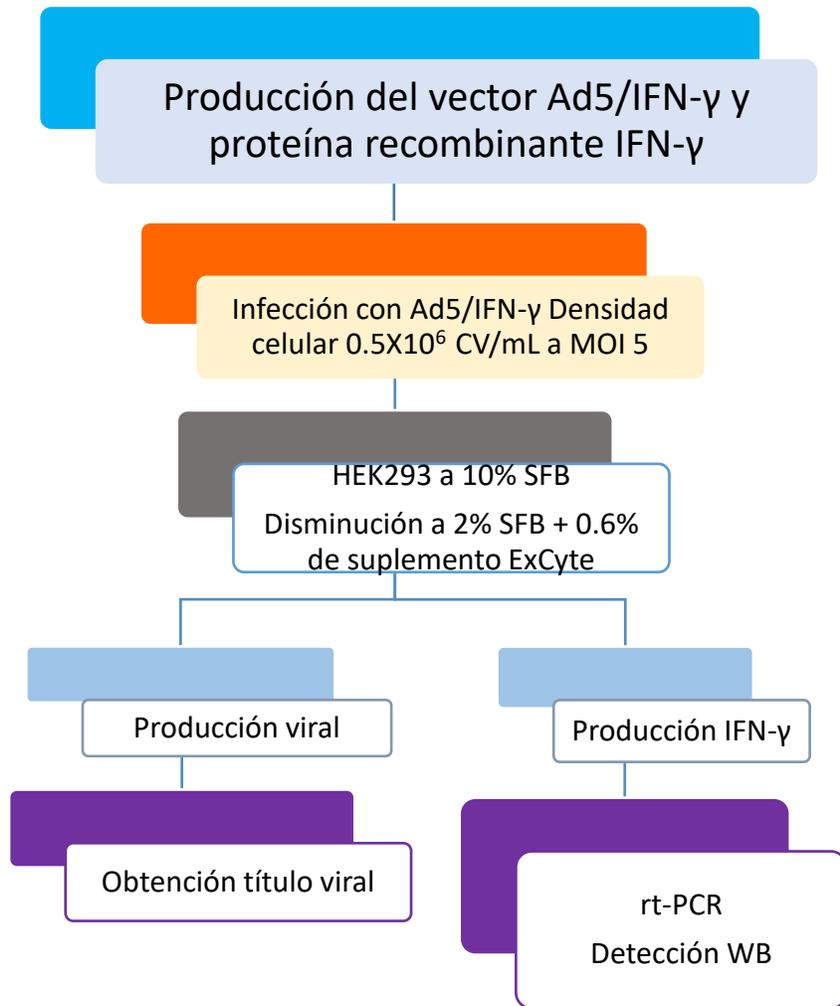


Figura 9 Estrategia experimental en la segunda fase del proyecto, efecto del suplemento ExCyte para la producción de Adenovirus recombinante tipo 5 de interferón gamma en cultivo control de HEK293 y en condición crítica de disminución de SFB.

## **8 Materiales y métodos.**

### **8.1 Línea celular.**

La línea celular empleada en este proyecto fue HEK293 (ATCC, No. Cat CRL-1573 (Human embrionic kidney), proveniente de la descongelación de un criovial previamente realizado de un banco de trabajo pase 17.

### **8.2 Medios de cultivo.**

#### **8.2.1 Medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con SFB.**

Durante el desarrollo de este proyecto se empleó el medio de cultivo DMEM-F12 (BioWest® No de Cat. P0095-N1L), el cual fue suplementado con 10% de SFB estéril e inactivado a 56°C por 50 min (el SFB fue alicuotado en tubos de centrifuga de 50 mL y se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su uso). Este medio sirvió para el mantenimiento de las células HEK293 que fungieron como controles de un cultivo de células animales en condiciones estandarizadas.

La preparación del medio de cultivo se llevó a cabo mediante el siguiente protocolo:

1. Agregar el contenido de un sobre de DMEM-F12 a un vaso de precipitados con capacidad de 1 L.
2. Verter 500 mL de agua tipo 1 estéril hasta homogenizar.
3. Incorporar 1.2 g de NaHCO<sub>3</sub> al medio.
4. Incorporar los 400 mL restantes para llevar a un volumen final de 900 mL.
5. Ajustar el pH con un potenciómetro calibrado hasta un pH de 7.4.
6. Esterilizar el medio dentro de una campana de flujo laminar en una unidad de filtración estéril con membrana de tamaño de poro de 0.2 µm.

7. Alicuotar el medio en frasco de vidrio estéril y para comprobar la esterilidad tomar 2 mL de medio y poner a incubar a 37°C por 72 h.
8. Rotular cada frasco correctamente y mantener a refrigeración a 4°C hasta su uso posterior.

El medio de cultivo DMEM-F12 se alicuotó en tubos estériles de centrifuga de 50 mL y posteriormente se agregó el 10 % de SFB. Los medios se etiquetaron y se refrigeraron a 4°C.

### **8.3 Suplemento ExCyte®.**

Se utilizó ExCyte® (Merck Millipore), como suplemento de medio de cultivo, el cual es un concentrado de colesterol, lipoproteínas y ácidos grasos que promueven el crecimiento celular y la producción de proteína en una variedad de células animales, entre las reportadas se incluyen hibridomas, mielomas, CHO y HEK293 (Millipore, 2015).

El objetivo de este suplemento es disminuir la inconsistencia del cultivo de células animales proporcionada por la inestabilidad de la calidad del SFB y abaratar costos. De acuerdo con las especificaciones (Millipore, 2015), mejora la densidad celular, la producción y además confiere la capacidad de reducir las concentraciones de SFB con una probabilidad de eliminarla casi completamente cambiando el medio a uno libre de SFB.

### **8.4 Medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con ExCyte® y en condiciones de disminución de SFB.**

Medio DMEM-F12 suplementado con ExCyte® con 5 % y 10 % de SFB

Se alicuotó medio DMEM-F12 estéril en tubos de centrifuga de 50 mL estériles y se realizaron los cálculos para determinar el volumen necesario correspondiente a 5 % y 10 % de SFB. Posteriormente, se añadió el volumen equivalente al 0.6 % de suplemento ExCyte® del total de medio a preparar y se homogenizó el medio con la pipeta.

#### Medio DMEM-F12 suplementado con ExCyte® con 2% y 3% de SFB

Se alicuotó medio DMEM-F12 estéril en tubos de centrifuga de 50 mL estériles, se realizaron los cálculos necesarios para añadir 3% de SFB, el volumen equivalente a 0.6 % de suplemento ExCyte® y tal cual lo señala la información técnica del suplemento en condiciones  $\leq 5$  % de SFB se debe añadir al medio a preparar el volumen equivalente a 1X de ITS (insulin, transferin and sodium selenite) y la cantidad correspondiente al 0.6 % de albúmina. Una vez incorporados todos los elementos se homogenizó con cuidado y se filtró por un poro de tamaño de 0.2  $\mu\text{m}$  colocándose en tubos de centrifuga de 50 mL estériles, posteriormente se identificaron adecuadamente y almacenaron a 4 °C.

### **8.5 Descongelamiento celular.**

Se inició el cultivo de células HEK293 descongelando un criovial mantenido a -196 °C en nitrógeno líquido. Se prepararon 7 mL de medio DMEM-F12 suplementado con 20%, posteriormente se realizó la siguiente metodología:

1. Mantener el criovial en hielo y cuidadosamente descongelar con el calor de las yemas de los dedos.
2. Pasar el contenido del criovial cuidadosamente a un tubo de centrifuga con 5 mL de medio frio libre de SFB.
3. Centrifugar por 5 min a 900 rpm y con una pipeta retirar el sobrenadante cuidando de no llevarse el pellet formado.
4. Resuspender el pellet con medio suplementado al 20% de SFB y colocarlo en una caja de cultivo T25

5. Incubar a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y observar durante las primeras 48 h.
6. Una vez observado que las células se encuentran adheridas, sustituir el medio de cultivo por medio nuevo suplementado a 10 % de SFB.

## **8.6 Subcultivo de células HEK293.**

Cuando la confluencia de las células en los frascos T de cultivo alcanzaban del 80 % al 90 % éstas debían ser subcultivadas ya sea para el mantenimiento de la caja o para montar algún otro experimento.

El protocolo empleado para subcultivar las células HEK293 en todas las condiciones descritas en este proyecto fue a partir de una confluencia cerca del 80 %, para garantizar que el frasco no estuviera lleno y pudiera tripsinizarse adecuadamente. Así, se realizó el siguiente protocolo:

1. Dentro de la campana de flujo laminar extraer el medio de cultivo y desechar en un frasco.
2. Lavar las células con 2 mL de PBS 1X estéril (este volumen es para frascos T25, para T75 se emplean 3.5 mL) para quitar los restos de medio que puedan estar presentes y se desecha nuevamente.
3. Una vez lavadas agregar 1.5 mL de tripsina/EDTA (este volumen es para frascos T25, para T75 se emplean 2.5 mL) para desprender la monocapa celular incubando a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> a una atmósfera húmeda, durante 5 min, no se debe exceder este tiempo debido al daño que puedan recibir las células por la presencia de la proteasa.
4. Una vez transcurrido el tiempo el frasco se examina observando el desprendimiento de la monocapa, si persiste la adherencia se puede dar un ligero golpe al frasco para desprender la capa celular, para inactivar la tripsina se emplea medio suplementado con SFB para inactivar la proteasa.

5. Con cuidado recolectar la suspensión del frasco y traspasarla a un tubo estéril de centrifuga de 15 mL, centrifugar a 1100 rpm durante 5 minutos y con una pipeta estéril extraer el sobrenadante.
6. Resuspender el pellet celular con 3 mL de medio, tomar una alícuota de 1 mL para realizar conteo y ajustar el pase a una densidad celular de  $0.6 \times 10^6$  en frascos T25 con un volumen final de 5 mL de medio.
7. Marcar en el frasco el pase de las células e incubar a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  en una atmósfera húmeda.

## 8.7 Conteo y viabilidad celular.

Para conocer la concentración celular y la viabilidad obtenida en el cultivo se llevó a cabo el conteo por exclusión de azul de tripano. Las células viables tienen su membrana plasmática intacta por lo que el colorante no penetra dentro de la célula, sin embargo, las células con la membrana dañada permiten el paso del colorante, tiñendo las células de un ligero tono azul y sin brillo. El conteo se lleva a cabo en una cámara de Neubauer y de esta manera se discrimina entre las células viables de las no viables.

El conteo se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Preparar una solución de azul de tripano al 10% con PBS 1X en tubos de centrifuga de 15 mL.
2. Tomar 50  $\mu\text{L}$  de la solución de azul de tripano en un tubo eppendorf de 1.5 mL, posteriormente agregar 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de células y con cuidado homogenizar con la micropipeta.
3. Preparar la cámara de Neubauer y cargar con 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión en la cámara. Si el número de células contadas es mayor a 200 se recomienda hacer una dilución más grande.
4. Se cuentan las células no coloreadas y brillantes (células viables), y las coloreadas y opacas (células muertas).

La concentración celular se determinó con la siguiente fórmula:

$$\frac{\# \text{ células contadas}}{\# \text{ de cuadrantes}} \times 10000 \times \text{Factor de dilución} = \frac{\text{Células totales}}{\text{mL}}$$

La concentración celular viable se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\# \text{ células viables contadas}}{\# \text{ de cuadrantes}} \times 10000 \times \text{Factor de dilución} = \frac{\text{Células viables}}{\text{mL}}$$

La viabilidad celular se calculó conforme la siguiente fórmula:

$$\frac{\# \text{ células viables contadas/mL}}{\# \text{ de células totales /mL}} \times 100 = \frac{\% \text{ Células viables}}{\text{mL}}$$

## **8.8 Adaptación de células HEK293 en medio DMEM-F12 suplementado con ExCyte en condiciones de 10% y disminución de 2, 3 y 5% de SFB.**

Para poder llevar a cabo la suplementación y posteriormente la disminución en la concentración de SFB, los cultivos de HEK293 de un criovial pase 17 se mantuvieron en frascos T25 en 5 mL de medio DMEM-F12 al 10% de SFB y 0.6% de ExCyte a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda proporcionada por la incubadora. Durante tres pases, tal y como es recomendado por parte del fabricante del suplemento (cada pase se ajustó a una concentración celular de 0.6x10<sup>6</sup> células viables), para el proceso de adaptación de las células a una nueva formulación de un medio de cultivo es necesario realizar alrededor de dos o tres pases para obtener un crecimiento del cultivo adecuado en el nuevo medio, por lo que al cumplir con este periodo el cultivo de células animales ha realizado un ciclo completo en su crecimiento, de esta manera las nuevas clonas de las células se encuentran en condiciones para mantenerse en las nuevas condiciones que el medio les brinda.

Cuando las modificaciones del medio no brindan lo necesario, éste se verá afectado en la respuesta de la viabilidad celular y en el crecimiento.

Al transcurrir los tres pases mínimos (periodo de adaptación) se procedió a montar la cinética de adaptación, de igual manera se tomó una alícuota de la suspensión celular de medio DMEM-F12 a 10% SFB y 0.6% ExCyte con un volumen equivalente a una densidad celular de  $0.6 \times 10^6$  y se llevó a otro frasco T25 con 5 mL de DMEM-F12 a 5% de SFB y ExCyte 0.6% para bajar la concentración de SFB; se resuspendieron las células en la nueva condición para disgregar y tener un crecimiento uniforme en toda la superficie del frasco T25.

El procedimiento para las disminuciones más críticas de SFB como fueron las condiciones de 2% y 3% fue el mismo que se realizó en el caso de 5% SFB. Cumplidos los tres periodos de adaptación a 5% SFB y ExCyte, se procedió a montar la cinética correspondiente y se tomó una alícuota equivalente a  $0.6 \times 10^6$  células/mL, traspasándolo a un nuevo frasco T25 con 5 mL de medio DMEM-F12 a 3% SFB + 0.6% de ExCyte + 1X de ITS y 0.6% de albúmina, resuspendiendo nuevamente hasta que las células cubrieran la superficie; al término del periodo de adaptación se preparó la cinética de las células en la nueva condición y nuevamente se tomó un volumen equivalente a  $0.6 \times 10^6$  células y se llevó a un frasco T25 con 5 mL de medio DMEM-F12 a 2% SFB + 0.6 % de ExCyte + 1Xde ITS y 0.6 % de albúmina, siendo la última disminución de SFB en el cultivo de HEK293 y posteriormente su evaluación mediante una cinética de crecimiento.

En todas las adaptaciones celulares se reservaron dos frascos T25 con 5 mL de medio correspondiente a cada adaptación para mantenimiento, colocando una concentración celular aproximada de  $0.1 \times 10^6$ /mL para retrasar el tiempo de pase del cultivo y posteriormente generar un banco celular de cada condición.

NOTA: Es importante no romper con la cadena seriada de adaptación al medio de cultivo y de disminución de SFB puesto que puede ocasionar que el cultivo de células animales no se encuentre estable y se afecte el crecimiento, si se presenta un inconveniente durante las reducciones se recomienda tomar una alícuota de los cultivos de mantenimiento correspondiente a la condición que se quiere llegar.

## **8.9 Cinética de crecimiento de células HEK293.**

La cinética se realizó al término de cada periodo de adaptación celular bajo las distintas suplementaciones realizadas en los cultivos de HEK293. La concentración celular inicial fue de  $0.9 \times 10^5$ /mL en un volumen de 1 mL en placas estériles de 12 pozosteniendo un triplicado de cada punto de la cinética para un periodo de 8 días sin cambiar el medio de cultivo. Cada 24 h se tomó un triplicado de cada punto de la cinética, se recolectó el sobrenadante en tubos eppendorf de 1.5 mL, se retiró la monocapa celular aplicando tripsina/EDTA 200  $\mu$ L dejándose incubar durante 5 min a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda. Pasado el tiempo de incubación se inactivó con el mismo medio recolectado y se resuspendió, tomando una alícuota de 200  $\mu$ L para llevar a cabo el conteo de células viables; el resto se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min y se recuperó el medio esta vez sin presencia de células. El medio recolectado se refrigeró a -80°C etiquetado con la condición evaluada y el tiempo de recolección para ser evaluado posteriormente y conocer el consumo metabólico de acuerdo con el apartado 8.11.

### **8.9.1 Velocidad específica de crecimiento de una cinética de crecimiento.**

Aunque el crecimiento celular generalmente implica un aumento en el número de células, inicialmente se produce un aumento en la masa celular sin ninguna replicación. La diferencia en la masa de la célula media entre poblaciones celulares es considerable, como podría esperarse, pero también lo es la variación dentro de la misma población. Crecimiento (aumento en el número de células o masa) se puede definir en los siguientes parámetros (Masters, 2000):

- I. Velocidad específica de crecimiento “ $\mu$ ” [es decir, la tasa de crecimiento por unidad (peso/número) de biomasa] es dada por la siguiente fórmula:

$$dx/dt = \mu x$$

Donde  $dx/dt$  es la velocidad con la que cualquier organismo crece en un medio y bajo condiciones de cultivo establecidas. Esta velocidad está regida por una constante de crecimiento denominada “velocidad específica de crecimiento” ( $\mu$ ) y por la concentración de células o biomasa. Así, integrando dicha ecuación con respecto al tiempo entre límites del tiempo inicial a un tiempo dado.

$$\ln x/x_0 = \mu t$$

Donde  $x_0$  es la concentración celular al tiempo  $t_0$  (tiempo 0).

- II. El tiempo de duplicación “ $td$ ” (tiempo que tarda en duplicar la población celular número/masa)

$$td = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu}$$

## **8.10 Cinética de infección de cultivos de HEK293 10 % SFB y disminución de 2% SFB más ExCyte.**

Se realizó la infección de HEK293 en dos condiciones de cultivo, aquel control donde el medio de cultivo fue suplementado con 10% de SFB y en disminución de SFB al 2% suplementado el medio de cultivo con 0.6 % de ExCyte, 1 X de ITS y 0.6

% de albúmina. Las infecciones se llevaron a cabo en el laboratorio de bioseguridad Nivel II dentro de la Facultad de Farmacia-UAEM.

Los duplicados de las cinéticas de infección partieron de una concentración celular inicial de  $0.6 \times 10^6$  CV/mL, en placas estériles de 6 pozos, recolectando muestra del medio de cultivo, muestra de la suspensión de células y vectores adenovirales (1 mL de suspensión células/medio) y una alícuota para conteo celular, todo esto se llevó a cabo cada 24 h hasta un periodo de 120 h post infección.

Las placas de 6 pozos se sembraron a la densidad celular establecida en un volumen de 2 mL, realizando el siguiente protocolo:

1. Una vez que las células están adheridas a la superficie de la placa, se retira el medio de cultivo cuidadosamente de cada pozo.
1. Colocar 2 mL de medio frío a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 del Ad5/IFN- $\gamma$ .
2. Incubar por un periodo de 3 h para que la infección viral se lleve a cabo.
3. Retirar 200  $\mu$ L del medio y añadir 200  $\mu$ L de SFB homogenizando cuidadosamente para una suplementación del 10 % de SFB (infección en suplementación normal).

Las células HEK293 adaptadas a la disminución más crítica de SFB (2%) y suplementadas con ExCyte se sembraron en placas a una densidad celular de  $0.6 \times 10^6$  CV/mL en 2 mL, y posteriormente se realizó el siguiente protocolo:

1. Una vez adheridas las células, retirar el medio de cada pozo.
2. Colocar 2 mL de medio sin SFB a una MOI de 5 del Ad5/IFN- $\gamma$ .
3. Incubar la placa durante 3 h, retirar el medio nuevamente y se colocar con precaución 2 mL del medio suplementado con 2% de SFB + 0.6% de ExCyte/1X de ITS/0.6 % de albúmina.

Registrar la hora de la infección de cada condición y realizar cada 24 h post infección la cosecha de cada pozo hasta las 120 h.

Se realizó la siguiente metodología para la cosecha y obtención de las muestras para las determinaciones posteriores:

1. Durante la manipulación de los cultivos utilizar la indumentaria requerida de acuerdo con los lineamientos internos de laboratorio de cultivo de células animales BSL II de la Facultad de Farmacia-UAEM.
2. Desprender con precaución la monocapa formada en el pozo correspondiente con ayuda de un scraper estéril, homogenizar suavemente y recolectar una muestra para realizar el conteo celular.
3. Recolectar del pozo 800  $\mu\text{L}$  de células y medio en un tubo eppendorf estéril y añadir 200  $\mu\text{L}$  de solución de sacarosa saturada, etiquetar como titulación de partículas virales, almacenar a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Muestra para ensayo en sección 8.15.
4. Tomar el sobrante del contenido de cada pozo en tubos eppendorf y centrifugar a 3000 rpm durante 5 min para separar el pellet celular del medio.
5. Una vez separada la muestra tomar una alícuota en un tubo eppendorf destinada para el análisis metabólico (ver apartado 8.11) y en otro tubo destinado para realizar la detección y cuantificación del IFN- $\gamma$  producido (ver apartados 8.13 y 8.14). Almacenar a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  respectivamente.
6. Los tubos que contenían los pellets celulares se etiquetaron y almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para la detección de los transcritos del Ad5/IFN- $\gamma$ . Ver apartado 8.12.

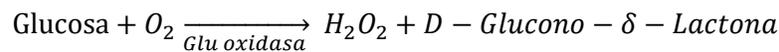
### **8.11 Cuantificación de metabolitos de las muestras de los medios de cultivo normales, adaptados e infecciones.**

Se realizó la cuantificación de la actividad metabólica en los cultivos evaluados con ayuda de un analizador bioquímico YSI. El analizador bioquímico YSI modelo 2950D-2 funciona a través de reacciones enzimáticas, éstas se llevan a cabo entre la membrana y el ánodo del equipo en donde al hacer paso de la muestra. Las membranas cuentan con una enzima inmovilizada oxidativa en la cual al hacer contacto forma peróxido de hidrógeno, éste a su vez hace la liberación de

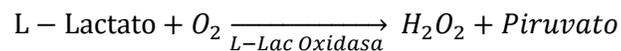
electrones, la reacción pasa a través de la membrana hasta el ánodo de platino, en el cual este flujo de electrones liberados es proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno en estado estacionario y, por lo tanto, es equivalente a la concentración del sustrato de la muestra analizada.

Las reacciones químicas que se llevan a cabo entre las membranas se presentan a continuación:

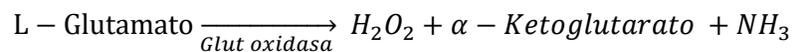
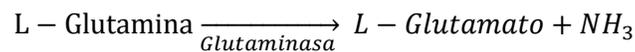
D-Glucosa:



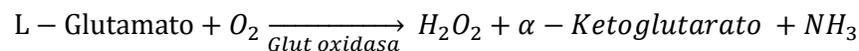
L-Lactato:



L-Glutamina:



L-Glutamato:



Preparación de las muestras para la cuantificación de los productos metabólicos.

1. Las muestras almacenadas para la actividad metabólica se descongelaron con el calor de las yemas de los dedos.
2. Se centrifugaron las muestras a 5 000 rpm a 4 °C.
3. Se tomó una alícuota en condiciones asépticas de 200 µL en un tubo eppendorf y se colocaron dentro de la placa para la lectura.
4. Posteriormente, se programó el YSI para medir glucosa, lactato, glutamina y glutamato y se dejó trabajar hasta finalizar con la lectura.

## **8.12 Detección de la infección con Ad5/IFN- $\gamma$ en cultivos de HEK293.**

Para determinar la producción del mRNA del gen de IFN- $\gamma$  por la infección del vector Ad5/IFN- $\gamma$ , se realizó un rt-PCR al ARN total extraído de los pellets celulares obtenidos en el apartado 8.10. En donde el ARN obtenido actúa como una plantilla y mediante una transcriptasa reversa se retrotranscribe a una cadena de cADN. El PCR es un método por el cual se lleva a cabo la síntesis de una secuencia específica de un molde de ADN, empleando dos oligos específicos que hibridizan y replican una región de interés (Bachman, 2013; Lynch, 1990).

### **8.12.1 Extracción de ARN de HEK293.**

Para realizar la extracción del ARN total de las células infectadas se utilizó el reactivo Trizol TRI Reagent® (ZYMO RESEARCH, No. Cat. R2050-1-50) y la metodología descrita a continuación:

1. Lavar el pellet celular (de preferencia  $1 \times 10^6$  células) dos veces con 200  $\mu$ L de PBS a 4 °C y centrifugar por 5 min a 1 200 rpm. Posteriormente, retirar el sobrenadante cuidadosamente sin llevarse pellet celular.
2. A partir de este paso, toda la manipulación se hace en una campana de flujo laminar para evitar una posible degradación de la muestra.
3. Resuspender el pellet celular con 200  $\mu$ L Trizol e incubar a temperatura ambiente por 5 min.
4. Añadir 200  $\mu$ L de cloroformo (IBI, N° Cat IB05040) y resuspender cuidadosamente, incubar por 5 min a temperatura ambiente y centrifugar a 4 °C por 10 min a 12 000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415 R).
5. Recuperar cuidadosamente la fase superior (fase acuosa) presentada en un tubo eppendorf libre de ARNsas. Tratar de sólo tomar la fase formada sin contaminar con la fase inferior (fase orgánica).

6. Añadir 400  $\mu\text{L}$  de isopropanol (4  $^{\circ}\text{C}$ ) y resuspender cuidadosamente. Incubar por 5 min a temperatura ambiente y centrifugar a 4  $^{\circ}\text{C}$  por 10 min a 12 000 rpm.
7. Al término de la centrifugación observar el pellet de ARN formado (transparente y dependiente de la extracción realizada), retirar el sobrenadante sin llevarse el pellet formado.
8. Agregar 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 75 % (4  $^{\circ}\text{C}$ ) y centrifugar a 7 500 rpm por 5 min a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Retirar el sobrenadante y dejar secar alrededor de 6 min.
9. Resuspender el pellet de ARN con 16  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. Almacenar a -80  $^{\circ}\text{C}$ .
10. Una vez realizada la extracción, cuantificar la concentración de ARN obtenida en el equipo NanoDrop 2000 Thermo SCIENTIFIC con una alícuota de 1  $\mu\text{L}$  a una longitud de onda de 260 nm.

### 8.12.2 Remoción de ADN genómico en extracción de ARN.

Para eliminar el ADN remanente de la extracción se empleó el kit DNase I, RNase-free (Thermo SCIENTIFIC, No. Cat. EN0525). De acuerdo con la concentración de ARN obtenida calcular el volumen necesario para una concentración de 1  $\mu\text{g}$  de ARN para todas las extracciones y llevar a cabo el siguiente tratamiento:

1. Incubar a 37  $^{\circ}\text{C}$  por 30 min en equipo termoblock (Digital Shaking Drybath Thermo SCIENTIFIC).
2. Terminada la incubación, agregar 1  $\mu\text{L}$  de EDTA 50 mM e incubar nuevamente a 65  $^{\circ}\text{C}$  por 10 min.
3. Una vez llevada a cabo la eliminación de ADN remanente proseguir con la síntesis de la primera cadena de cADN.

*Tabla 5 Reactivos para la remoción de ADN genómico en extracción de ARN. El volumen de cada componente es equivalente para una reacción.*

Reactivo	
ARN	1 $\mu\text{g}$
Buffer 10X con $\text{MgCl}_2$	1 $\mu\text{L}$
DNase I, RNase-free	1 U
Agua tratada con DEPC (#R0601)	cbp 10 $\mu\text{L}$

### 8.12.3 Síntesis de la primera cadena de cADN.

Para realizar la síntesis de cADN partiendo del ARN, se utilizó el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo SCIENTIFIC, No. Cat. K1631). En tubos eppendorf estériles y libres de nucleasas, se prepararon la reacción con el ARN obtenido y la reacción de control positiva GAPDH ARN que incluye el kit para verificar si la reacción de síntesis se realizó correctamente, esto de acuerdo con la Tabla 6:

Tabla 6 Preparación para la reacción de síntesis de cADN. El volumen de cada componente es equivalente para una reacción.

Reactivo		Reacción control GAPDH
Templado de ARN	5 µg	2 µL
Primer oligo (dT) <sub>18</sub>	1 µL	1 µL
Agua libre de nucleasas	Cbp 12 µL	9 µL
Buffer de reacción 5X	4 µL	4 µL
Inhibidor de RNAsa RiboLock (20U/ µL)	1 µL	1 µL
dNTP Mix 10 mM	2 µL	2 µL
Transcriptasa reversa RevertAid H Minus M-MuLV (200 u/ µL)	1 µL	1 µL
Volumen total	20 µL	20 µL

1. Incubar a 42 °C por 60 min en equipo termoblock (Digital Shaking Drybath Thermo SCIENTIFIC).
2. Terminar la reacción incubando a 70 °C por 5 min.
3. Una vez terminada la reacción de transcripción, ésta puede ser empleada para el PCR o ser almacenada a -20 °C para usarse dentro un periodo menor a semana; para un almacenamiento más prolongado almacenar a -70 °C.

### 8.12.4 Reacción de PCR.

Para la amplificación del fragmento a 120 pb del transgen IFN- $\gamma$  se emplearon los oligos diseñados por Romero-Martínez 2014 con tamaño de 23 nucleótidos cada uno:

Oligo forward	5'>GAG TGT GGA GAC CAT CAA GGA AG <3'	Tm 68
Oligo reverse	5'>TTG CGT TGG ACA TTC AAG TCA GT <3'	Tm 65

Para la reacción control GAPDH se realizó una dilución 1:1000 del control obtenido en la síntesis de cADN con agua libre de nucleasas en un tubo eppendorf libre de ARNsas. Posteriormente las preparaciones de las reacciones se realizaron de acuerdo con la Tabla 7:

*Tabla 7 Preparación de reacción de PCR. El volumen de cada componente es equivalente para una reacción.*

Reactivo		Reacción control GAPDH dilución 1:1000
cADN	4 µL	1 µL
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	12.5 µL	5 µL
Primer 5' forward	1 µL	0.2 µL
Primer 3' reverse	1 µL	0.2 µL
Agua libre de nucleasas	6.5	3.6 µL
Volumen final	25 µL	10 µL

Se mezcló ligeramente cada reacción para PCR.

Se colocaron los microtubos de cada reacción dentro del termociclador PikoREAL 24 Thermo SCIENTIFIC y utilizando el programa PikoReal Software 2.2 se programó el protocolo de los ciclos de amplificación como se describe en la Tabla 8.

*Tabla 8 Protocolo de PCR para verificar la presencia del gen IFN-γ en cultivos de HEK293 transducidos.*

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	40
Alineamiento	60	30 seg	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	10 min	1

En la Tabla 9 se presentan los ciclos de amplificación realizados para la reacción control GAPDH.

*Tabla 9 Protocolo de PCR amplificación de control GAPDH.*

<b>Paso</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de ciclos</b>
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	30 seg	35
Alineamiento	58	30 seg	
Extensión	72	45 seg	
Extensión final	72	5 min	1

Una vez obtenidos los productos de la amplificación por PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5 % y TBE 0.5 % (ver anexo I), en buffer TBE 0.5 % (ver anexo II) a 80 Volts, 150 mA por 1 h y se reveló el gel con luz ultravioleta en equipo transiluminador (Bio-Rad, ChemiDocXRS) utilizando el programa QuantityOne 4.6.4 para observar las bandas obtenidas.

### **8.13 Detección del IFN- $\gamma$ mediante Western Blot.**

Para confirmar la producción de la proteína IFN- $\gamma$  se utilizaron los sobrenadantes obtenidos del apartado 8.10. La técnica de WB es ampliamente utilizada, siendo una poderosa herramienta en ciencias de la salud y bioquímicas para detectar y caracterizar una gran variedad de proteínas. La detección de las proteínas se realiza mediante una serie de incubaciones con conjugados de enzimas y anticuerpos muy específicos que se blindan a la proteína y permiten la revelación de bandas correspondientes a la proteína de interés (Kurien & Scofield, 2006).

#### **8.13.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida.**

Para poder identificar el IFN- $\gamma$  secretado al medio por los cultivos infectados, se realizó un gel de electroforesis de poliacrilamida en el cual se separó la proteína de acuerdo con su peso molecular.

El gel se realizó preparando un molde con ayuda del material para construcción de geles Bio Rad. Para asegurar de no tener fugas en el molde, se utilizó etanol al 75%,

se retiró y dejó secar para la preparación del gel. Posteriormente se siguió el siguiente protocolo:

1. Verter en el molde la solución del gel resolutivo a una concentración de 12.5 % (Tabla 10) preparada en un tubo eppendorf limpio. Tener cuidado de no generar burbujas en el gel; para mantener la simetría del gel colocar etanol al 75 % sobre la superficie. Utilizar el remanente como indicador de la polimerización del gel.
2. Una vez polimerizado el gel, agregar la solución para el gel espaciador-concentrador 4% (Tabla 11) sin formar burbujas y colocar el peine para los pozos de manera rápida y con cuidado. Utilizar el remanente como indicador de la polimerización del gel.
3. Preparar las muestras para la carga del gel colocando en tubos estériles de 1.5 mL 15  $\mu$ L del sobrenadante obtenido de las infecciones y agregar 15  $\mu$ L de Loading buffer con beta mercaptoetanol. Incubar en el termoblock a 95 °C por 5 min.
4. Una vez construido el gel, montar en la cámara de electroforesis y llenar con buffer TGS 1X (anexo IV).
5. Cargar los pozos con 30  $\mu$ L de las muestras ya preparadas y correr la electroforesis a 120 Volts, 250 mA por 1 h.

Se utilizó como marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (No. Cat SM1811) y como control positivo el estándar de IFN- $\gamma$  utilizado en el ensayo de ELISA (Human IFN gamma, Platinum ELISA, BMS228, affymetrix eBioscience, 114398000).

*Tabla 10 Reactivos para la preparación del gel resolutivo al 12.5 %. La preparación de cada componente se encuentra en el anexo III.*

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Lower Buffer	1.5 mL
Solución de acrilamida	2.5 mL
Agua tipo 1	2 mL
TEMED	5 $\mu$ L
Solución 10 % de persulfato de amonio	20 $\mu$ L

Tabla 11 Reactivos para la preparación del gel espaciador-concentrador al 4 %. La preparación de cada componente se encuentra en el anexo III.

Componente	Cantidad
Upper Buffer	0.63mL
Solución de acrilamida	0.33 mL
Agua tipo 1	1.54 mL
TEMED	2.5 $\mu$ L
Solución 10 % de persulfato de amonio	12.5 $\mu$ L

Una vez terminada la electroforesis se realizó la transferencia descrita posteriormente.

### 8.13.2 Electrotransferencia en cámara húmeda.

Posterior a la electroforesis se realizó la inmovilización de las proteínas mediante la transferencia de ellas a una membrana de nitrocelulosa. Para ello se realizó lo siguiente:

1. Sumergir en buffer de transferencia frío (4 °C) (anexo IV) perfectamente dos esponjas, seis hojas de papel filtro y la membrana de nitrocelulosa.
2. Sobre la base para la transferencia colocar una esponja y poner tres papeles filtros. Enseguida colocar con mucho cuidado el gel de poliacrilamida y encima poner la membrana de nitrocelulosa cubriendo perfectamente el gel (en estos dos últimos pasos evitar la formación de burbujas).
3. Posteriormente colocar los tres papeles filtros restantes y tapar con la esponja. Para eliminar la formación de burbujas, pasar con cuidado un rodillo de adentro hacia afuera para su eliminación y cerrar el sándwich formado cerrando las bases para la transferencia.
4. El sándwich formado sigue el orden de acuerdo con la Figura 10.

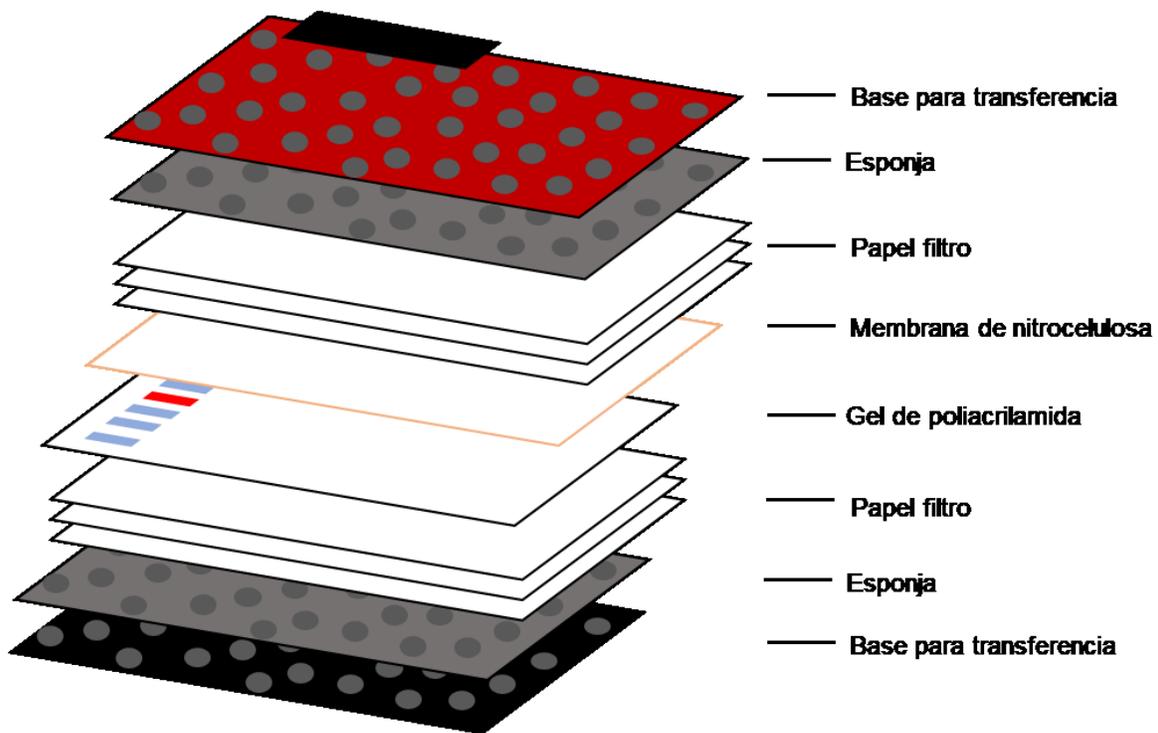


Figura 10 Diagrama del sándwich para la transferencia de proteínas.

5. Colocar el sándwich en la cámara de electrotransferencia y llenar con buffer de transferencia frío (4 °C) hasta donde lo indique la cámara. Correr a 200 Volts y 328 mA por 1 h.
6. Al término de la transferencia teñir la membrana con rojo de Ponceu al 0.1 % a temperatura ambiente por 15 min para verificar que la transferencia de proteínas haya sido exitosa.
7. Verificada la transferencia, lavar la membrana con solución TBST 1X (ver anexo IV) hasta desteñir la membrana completamente.
8. Al término, seguir con el paso bloqueo de la membrana e incubación con los anticuerpos.

### **8.13.3 Bloqueo, incubación con anticuerpos y revelado de membrana.**

Al término de la transferencia de proteínas se realizó el bloqueo de la membrana para su posterior revelado. El bloqueo se siguió de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Dentro de un recipiente, sumergir la membrana con 20 mL de solución bloqueadora (disolver en buffer TBST 1X lo equivalente al 5 % de leche Svelty) e incubar a 4 °C toda la noche (el volumen de solución bloqueadora depende del tamaño del recipiente a incubar).
2. Al término del bloqueo, a temperatura ambiente y en agitación constante lavar por triplicado la membrana con buffer TBST 1X por 10 min.
3. Incubar la membrana por 2 h y en agitación constante con el anticuerpo primario Anti-interferón gamma antibody (abcam No. Cat.ab9657). Hacer una dilución 1:3 333 tomando del stock del anticuerpo para 12 mL de una solución de TBST 1X al 0.1 % de leche Svelty (solución con anticuerpo a concentración de 150 ng/mL).
4. Lavar por triplicado a temperatura ambiente y en agitación constante la membrana con buffer TBST 1X por 10 min.
5. Incubar con el anticuerpo secundario Goat Anti-Rabbit igG antibody (H + L) HRP conjugate (Merck Millipore No. Car. AP307P) por 2 h en agitación constante. Hacer una dilución 1:5000 tomando del stock del anticuerpo para 10 mL de una solución de TBST 1X (solución con anticuerpo a concentración de 160 ng/mL).
6. Por triplicado lavar a temperatura ambiente y en agitación constante la membrana con buffer TBST 1X por 10 min. Retirar el exceso y mantener húmeda la membrana para su revelado.
7. En un tubo de centrifuga de 15 mL limpio, colocar 4 mL de solución luminol/potenciador y 4 mL de la solución de peróxido Clarity™ Western ECL Substrate (BIO-RAD No Cat. 170-5061), homogenizar perfectamente y verter sobre la membrana.
8. Incubar con la solución de revelado por 3 min manteniendo una pequeña agitación para asegurar que la solución cubra toda la membrana. Al término revelar la membrana rápidamente o puede quemarse.
9. La membrana se revela por quimioluminiscencia en equipo transiluminador (Bio-Rad, ChemiDocXRS) utilizando el programa QuantityOne 4.6.4.

## 8.14 Obtención del título viral por End Point Dilution.

Con la finalidad de determinar el número de partículas infectivas por unidad de volumen producidas en las infecciones virales realizadas en la sección 8.10, se realizó la cuantificación del Ad5/IFN- $\gamma$  en los puntos a 120 h post infección. Se cosecharon los pozos con un scrapper estéril y se recolectó una suspensión del medio de cultivo con células y se le agregó al volumen el 20 % de una solución de sacarosa estéril saturada. Durante el ensayo se utilizó como control positivo de infección un Ad5-Wild type (WT) y como control negativo de infección células sin infectar.

De un cultivo de células HEK293 al 10 % de SFB se sembraron  $1 \times 10^4$  CV/100  $\mu$ L por pozo en placas estériles de 96 pozos, se monitorearon las placas hasta alcanzar una confluencia del 80 % y se realizó la siguiente metodología:

1. Realizar tres ciclos de descongelación (37 °C) y congelación (-80 °C) de los viales para lisar las células y obtener la mayor cantidad de virus.
2. Preparar diluciones seriales del virus, tomando 10  $\mu$ L del vial stock y diluir en 990  $\mu$ L de medio DMEM-F12 sin suero, teniendo una relación 1:100. Partiendo de ésta, realizar diluciones seriales 1:10 transfiriendo 100  $\mu$ L del virus diluido en 900  $\mu$ L de medio sin suero (un rango apropiado para el ensayo es de  $10^{-3}$ – $10^{-10}$ ).
3. Con una micropipeta multicanal retirar el medio de las placas de 96 pozos y lavar con PBS todos los pozos (asegurar de no hacer daño a la monocapa celular).
4. Agregar 100  $\mu$ L en la primera fila en orden vertical para referirse al control positivo, de la segunda fila hasta la décima fila llenar con las diluciones seriadas partiendo de la de mayor concentración hasta la de menor concentración ( $10^{-3}$  –  $10^{-11}$ ) y dejar las últimas dos filas con medio suplementado libre de virus. Seguir de acuerdo con la Figura 11.
5. Dejar incubar a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> a una atmósfera húmeda por dos horas, retirar 20  $\mu$ L de medio en los cultivos infectados y reponer con 20  $\mu$ L de SFB e incubar a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en una atmósfera húmeda nuevamente hasta finalizar el ensayo.

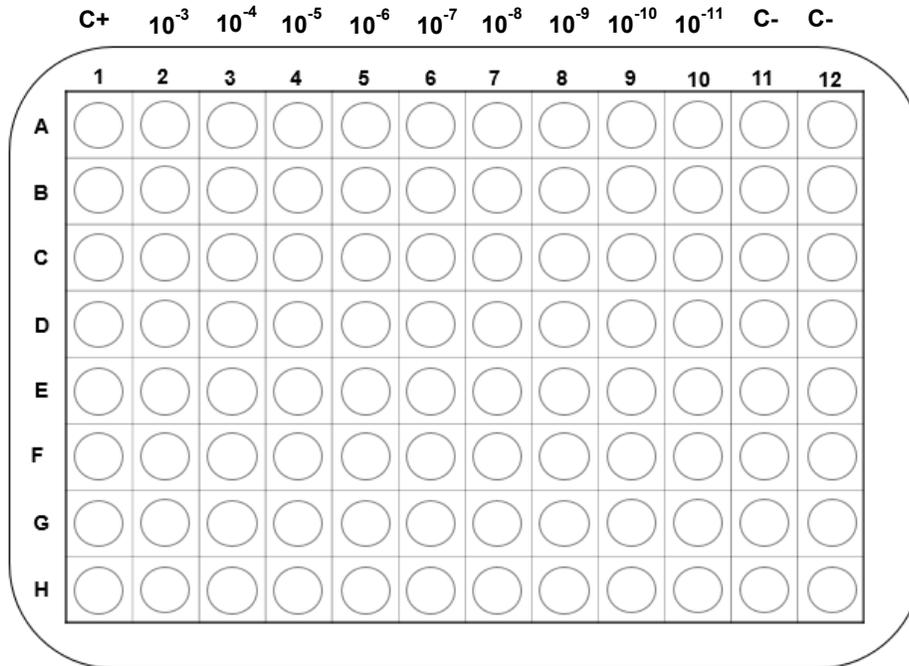


Figura 11 Diagrama placa de 96 pozos. Fila 1 control positivo (C+), filas 2-10 serie de diluciones y filas 10-11 controles negativos (C-).

- Dejar el ensayo durante siete días observando en microscopio cada pozo marcando como positivos aquellos en donde el efecto citopático (ECP) del virus en las células sea visible, como ayuda usar los controles positivos y negativos para diferenciar los pozos positivos, cómo negativos de infección.
- Una vez obtenidos los resultados, evaluar en una hoja de Excel por medio del método descrito por Reed & Muench en 1938 y realizar la estadística para obtener el número de partículas infectivas de Ad5/IFN- $\gamma$

El ensayo es un indicador del título viral confiable sólo si se cumplen las siguientes condiciones:

Los pozos controles negativo no deben mostrar signos de ECP o inhibición de crecimiento.

Los pozos infectados con el virus menos diluido deben presentar todos ECP.

Los pozos infectados con el virus más diluido deben ser ECP negativo.

## 9 Resultados.

### 9.1 Morfología celular en condiciones normales, suplementadas y en disminución de SFB.

Observar la morfología es una técnica simple y directa utilizada para identificar un cambio celular. Se pueden presentar cambios en la morfología celular en respuesta a diferentes condiciones de cultivo. Las HEK293 tienen un citoesqueleto característico y diferente a otros tipos celulares de origen normal o tumorigeno, el cual no cambia al presentarse en suspensión y en adherencia como en otros tipos celulares (Mohammad et al., 2015).

Para que las células puedan presentar una unión respecto a la superficie en donde se encuentran, se requiere de la presencia de glicoproteínas y/o cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) así como de proteínas de anclaje como la fibronectina que se encuentra presente en suero las cuales ayudan a la adhesión al sustrato y por ende permite la proliferación celular (Freshney, 2010; Masters, 2000).

La morfología de las células HEK293 se caracteriza por presentar una forma de tipo fibroblástica que se observó conforme se realizaban las adaptaciones a cada concentración de SFB más la suplementación con el ExCyte, la morfología de las células cambió en algunos casos. Esto se observa en la Figura 12, mostrando los distintos cultivos de HEK293 después de tres pases de adaptación en cada suplementación. Se tomó registro de la morfología a las 24 h y 48 h de cultivo para poder visualizar de mejor manera el crecimiento celular sin llegar al punto de confluencia. La Figura 12A representa el control al 10 % de SFB, en éste se observa la morfología característica de las células HEK293 teniendo una forma estrellada, células interconectadas y creciendo en forma de monocapa sobre la superficie.

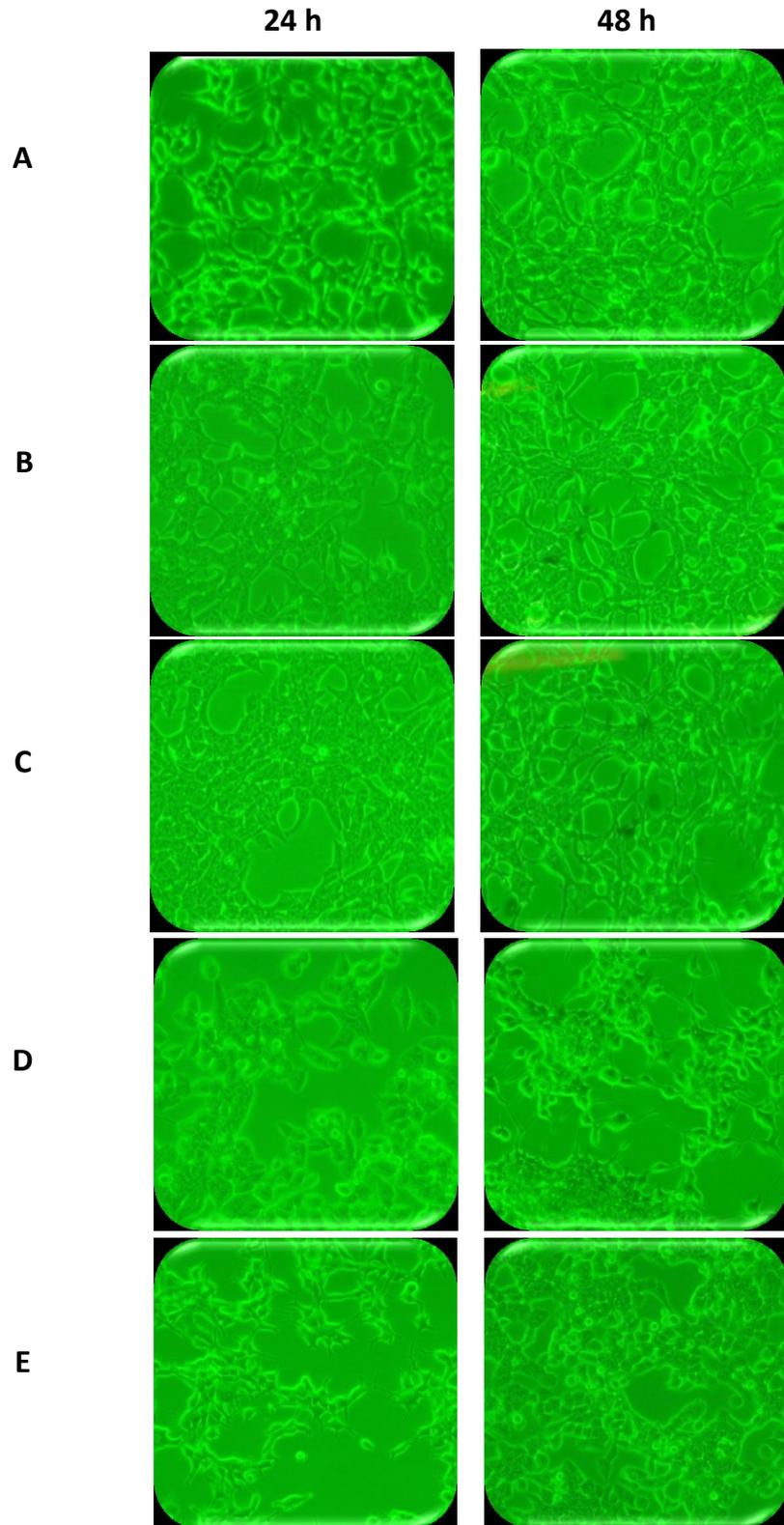


Figura 12 Morfología de células HEK293. A) 10 % SFB, B) 10 % SFB + ExCyte, C) 5 % SFB + ExCyte, D) 3% SFB + ExCyte con 1 X de ITS y 0.6 % de albúmina, y E) 2 % SFB + ExCyte con 1 X de ITS y 0.6 % de albúmina, tomadas a 24 y 48 h tras haber cumplido tres pases de adaptación.

En las Figuras 12B y 12C el cambio en la morfología aún no es perceptible teniendo un crecimiento celular y una distribución uniforme en monocapa manteniendo aún su característica forma estrellada; a pesar de que en la Figura 12C se representa una disminución del 50 % de SFB no hay variación en la morfología del cultivo con respecto a las condiciones control con SFB.

En la figura 12D el cambio morfológico de las células es más notorio debido a que comienzan a pasar de forma expandida y estrellada a tener un aspecto un poco redondo y alargado, en este cultivo se redujo la concentración de SFB a 3% y se suplemento con ExCyte/ITS/albúmina. En el cultivo representado en el panel 12E, donde la concentración de SFB fue del 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina se puede apreciar el mismo efecto en el cambio morfológico debido a la disminución de SFB, concluyéndose que, la concentración del SFB afecta directamente la morfología celular provocando ligeros cambios, en ambas condiciones algunas zonas presentan el crecimiento de pequeñas aglomeraciones debido una superposición entre las células.

## **9.2 Efecto en el crecimiento celular.**

### **9.2.1 Cinética de crecimiento HEK293 en condiciones control, suplementadas y con disminución de SFB.**

El crecimiento celular de las células HEK293 fue evaluado en medio DMEM-F12 con el suplemento ExCyte bajo condiciones de disminución de SFB y cómo control células con 10 % de SFB (ver apartado 8.4).

La tasa de crecimiento celular está influenciada por muchos factores tales como la temperatura, el pH, el suministro de oxígeno, CO<sub>2</sub>, etc. Al mantener estas condiciones constantes, el crecimiento celular sólo se afecta por consecuencia de la concentración limitante de un sustrato o nutrimento del medio de cultivo; por consiguiente, el factor limitante de este proyecto es el cambio en la suplementación

al añadir, disminuir y suplementar con SFB y ExCyte el medio DMEM-F12 para el cultivo de células HEK293.

Se realizó la cinética de las células HEK293 (Figura 13) a 10 % de SFB, el cual se usó como cultivo control para comparar los resultados con los cultivos suplementados con ExCyte y con las respectivas disminuciones de SFB.

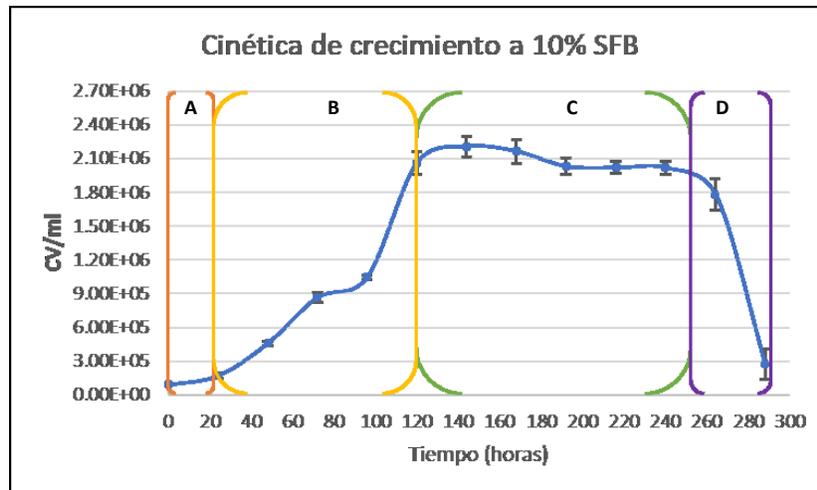


Figura 13 Cinética de crecimiento de células HEK293 cultivo control en medio DMEM-F12 a 10 % de SFB. Densidad celular inicial de  $0.9 \times 10^5$ /mL cinética por 288 h de cultivo. Se identificaron las cuatro etapas del crecimiento: A) fase Lag, B) fase exponencial, C) fase estacionaria y D) etapa de muerte. Se muestra el promedio de tres conteos celulares de tres réplicas biológicas ( $n=3$ ). Las barras representan el error estándar de las réplicas.

Dentro de la caracterización del cultivo de células HEK293 se monitoreó el crecimiento celular, identificando las etapas de crecimiento perfectamente delimitadas una de la otra.

La fase Lag se encuentra dentro de las primeras 24 h del cultivo, teniendo enseguida un crecimiento en fase exponencial que permanece hasta las 120 h, en donde se comienza a distinguir la formación de una meseta correspondiente a la fase estacionaria del cultivo que posteriormente tiene una caída cerca de las 240 h, etapa en la que se distingue la fase de muerte; la máxima densidad celular obtenida fue de  $2.23 \times 10^6$  CT/mL. De acuerdo con los datos obtenidos se calculó una velocidad

específica de crecimiento de  $0.034 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de duplicación ( $T_d$ ) de 20.4 h (Figura 16) para este control.

Las adaptaciones del cultivo de células HEK293 se siguieron de acuerdo con las especificaciones descritas por Merck Millipore mediante los procedimientos desarrollados en las secciones 8.8 y 8.9. Cada una de las cinéticas de crecimiento se realizaron por triplicado hasta 192 h de cultivo, haciendo conteo celular cada 24 h. En la Figura 14, se muestran las cinéticas de crecimiento realizadas después de cumplir con tres pases de adaptación. El cultivo A (10 % SFB y suplementación con ExCyte) demuestra entre las 24 h la etapa de latencia, en seguida el crecimiento exponencial hasta las 72 h, a las 96 h presenta un recaída que posteriormente pareciera regularizarse siendo posible causa un error en la toma de la alícuota para realizar el conteo, a partir de las 120 h demuestra un crecimiento uniforme perteneciente a la fase estacionaria manteniéndose hasta el final de la cinética; la densidad celular máxima obtenida fue de  $7.90 \times 10^5 \text{ CT/mL}$  (Figura 15), el crecimiento disminuye un 67.36 % correspondiente a una densidad celular de  $6.88 \times 10^5 \text{ CV/mL}$ . De acuerdo con el comportamiento presentado, la velocidad específica de crecimiento fue de  $0.0297 \text{ h}^{-1}$  y un  $T_d$  de 23.3 h (Figura 16). A pesar de ser un cultivo en condiciones normales más suplemento, los parámetros cinéticos muestran una disminución de  $\mu$  del 12.6 % y un aumento en el  $T_d$  del 14.5 % respecto al cultivo control.

En la Figura 14B se presenta la cinética de crecimiento correspondiente al medio de cultivo con 5 % de SFB suplementado con ExCyte, la fase Lag se encuentra dentro de las primeras 24 h seguido del crecimiento exponencial que tiene una duración hasta 120 h. Posteriormente, pasa a la fase estacionaria que comprende desde las 140 h hasta el término de la cinética, la máxima densidad celular fue de  $1.88 \times 10^6 \text{ CT/mL}$  (Figura 15) y de  $1.83 \times 10^6 \text{ CV/mL}$ , lo que representa una disminución del crecimiento del 17.17 % respecto al cultivo a 10 % de SFB. De acuerdo con el comportamiento del cultivo la  $\mu$  y  $T_d$  fueron de  $0.027 \text{ h}^{-1}$  y 25.6 h (Figura 16).

En los experimentos donde se redujo el SFB al 2 y 3% además de la suplementación con ExCyte se agregó al medio el equivalente a 1X de ITS y 0.6% de albumina como auxiliares en el crecimiento para cultivos bajos en suero tal y como lo recomienda la hoja técnica del suplemento.

El comportamiento obtenido en la Figura 14C representa la concentración a 3% SFB + ExCyte/ITS/albúmina. El periodo lag se encuentra dentro las primeras 24-30 h, a partir de las 48 h podemos observar el crecimiento exponencial hasta las 144 h y posteriormente se forma la fase estacionaria dentro de las 168 y 192 h. La máxima densidad celular encontrada fue de  $1.66 \times 10^6$  CT/mL (Figura 15) y de  $1.51 \times 10^6$  CV/mL, lo que representa una disminución del 31.7 % de la densidad celular presentada en el cultivo a 10 % de SFB. Se obtuvo un tiempo de duplicación celular de 46.8 h y una  $\mu$  de  $0.0148 \text{ h}^{-1}$  (Figura 16) con un incremento de Td del 129.7 % y una baja en la velocidad específica del 56.5 % respecto al cultivo control.

Finalmente, el crecimiento del cultivo Figura 14D, correspondiente a una concentración a 2% SFB + ExCyte/ITS/albúmina y muestra un periodo lag dentro las primeras 24-30 h, a partir de las 48 h se observa el crecimiento exponencial hasta las 144 h y posteriormente entra a la fase estacionaria entre las 168 y 192 h. En este cultivo la máxima densidad celular alcanzada fue de  $1.38 \times 10^6$  CT/mL (Figura 15) y de  $1.38 \times 10^6$  CV/mL, obteniendo una disminución del 37.55 % en comparación al cultivo a 10 % de SFB. De acuerdo con la Figura 16 el tiempo de duplicación celular fue de 49.5 h y la  $\mu$  de  $0.014 \text{ h}^{-1}$ , presentó un incremento de Td del 142.9 % y una baja en la velocidad específica del 58.8 % con respecto al cultivo control.

En estos cultivos, a pesar de haber alcanzado una disminución del 70 y 80 % de SFB respecto a la suplementación a 10 % SFB del control, la caída de la máxima densidad celular es menor al 38 %. A pesar de que el crecimiento celular no es equiparable tampoco demuestra una completa inhibición en el crecimiento.

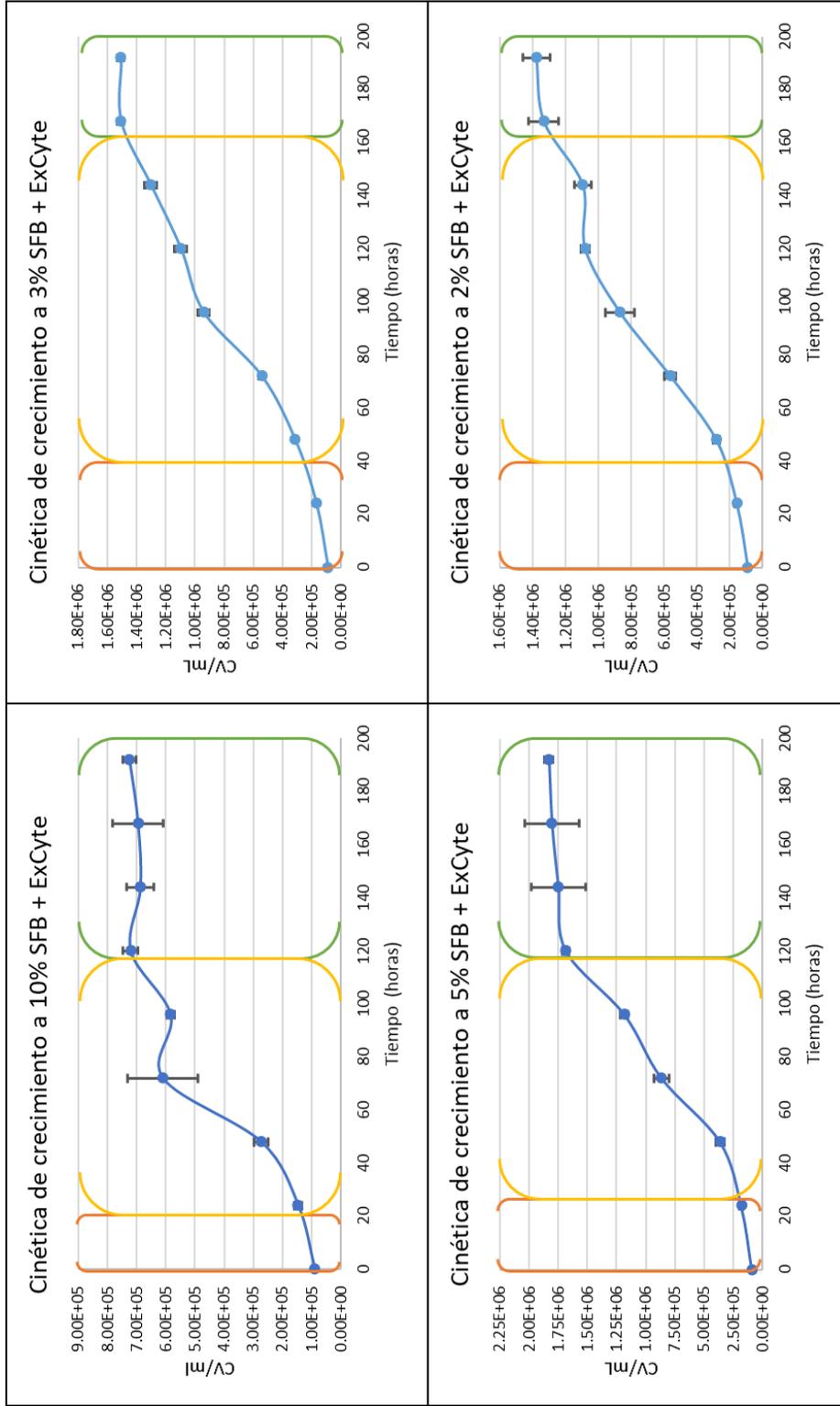


Figura 14 Cinéticas de crecimiento células HEK293. (A) cultivo con 10 % SFB y 0.6 % ExCyte, (B) cultivo con 5 % SFB y ExCyte, (C) cultivo con 3 % SFB + 0.6 % de ExCyte + 1 X de ITS y 0.6 % de albúmina, (D) cultivo 3 % SFB + 0.6 % ExCyte + 1 X de ITS + 0.6 % de albúmina. Dentro las gráficas encontramos las siguientes fases de crecimiento celular: I) fase Lag, II) fase exponencial y III) fase estacionaria. Se muestra el promedio de tres conteos celulares de tres réplicas biológicas (n=3). Las barras representan el error estándar de las réplicas.

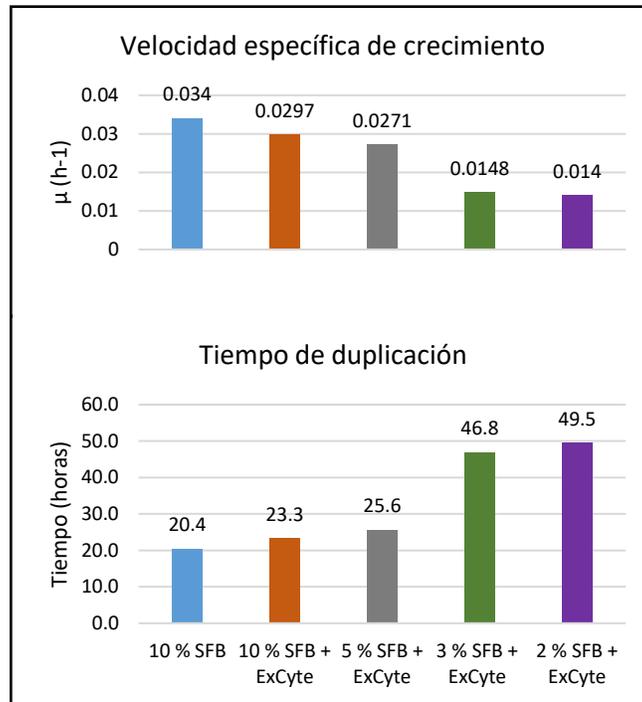


Figura 15 Parámetros cinéticos obtenidos de los cultivos de células HEK293 en las distintas suplementaciones del medio de cultivo DMEM-F12. Los valores obtenidos se encuentran en la parte superior de las barras.

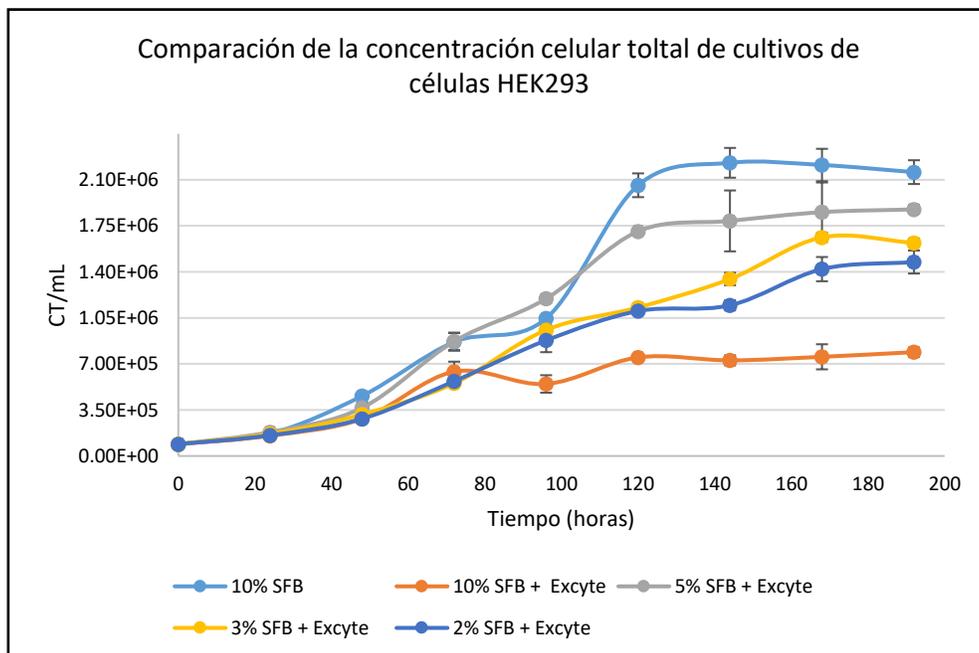


Figura 16 Comparación entre las densidades celulares totales alcanzadas en los cultivos de células HEK293 en medio DMEM-F12. Cultivos a 10 % SFB, 10 % SFB con suplemento ExCyte y disminuciones de 2, 3, y 5 % de SFB con ExCyte. Adicionalmente en cultivos a 2 y 3 % de SFB se añadió 1 X de ITS y 0.6 % de albúmina. Se muestra el promedio de tres conteos celulares de tres réplicas biológicas (n=3). Las barras representan el error estándar de las réplicas.

El crecimiento de los cultivos de células HEK293 demuestra una relación con la concentración de SFB, ya que a menor concentración de éste, la densidad celular y  $\mu$  disminuyen, mientras que el tiempo de duplicación aumenta, pero ¿Cómo afecta a la viabilidad celular? en la Figura 17 se representa el gráfico del porcentaje de viabilidad celular, obtenida a partir de las cinéticas de crecimiento hasta las 192 h.

La línea azul de la Figura 17 representa el comportamiento del cultivo control, con una viabilidad en el rango del 94 % durante el monitoreo. El cultivo con 10 % SFB más suplemento ExCyte (barra de color naranja Figura 17) presenta una viabilidad dentro del 92%.

El cultivo a 5% de SFB y suplemento ExCyte presenta un porcentaje de viabilidad celular de un 97% (Figura 17) durante la evaluación de todo el cultivo, demostrando la viabilidad más alta encontrada en todas las condiciones e incluso del control. Por lo que una concentración del 5 % de SFB más ExCyte comienza a demostrar una de las condiciones más favorables en cuanto a disminución de SFB y mantenimiento de células HEK293.

El cultivo a concentración de 3% + ExCyte/ITS/albúmina (línea amarilla Figura 17) y el cultivo a concentración de 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina (línea azul fuerte Figura 17) demostraron un porcentaje de viabilidad del 93% al término del monitoreo. A pesar de registrar un deceso en el crecimiento celular, la viabilidad con el medio fue buena, siendo muy similar a lo presentado en el cultivo control. La adición extra de los suplementos ITS y albúmina compensan la disminución de componentes del suero fetal bovino que ayudan al transporte de nutrimentos para el mantenimiento y crecimiento celular.

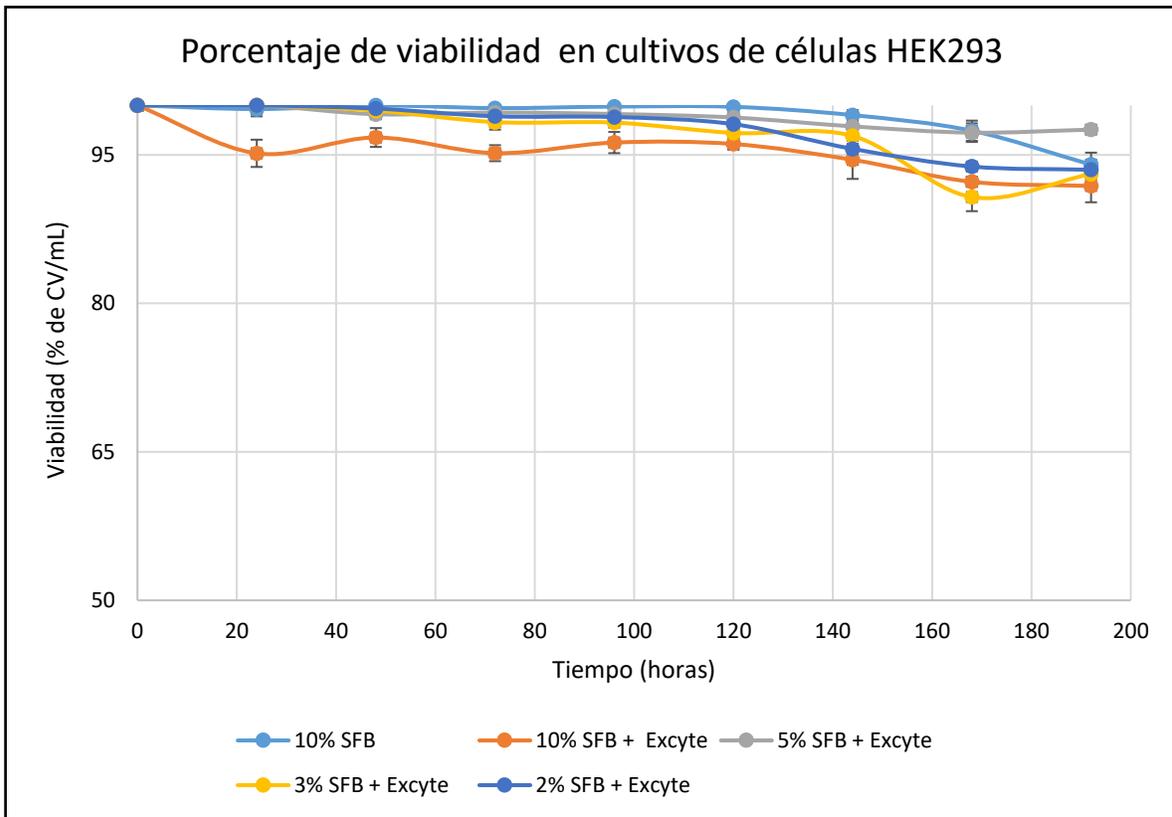


Figura 17 Porcentaje de viabilidad celular de cultivos de células HEK293 en condición control de cultivo a 10 % de SFB; adaptaciones a 10 % SFB + ExCyte; cultivos a concentraciones de 2, 3 y 5 % de SFB más ExCyte, suplementando adicionalmente con 1 X de ITS y 0.6 % de albúmina. Se muestra el promedio de tres conteos celulares de tres réplicas biológicas (n=3). Las barras representan el error estándar de las réplicas.

### **9.3 Consumo metabólico de los cultivos de células HEK293.**

El crecimiento celular y el comportamiento metabólico son características que se pueden relacionar entre sí, debido a que el crecimiento celular y el régimen del consumo de metabolitos pueden proporcionar una clara idea del estado de aceptación/rechazo del medio en las distintas condiciones de cultivo y comprobar si el ambiente en el que se encontraron fue óptimo para su desarrollo (Finley & Thompson, 2015).

#### **9.3.1 Glucosa y Lactato.**

La Figura 18 representa el comportamiento del consumo de glucosa de los cultivos evaluados de HEK293. Los parámetros se obtuvieron a partir de las cinéticas de crecimiento hasta las 120 h. Todos los cultivos tuvieron una concentración inicial de glucosa de  $3.16 \text{ g/L} \pm 0.04$ . En todos los cultivos de HEK293 se observó que la concentración de glucosa disminuye conforme el ritmo del crecimiento celular y el tiempo. Como era de esperarse, el consumo fue más acelerado durante las fases de crecimiento exponencial y se mantuvieron una vez que entraron en la fase estacionaria.

El cultivo a 10 % de SFB presentó una concentración de glucosa de  $0.92 \text{ g/L}$  al término de la cinética, siendo la más baja; en cuanto al cultivo a 10% de SFB + ExCyte la concentración fue de  $1.32 \text{ g/L}$ ; y, en el cultivo evaluado a 5 % de SFB + ExCyte fue de  $1.10 \text{ g/L}$ . En cuanto al cultivo a 2% SFB + ExCyte/ITS/albúmina la concentración residual de glucosa fue la más alta con  $1.54 \text{ g/L}$ , mientras que el cultivo a 3% SFB + ExCyte/ITS/albúmina la concentración final fue de  $1.13 \text{ g/L}$ ; ambos cultivos demostraron un consumo específico de glucosa muy parecida  $1.49 \times 10^{-11}$  y  $1.51 \times 10^{-11} \text{ g/cel} \cdot \text{h}$  respectivamente. De acuerdo con los resultados, el cultivo que presentó el consumo específico de glucosa más alto fue una suplementación a 10% SFB + ExCyte y la más baja fue el cultivo a 5 % de SFB +

ExCyte (ver Tabla 12). En todos los casos se observa que la glucosa no fue el nutrimento limitante.

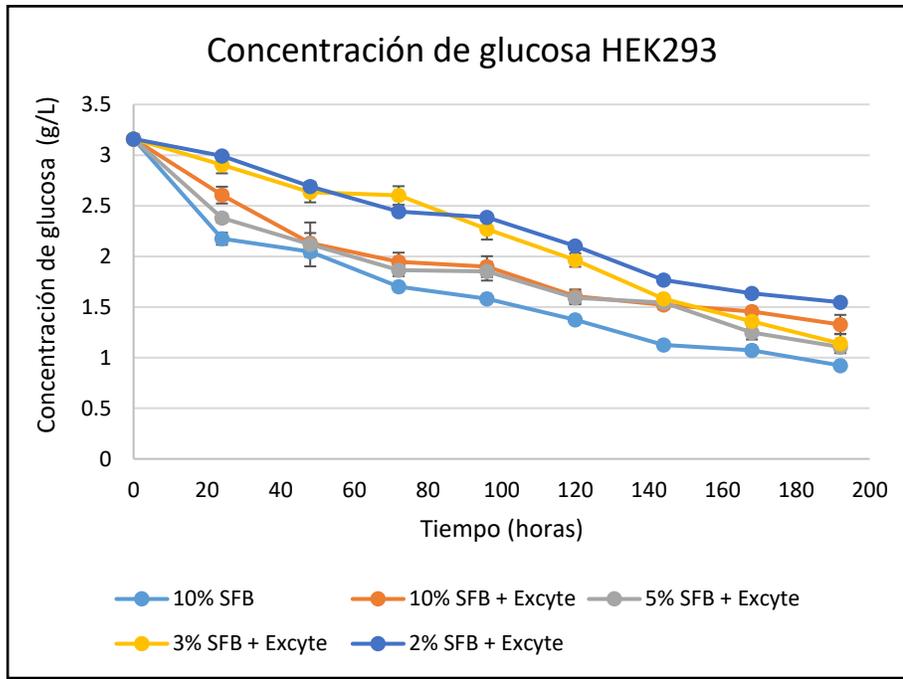


Figura 18 Concentración de glucosa de los cultivos de HEK293 con las distintas suplementaciones y disminuciones de SFB evaluadas. Se muestra el promedio de tres lecturas de tres replicas biológicas ( $n=3$ ). Las barras de error representan el error estándar de las replicas.

La producción de lactato mostró un el incremento de acuerdo con el crecimiento celular. Ninguno de los cultivos presentaron una concentración igual o mayor a 20 mol que acuerdo con lo reportado causa inhibición del crecimiento en células animales (Ozturk & Hu, 2006).

La concentración final de lactato obtenida para el cultivo a 10% de SFB fue de 1.03 g/L y en la suplementación con 10% de SFB + ExCyte fue de 1.32 g/L. La disminución de 5 % de SFB + ExCyte produjo una concentración de lactato de 1.09 g/L. Para los cultivos a 2 y 3% de SFB + ExCyte/ITS/albumina las concentraciones de lactato fueron de 1.16 y 1.13 g/L respectivamente. En cuanto a la producción específica de lactato (ver Tabla 12) los valores fueron de  $1.06 \times 10^{-11}$  y  $1.12 \times 10^{-11}$  g/cel\*h, siendo los valores más bajos registrados. El cultivo suplementado con 10%

de SFB + ExCyte presentó la velocidad específica de producción más alta siendo de  $3.15 \times 10^{-11}$  g/cel\*h (Tabla 12). Todos los cultivos independientemente de la suplementación con ExCyte producen cantidades similares de lactato por célula, aunque el rendimiento con respecto a la glucosa es ligeramente mayor en el cultivo control y en el de 5% de SFB, situación que puede presentarse por la adaptación del metabolismo celular a la carencia de SFB.

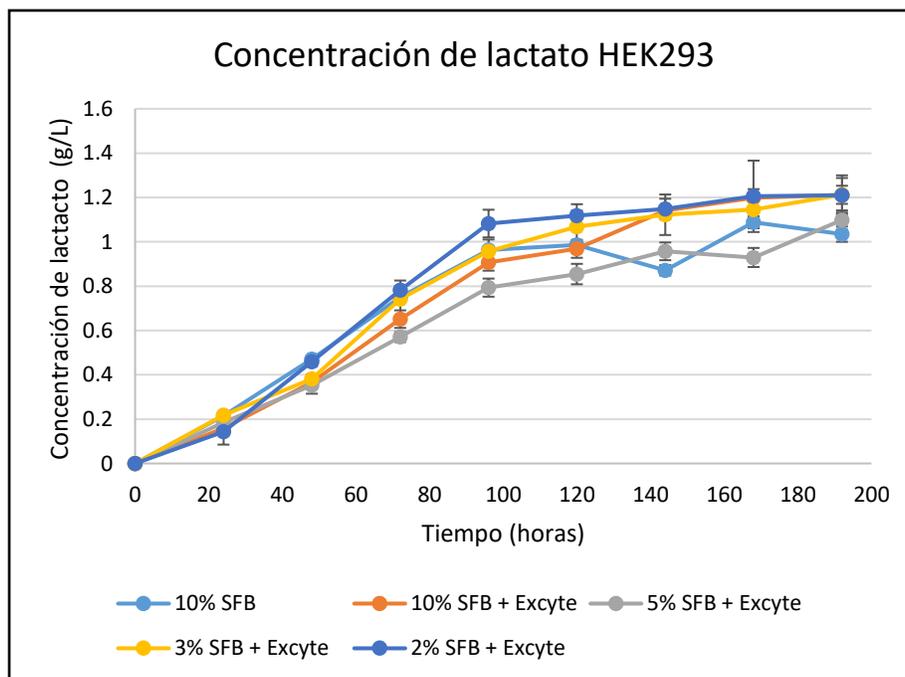


Figura 19 Concentración de lactato de los cultivos de HEK293 con las distintas suplementaciones y disminuciones de SFB evaluadas. Se muestra el promedio de tres lecturas de tres replicas biológicas (n=3). Las barras representan el error estándar de las réplicas.

Tabla 12 Comparación de parámetros de consumo de nutrimentos y formación de lactato y glutamato en cultivos de HEK293 a distintas suplementaciones en medio DMEM-F12.

Parametros metabólicos					
Parámetro	10% SFB	10% SFB + ExCyte	5% SFB + ExCyte	3% SFB + ExCyte	2% SFB + ExCyte
qGlucosa (g/cel*h)	2.32E-11	4.23E-11	1.42E-11	1.51E-11	1.50E-11
qLactato (g/cel*h)	2.61E-11	3.15E-11	1.64E-11	1.06E-11	1.12E-11
YLac/Glu g (g/g)	1.126	0.745	1.155	0.703	0.747
qGlutamina (g/cel*h)	3.72E-12	5.79E-12	2.49E-12	3.66E-12	4.41E-12
qGlutamato (g/cel*h)	7.53E-13	2.48E-13	1.63E-13	1.82E-13	1.47E-13
YGluto/Glut (g/g)	0.203	0.043	0.065	0.050	0.033

### 9.3.2 Glutamina y glutamato.

La glutamina y el glutamato tienen un papel importante en el cultivo y metabolismo de células de mamífero; debido a que la glutamina es una fuente de energía y precursora de pirimidinas, purinas y NAD<sup>+</sup>, además que va de la mano junto con el metabolismo de nitrógeno, su descenso es debido tanto al consumo por las células como por su descomposición (Quek et al., 2010). La conversión de glutamato se origina por acción de la enzima glutaminasa activada por fosfato que desamina la glutamina en la mitocondria y origina la liberación de glutamato, éste puede donar su grupo amino para la síntesis de nuevos aminoácidos (prolina y ornitina) (Newsholme et al., 2003; Ozturk & Hu, 2006), por lo que ambos juegan un papel en el cultivo de células animales.

Todos los cultivos tuvieron una concentración inicial de glutamina de  $0.37 \pm 0.0072$  g/L, el consumo presentado fue de acuerdo con el crecimiento y tiempo de cultivo, donde el consumo era más notorio durante la fase exponencial.

En la Figura 20 se muestra el consumo de glutamina de los cultivos de HEK293 evaluados. En el cultivo a 10% de SFB la concentración residual fue de 0.036 g/L y en cultivo con suplementación de 10% de SFB + ExCyte el valor fue de 0.110 g/L. El cultivo con la disminución de 5% de SFB + ExCyte la concentración fue de 0.029 g/L y en los cultivos con disminución a 2 y 3% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina las concentraciones fueron de 0.014 y 0.032 g/L respectivamente. La velocidad específica de consumo presentada en los cultivos en orden de menor a mayor fue la siguiente: 5% de SFB + ExCyte, 3% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina, 10% de SFB, 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina y el cultivo a 10% de SFB + ExCyte siendo el de mayor consumo (ver Tabla 12). Aquí se observa que este compuesto llegó a valores muy bajos, aunque no limitantes en todos los cultivos, con excepción del de 10 % SFB + ExCyte, lo que pudo ocasionar el desencadenamiento de muerte.

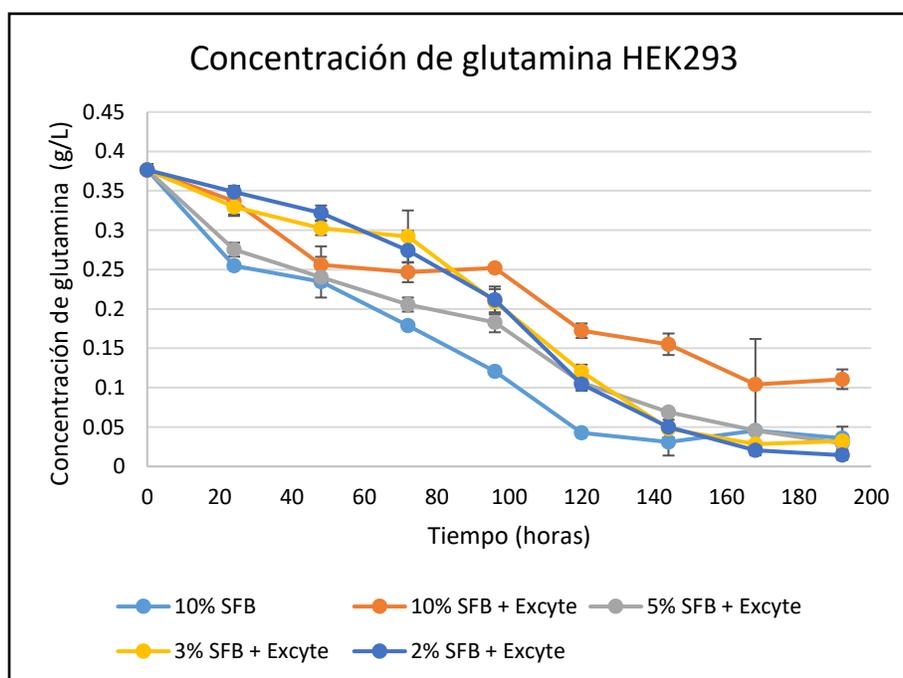


Figura 20 Concentración de glutamina de los cultivos de HEK293 con las distintas suplementaciones y disminuciones de SFB evaluadas. Se muestra el promedio de tres lecturas de tres replicas biológicas (n=3). Las barras representan el error estándar de las replicas.

En cuanto al glutamato, la concentración inicial fue de  $0.0077 \pm 0.0008$  g/L, posteriormente todos los cultivos presentaron una producción entre las 24 y 48 h de

cultivo (Figura 21) que posteriormente empezaron a consumir. El cultivo a 10% de SFB presenta un consumo de glutamato más rápido, seguido del cultivo a 10% SFB + ExCyte, 3% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina, 5% de SFB + ExCyte y el cultivo con 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina fue el más bajo (ver Tabla 12). En cuanto a la tasa de rendimiento de producción de glutamato por glutamina consumida el cultivo a 10% de SFB fue el más alto y el más bajo fue el cultivo a 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina.

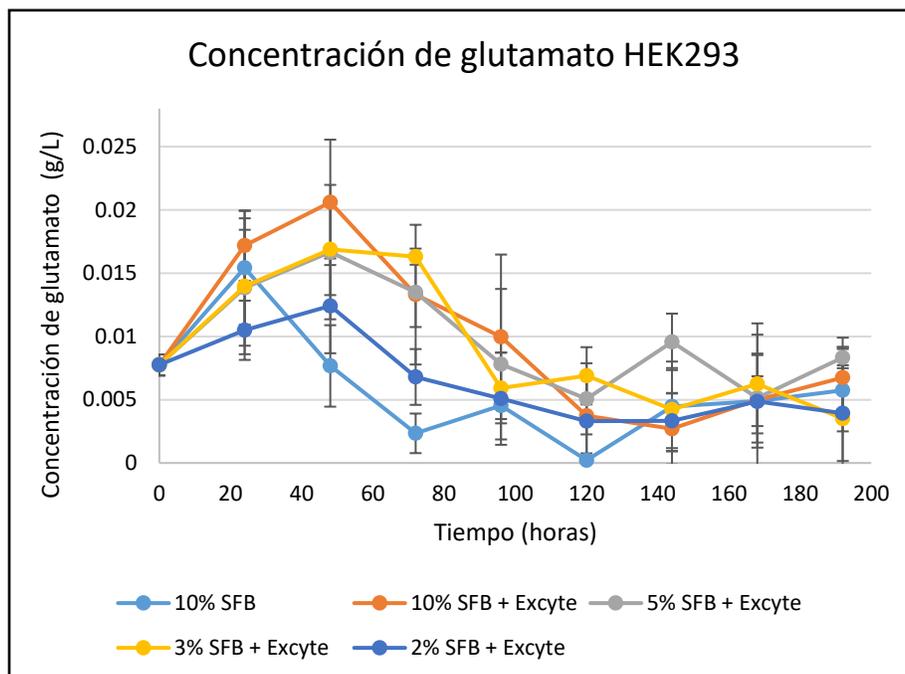


Figura 21 Concentración de glutamina de los cultivos de HEK293 con las distintas suplementaciones y disminuciones de SFB evaluadas. Se muestra el promedio de tres lecturas de tres réplicas biológicas (n=3). Las barras de error representan el error estándar de las réplicas.

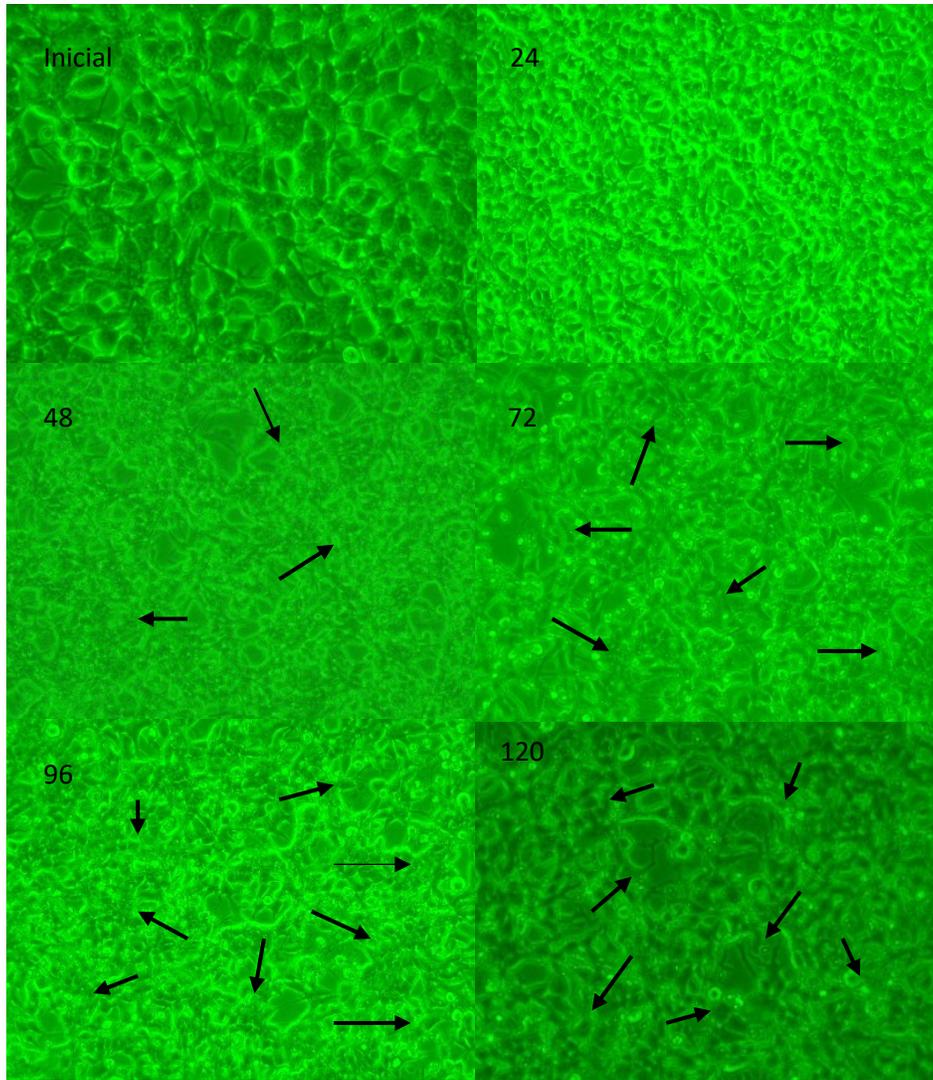
## **9.4 Efecto de la suplementación de ExCyte en la producción de vectores adenovirales y proteína recombinante.**

Una vez adaptadas las células a las diferentes concentraciones de SFB y al suplemento ExCyte, se realizaron las respectivas infecciones para las dos condiciones extremas: 10% de SFB y 2% SFB + ExCyte/ITS/albúmina, utilizando la densidad celular y la multiplicidad de infección (MOI) reportadas en el trabajo de tesis de la M.F. Concepción Sosa en 2018 quién estableció que, la producción del vector Ad5/IFN- $\gamma$  e interferón gamma recombinante se obtienen en mayor cantidad empleando una densidad celular de  $0.6 \times 10^6$  CV/mL y una MOI de 5, es decir que de acuerdo con cada célula se transducen cinco partículas virales infectivas; las infecciones se realizaron de acuerdo con el apartado 8.10.

### **9.4.1 Morfología de cultivos de HEK293 infectados con Ad5/IFN- $\gamma$ .**

Al realizar la cinética de infección se documentó la morfología celular durante todo el proceso de infección, antes y cada 24 h post infección hasta su término a 120 h.

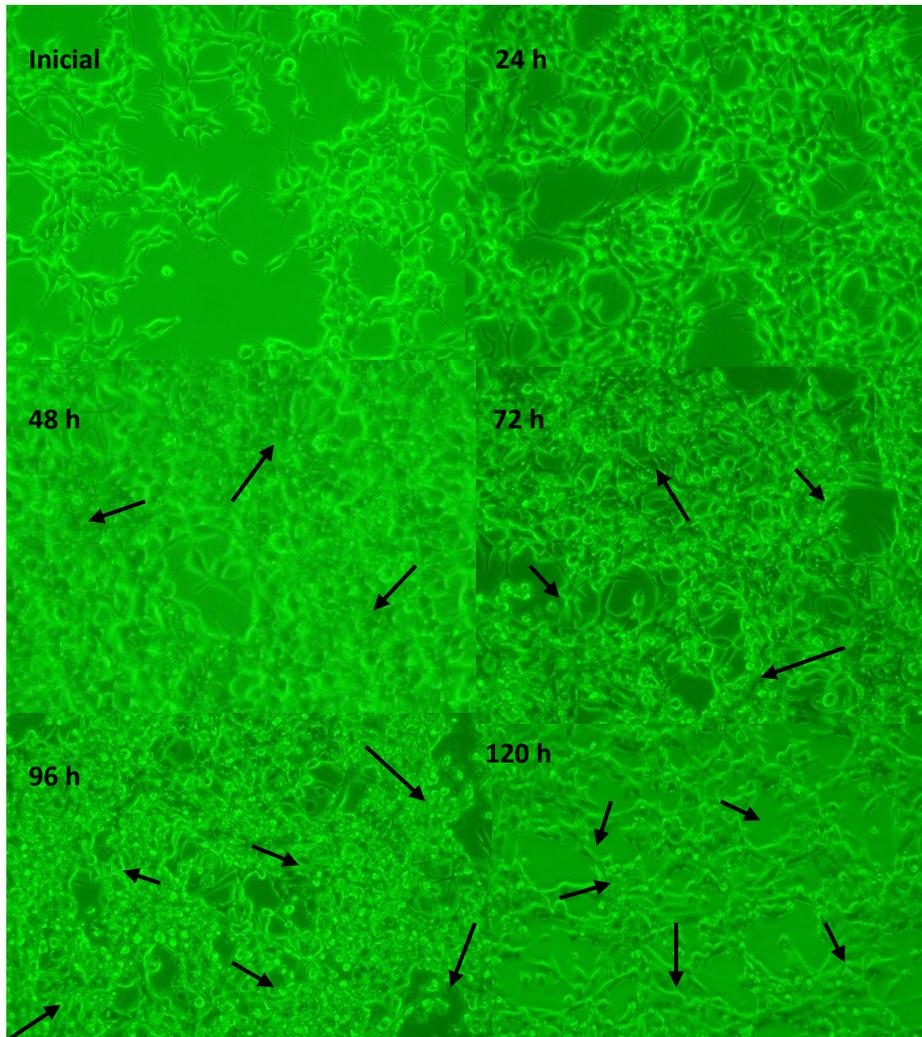
En la Figura 22 se muestra la morfología celular del cultivo control de células HEK293 a 10% de SFB. Antes de la infección la morfología celular demuestra un crecimiento en forma de monocapa sobre toda la superficie del pozo. A partir de las 72 h post infección, el efecto citopático causado por el Ad5/IFN- $\gamma$  se hace notorio, formando un cúmulo de células que adquiere una forma parecida a un racimo de uvas que es característico de la transducción del adenovirus tipo 5. Durante la infección viral el efecto provocado por el adenovirus es más notorio, presentando pequeñas placas líticas, causando levemente el desprendimiento de la monocapa celular a 120 h.



*Figura 22 Morfología de la monocapa celular en cinética de infección de HEK293 en medio de cultivo DMEM-F12 a 10 % de SFB. Objetivo a 10 X. Infección con Ad5/IFN- $\gamma$  a una MOI de 5 en una densidad celular inicial de  $0.6 \times 10^6$  CV/mL. Las flechas muestran las zonas líticas y el efecto citopático.*

La Figura 23 representa el cultivo de HEK293 en medio DMEM-F12 a 2% de SFB suplementado con ExCyte. Se documentó el cultivo antes de realizar la infección y cada 24 h post infección hasta su cosecha a las 120 h. El crecimiento celular no llega a cubrir toda la superficie del pozo debido dos factores: el tiempo de duplicación celular en esta condición es mayor en comparación al cultivo control y por otro lado, el proceso de infección decrece la proliferación celular. El efecto de la replicación viral se observa un poco a las 48 h, sin embargo, pasadas las 72 h es

donde el efecto citopático es más evidente. Durante la infección, se presentó la formación de placas líticas en la monocapa y desprendimiento de células, siendo más evidente a las 120 h. A pesar de ser la condición más crítica en disminución de SFB, de acuerdo con la viabilidad celular la replicación del virus se llevó eficientemente de acuerdo a la morfología de las placas.



*Figura 23 Morfología de la monocapa celular en cinética de infección de HEK293 en medio de cultivo DMEM-F12 a 2 % de SFB + ExCyte + 1X ITS + albúmina. Objetivo a 10 X. Infección con Ad5/IFN- $\gamma$  y a una MOI de 5 en una densidad celular inicial de  $0.6 \times 10^6$  CV/mL. Las flechas muestran las zonas líticas y el efecto citopático.*

### 9.4.2 Infección de cultivos de HEK293 a 10% SFB y 2% SFB + ExCyte/ITS/albúmina.

La densidad celular máxima alcanzada en ambos cultivos fue a las 48 h post infección , en el cultivo a 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina la densidad fue de  $1.56 \times 10^6$  CV/mL, mientras que en el cultivo control la densidad registrada fue de  $1.76 \times 10^6$  CV/mL; a partir de las 72 h la concentración celular disminuyó gradualmente en ambos cultivos con una concentración celular de  $1.65 \times 10^6$  CV/mL para el control y de  $1.54 \times 10^6$  CV/mL en la disminución a 2% de SFB. Al término de la cinética de infección (120 h) la densidad celular para el control fue de  $1.64 \times 10^6$  CV/mL y de  $1.27 \times 10^6$  CV/mL para el cultivo a 2% de SFB (Figura 24). La importancia de una densidad celular y una MOI optimizada, es debido a que la infección del adenovirus es bastante rápida y lítica, por lo que, si la densidad celular no es adecuada a la MOI, las células tratarán de obtener más energía para soportar la producción viral aumentando el estrés celular, además de que a mayor cantidad de partículas virales la lisis aumenta (Altaras et al., 2005).

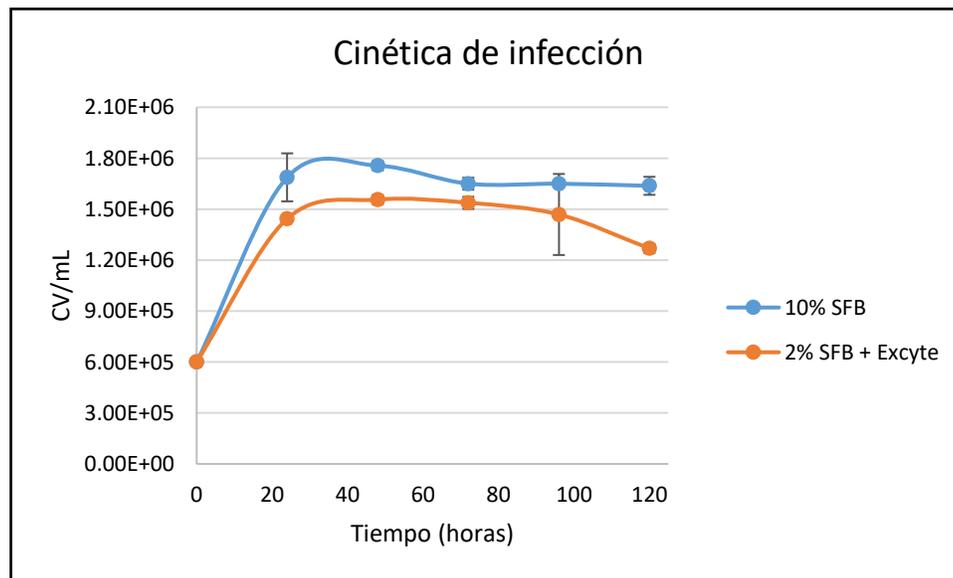


Figura 24 Cinética de infección de células HEK293, cultivo control a 10 % de SFB y cultivo a 2 % SFB más suplemento ExCyte. La densidad celular inicial fue de  $0.6 \times 10^6$  CV/mL, la infección se realizó con el Ad5/IFN- $\gamma$  a una MOI de 5. La infección se monitoreó hasta las 120 h. Las barras de error representan el error estándar de las réplicas (n=2).

### **9.4.3 Viabilidad celular post infección en cultivos de HEK293: condición normal de crecimiento vs disminución a 2% SFB + ExCyte/ITS/albúmina.**

Como uno de los pasos en la evaluación de los cultivos de HEK293 suplementados con ExCyte, se realizó una infección en un cultivo a 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina, registrando el porcentaje de viabilidad obtenido después de la infección. El suplemento ExCyte tiene la capacidad de mejorar la producción de proteína recombinante en cultivos celulares por lo que se determinó a estudiar su desempeño ante una infección sobre la producción viral y la producción de proteína recombinante. El ensayo se realizó en una placa estéril de 6 pozos a una densidad celular inicial  $0.6 \times 10^6$  CV/mL por pozo y una infección con el Ad5/IFN- $\gamma$  a MOI 5.

Las partículas virales son ensambladas intra celularmente y debido a la naturaleza lítica de la propagación del adenovirus, la lisis celular es inducida después de la producción de las partículas virales. Como resultado, la concentración celular y la viabilidad disminuyen conforme a liberación de las partículas virales al sobrenadante.

Los porcentajes de viabilidad (Figura 25) de los cultivos control (células HEK293 a 10% SFB) y a 2% SFB más suplemento ExCyte fueron arriba del 90 % dentro de las 48 h post infección; la disminución de la viabilidad comenzó a partir de las 72 h, tiempo en el cual el efecto citopático del virus comenzó a ser notorio; al término de la infección la viabilidad en el cultivo control y en el cultivo con disminución de SFB y suplementación mostraron una viabilidad del 81 y 79 % respectivamente, por lo que el estrés presentado en las células por la propagación viral y la producción de proteína recombinante excretada al medio resultó ser menor a lo esperado.

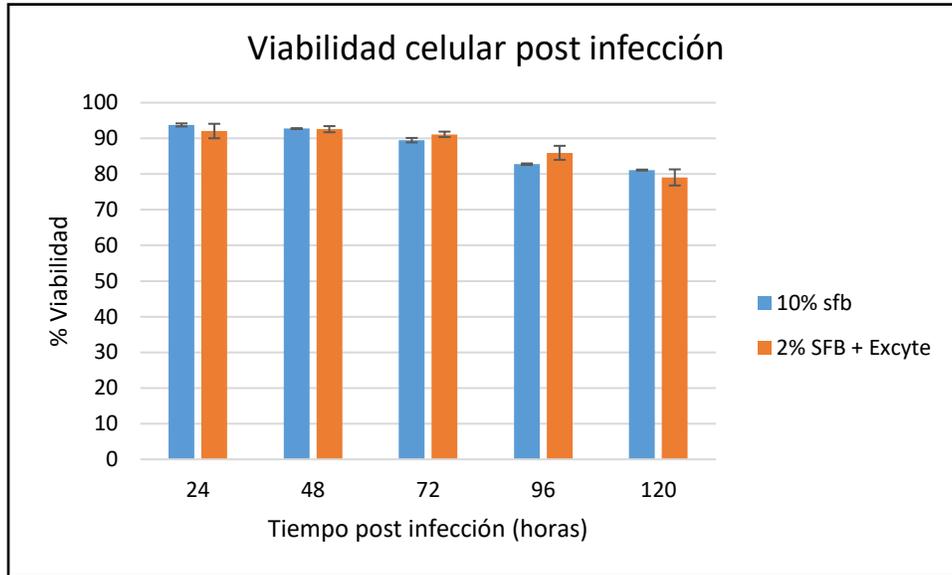


Figura 25 Viabilidad de cinética de infección de cultivos de células HEK293. Cultivo control a 10% SFB y cultivo a evaluar con 2% SFB + ExCyte + 1 X de ITS y 0.6 % de albúmina. Las barras de error representan el error estándar de las réplicas (n=2).

## 9.5 Consumo metabólico de HEK293 en infecciones con Ad5/IFN- $\gamma$ .

La replicación viral induce cambios en la fisiología celular y en el metabolismo, por ello la célula trabaja más de lo normal con la posibilidad de necesitar mayor energía.

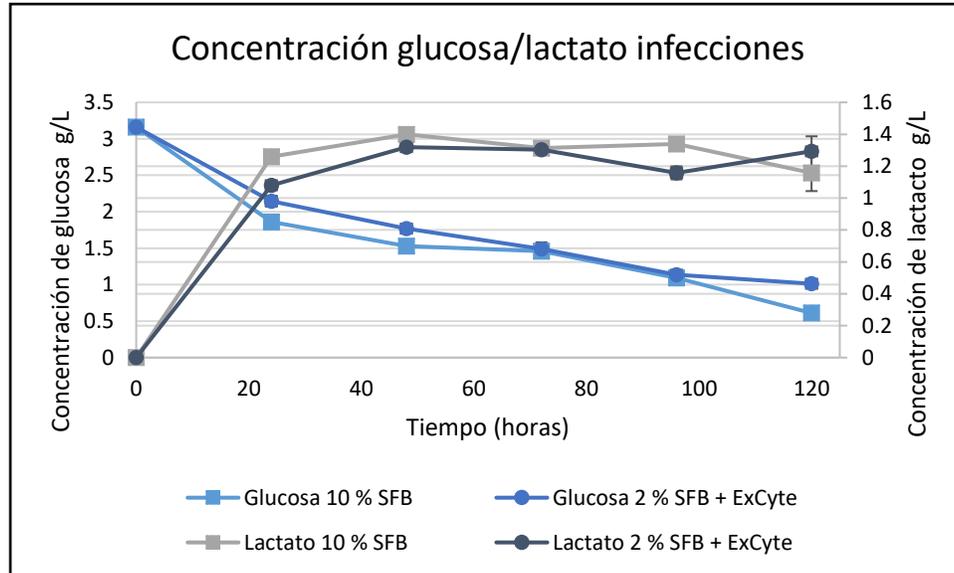


Figura 26 Concentración de glucosas y lactato en infecciones de cultivos de células HEK293 a 10% de SFB y a 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina. Se muestra el promedio de tres lecturas de dos replicas biológicas (n=2). Las barras representan el error estándar de las réplicas.

El consumo de glucosa durante las infecciones de los cultivos de HEK293 a 10% de SFB y a 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina tienen un comportamiento estable respecto al tiempo al igual que la producción de lactato (Figura 26). El cultivo a 2% SFB obtuvo una concentración final de glucosa de 1.01 g/L mayor en comparación del cultivo a 10% SFB de 0.61 g/L, de igual manera el cultivo a 10% de SFB presentó la velocidad específica de consumo de glucosa más alta  $3.23 \times 10^{-11}$  g/cel $\cdot$ h (Tabla 13). El cultivo a 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina obtuvo la mayor concentración de lactato con 1.29 g/L mientras que el cultivo a 10% de SFB fue de 1.15 g/L. De acuerdo con los resultados de rendimiento, el cultivo a 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina presentó una velocidad de producción específica de lactato

de  $2.75 \times 10^{-11}$  g/cel\*h siendo ligeramente mayor a la presentada por el cultivo a 10% de SFB de  $2.71 \times 10^{-11}$  g/cel\*h (Tabla 13). Mientras que el cultivo a 10% de SFB exhibió un mayor rendimiento de aprovechamiento de glucosa para generar lactato ( $Y_{Lac/Glu}$ ) en comparación del cultivo con la disminución de SFB (ver Tabla 13). De acuerdo con los parámetros obtenidos en cuanto a producción de glutamato, se infiere que el incremento aparente en la concentración de lactato del cultivo a 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina también puede deberse a una producción de lactato por medio de la oxidación de la glutamina durante la glutaminólisis y no sólo debido al metabolismo de la glucosa (Butler & Butler, 2004).

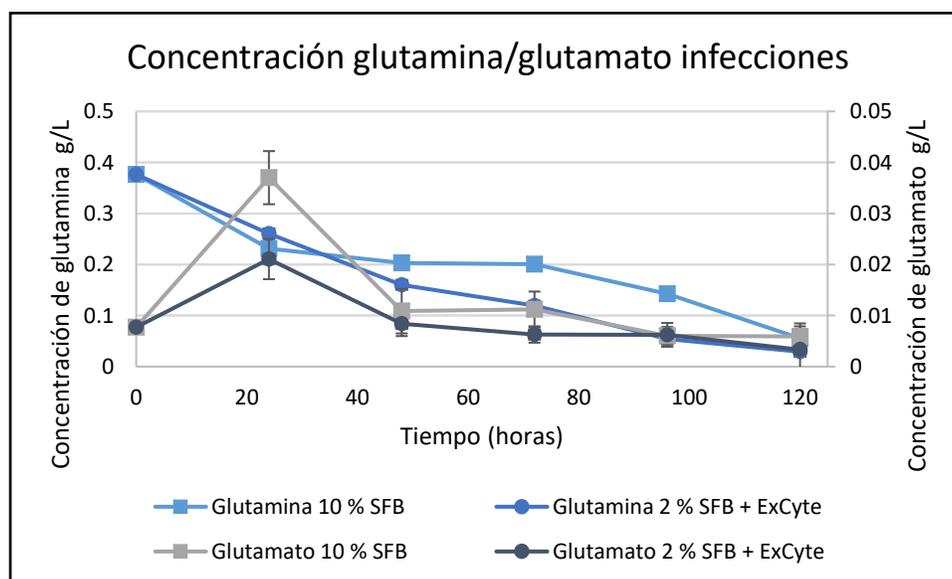


Figura 27 Concentración de glutamina y glutamato en infecciones de cultivos de células HEK293 a 10 % de SFB y a 2 % de SFB + ExCyte/ITS/albúmina. Se muestra el promedio de tres lecturas de dos replicas biológicas (n=2). Las barras representan el error estándar de las réplicas.

Por otra parte, el consumo de glutamina y glutamato dentro de los cultivos disminuyó conforme al tiempo. La concentración de glutamina residual fue de 0.055 g/L para el cultivo a 10% de SFB y de 0.030 g/L para el cultivo con la disminución de 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina (Figura 27). El cultivo a 10% presentó una velocidad de consumo de glutamina de  $3.27 \times 10^{-12}$  g/cel\*h siendo ligeramente menor a la presentada en el cultivo con la disminución de SFB la cual fue de  $4.37 \times 10^{-12}$  g/cel\*h

(Tabla 13). Por otra parte, el cultivo que presentó la menor concentración de glutamato fue el cultivo a 10% de SFB con 0.0026 g/L en contraste del cultivo a 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina con 0.0033 g/L, de igual manera fue el cultivo a 10% de SFB el que presentó el mayor consumo de glutamato con valor de  $9.36 \times 10^{-13}$  g/cel\*h mientras que el cultivo a disminución de SFB presentó un consumo de  $3.49 \times 10^{-13}$  g/cel\*h (Tabla 13). El cultivo a 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina obtuvo un mayor aprovechamiento de glutamato por glutamina consumida ( $Y_{\text{Glut/Glun}}$ ) con un valor de 0.080 (g/g). En todos los casos, no se observó ningún nutriente limitante en el proceso infectivo durante las 120 h.

*Tabla 13 Comparación de parámetros de consumo de nutrientes y formación de lactato y glutamato en cultivos infectados con Ad5/IFN- $\gamma$  de HEK293 a 10% de SFB y 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina en medio DMEM-F12.*

<b>Parámetros metabólicos</b>		
<b>Parámetro</b>	<b>10% SFB</b>	<b>2% SFB + ExCyte</b>
qGlucosa (g/cel*h)	3.23E-11	2.98E-11
qLactato (g/cel*h)	2.71E-11	2.75E-11
YLac/Gluc	0.838	0.921
qGlutamina (g/cel*h)	3.27E-12	4.37E-12
qGlutamato (g/cel*h)	9.36E-13	3.49E-13
YGlut/Glun	0.286	0.080

## **9.6 Producción de vectores adenovirales.**

Para conocer el número de partículas virales infectivas (PVI/mL) se realizó el protocolo descrito en el apartado 8.15 para la técnica de End Point Dilution a 120 h post infección en placas de 96 pozos sembradas con HEK293 para las condiciones de cultivo con 10% de SFB y con 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina.

Se monitoreó la monocapa celular y al término de 7 días post infección bajo el microscopio se marcaron aquellos pozos en donde el efecto citopático producido

por el vector Ad5/IFN- $\gamma$  fuera visible. En la Figura 28 se muestran ejemplos de las monocapas celulares a microscopio después de la infección y a cada dilución.

Los títulos virales obtenidos a las 120 h se muestran en la Figura 29 donde el título obtenido en el cultivo control fue de  $6.04 \times 10^7$  PVI/mL y el cultivo a 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina presentó un título menor de  $4.32 \times 10^7$  PVI/mL. A pesar de esto y de acuerdo con el apartado 10.4.2 la densidad celular es mayor en cultivos de 10% de SFB y por ende el número de células que son infectadas es mayor a comparación del cultivo a 2% SFB y ExCyte.

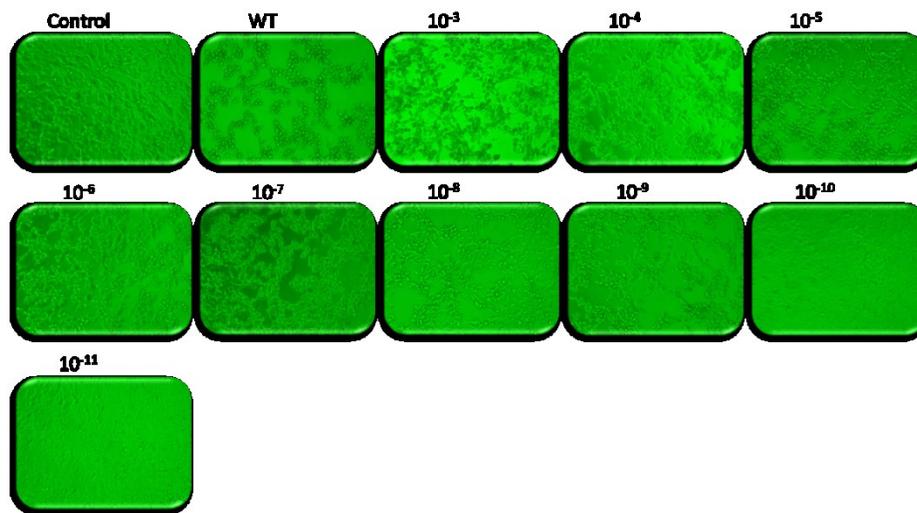


Figura 28 Determinación del número de partículas virales infectivas de cultivos al 10% SFB y 2% SFB + ExCyte/ITS/Albúmina a 120 h. Las fotografías muestran la morfología de células HEK293 a 7 días después de infección a distintas diluciones del virus; el control negativo son células HEK293 sin infectar; como control positivo de infección se usó el virus Wild type (WT). Se realizaron diluciones seriadas de  $10^{-3}$  a  $10^{-11}$

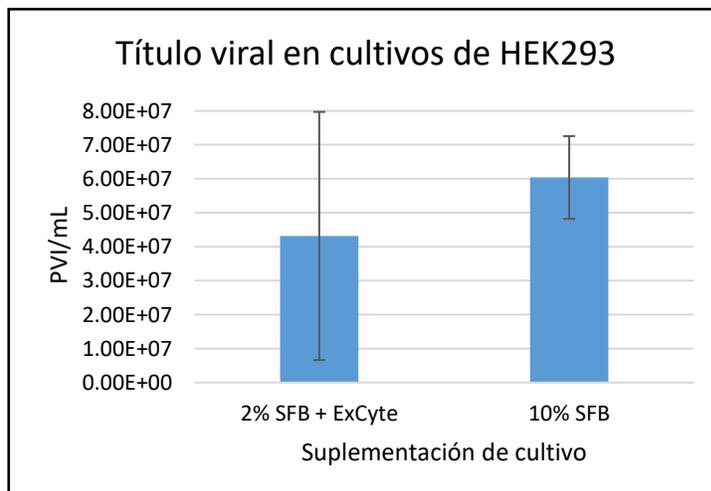


Figura 29 Título viral de cultivos HEK293. Los títulos virales fueron determinados por la técnica End point dilution a 120 h post infección. Las barras representan el error estándar de las réplicas (n=2).

## 9.7 Detección y producción de interferón gamma.

Una vez observado el efecto del virus en las infecciones de los cultivos, el siguiente paso fue asegurar que efectivamente el gen del IFN- $\gamma$  se estuviera transcribiendo y por ende la proteína se estuviera produciendo, por lo que se realizó la detección de la producción de interferón gamma humano a los tiempos a 72 h y 120 h post infección.

### 9.7.1 RT-PCR de células HEK293 infectadas con Ad5/IFN- $\gamma$ .

Para afirmar que el gen de IFN- $\gamma$  se estaba transcribiendo en los cultivos infectados, se realizó la medición de los de los mensajeros (mARN), identificándolos mediante la técnica de rt-PCR en punto final empleando el ARN extraído de los pellets celulares infectados.

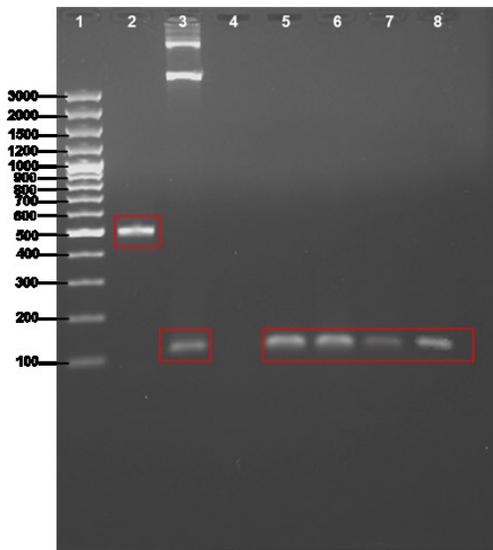


Figura 30 Identificación de los mARN de IFN- $\gamma$  en cultivos infectados a 10 % de SFB y 2 % SFB + ExCyte a 72 y 120 h post infección. Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa (80 Voltz, 150 mA por 1 h), en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (O'GeneRuler 100 pb ADN Ladder Plus), carril 2 control positivo de reacción de RT-PCR (gen GAPDH 496 pb), carril 3 control positivo del gen IFN- $\gamma$  (pVAX/ IFN- $\gamma$ ), carril 4 control negativo (células HEK293 sin infectar), carriles 5 y 6 cultivos HEK293 2 % SFB + ExCyte a 72 y 120 h post infección, carriles 7 y 8 cultivos HEK293 10 % SFB a 72 y 120 h post infección. A 120 pb se demuestra la banda correspondiente al mARN de IFN- $\gamma$ .

En la Figura 30 se muestra la detección de los transcritos para la proteína de IFN- $\gamma$  y acorde a lo presentado en la tesis de maestría por Nadia Romero (2014), en la región correspondiente a los 120 pb se observa la presencia de los mARN para la proteína en los carriles 5 a 8 pertenecientes a los cultivos infectados con vector Ad5/IFN- $\gamma$ ; en el carril 3 se encuentra el control positivo en donde se observan unas bandas debido a la presencia del plásmido que contiene el gen de IFN- $\gamma$ ; para aseverar que la reacción de retro transcripción y PCR se llevó adecuadamente el gen de control GAPDH con un peso de 496 pb es empleado en la reacción y observado en el carril 2. Además; como control para garantizar que los cultivos de células HEK293 no producen por sí mismas los mensajeros para este gene, en el carril 4 se muestra el resultado de células sin infectar, por lo que no presenta una señal de banda garantizando que la expresión del IFN- $\gamma$  es debido a la transducción de vector Ad5/IFN- $\gamma$ .

### **9.7.2 Detección de la producción de la proteína IFN- $\gamma$ por WB.**

Ya que se garantizó la transducción del vector Ad5/IFN- $\gamma$  y que realmente los cultivos de HEK293 en las distintas suplementaciones con 10% de SFB y 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina transcribían el gen para la producción de la proteína, se realizó su detección mediante un Western Blot en condición desnaturizante y reductora.

De acuerdo con la Figura 31, en el sobrenadante obtenido de los cultivos infectados con el Ad5/IFN- $\gamma$  (M1, M2, M3 Y M4) se identificó la proteína interferón gamma glicosilado dentro un peso aproximado de 25 kDa. Esto corrobora la producción del IFN- $\gamma$  por el vector construido por Nadia Romero (2014); en el carril C+ con el interferón de referencia se distinguen dos formas, una banda en el rango de los 25 kDa y otra banda en el rango de los 15-16 kDa, cabe resaltar que es un estándar proveniente de bacteria en forma de monómero.

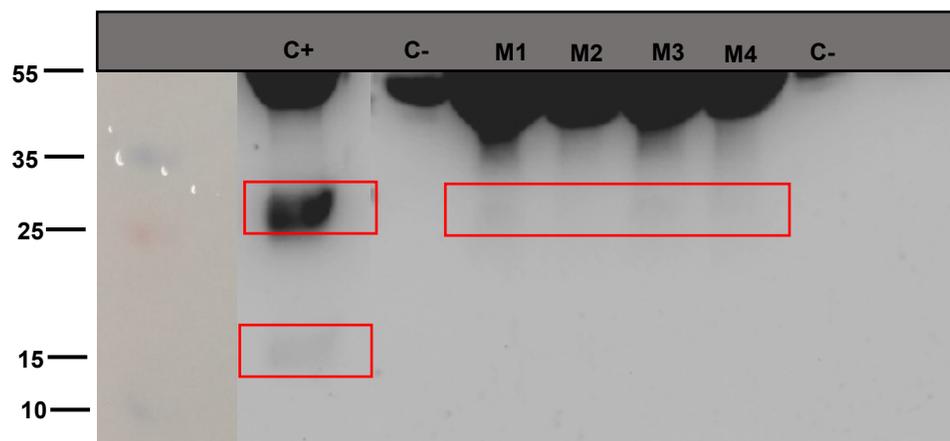


Figura 31 Western Blot de sobrenadante de células infectadas con Ad5/IFN- $\gamma$ . MP: Marcador de peso molecular (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder), C+: control positivo IFN- $\gamma$  de referencia (affymetrix eBioscience), sobrenadante de células sin infectar como controles negativos (C-), carriles M1 y M2 cultivos HEK293 2 % SFB + ExCyte a 72 y 120 h post infección, carriles M3 y M4 cultivos HEK293 10 % SFB a 72 y 120 h post infección.

## 10 Discusión.

El cultivo de células animales es uno de los sistemas más empleados dentro del sector farmacéutico, para el diseño de una gran variedad ensayos *in vitro* que permiten el estudio del comportamiento de nuevas moléculas terapéuticas, la inocuidad de los excipientes para la fabricación de un medicamento, la evaluación en la interacción celular de nuevos materiales para uso en medicina y para la producción de diversas vacunas y biofármacos (en su mayoría proteínas recombinantes) (Amelian et al., 2017; Eskes et al., 2017). En la industria farmacéutica, las líneas celulares animales como: CHO, BHK, NS0, SP2/0, HEK293, HT-1080 y en menor caso PER.C6 son las más usados para la producción de proteínas recombinantes, con productos ya en el mercado y otros estando en desarrollo clínico en fase 1 (Kantardjieff & Zhou, 2014; Dumont et al., 2016).

El medio de cultivo es de suma importancia para la proliferación, mantenimiento y correcto funcionamiento celular en condiciones *in vitro*; teniendo un gran impacto en la calidad y en el rendimiento del cultivo de células animales. Desde su desarrollo inicial hasta el día de hoy, el medio de cultivo ha tenido varias mejoras ofreciendo una amplia variedad y propiedades específicas que permiten el crecimiento celular de casi todo tipo de células. Uno de los aditivos más empleados para la suplementación del medio de cultivo es el suero fetal bovino (SFB), el cual brinda de una gran cantidad de moléculas que promueven la proliferación celular, sin embargo, la diversidad en calidad (dependiente del lote), precio (la demanda es mayor a la oferta), seguridad (por su origen animal y el riesgo de contaminación de moléculas perjudiciales para el humano), conflictos éticos por la forma de obtención, entre otras, son las razones por las que se ha decidido optar por otra opción. Por ello, han sido desarrollados y probados diversos aditivos para suplementar el medio basal que puedan conferir los mismos beneficios del SFB, sin embargo, aún no se encuentra uno que pueda reemplazarlo completamente (Gstraunthaler et al., 2013; Hemeda et al., 2014; Yao & Asayama, 2017).

Con base en los argumentos anteriores, el objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento del cultivo de células HEK293 empleando el suplemento ExCyte. Debido a las características del ExCyte reportadas en la sección 3.4.2, el suplemento ayuda al cultivo celular, promoviendo el crecimiento y ayudando en la producción de proteínas recombinantes. Además de permitir la reducción de la concentración de SFB, bajando los costos en formulación del medio manteniendo la calidad del mismo. Se seleccionó la línea celular HEK293 debido a sus características como sistema productor transitorio, además de ser una propuesta como plataforma de producción de interferón gamma como proteína recombinante. Con la construcción molecular del vector Ad5/IFN- $\gamma$  por Nadia Romero (2014) y posteriormente a los resultados reportados por Concepción Sosa (2018) en donde una infección a MOI 5 del vector Ad5/IFN- $\gamma$  y a una densidad celular de  $0.6 \times 10^6$  CV/mL de HEK293 la producción de proteína fue mayor a 120 h; por lo que, estos datos fueron tomados como base para evaluar el desempeño del suplemento ExCyte para la producción de vectores adenovirales y proteína recombinante.

Como parte de la evaluación de los cultivos suplementados se observó la morfología celular de las células HEK293 en cada condición (Figura 12) durante las 24 y 48 h de crecimiento. Los cultivos a 10% SFB, 10% SFB más suplemento ExCyte y 5% SFB más suplemento ExCyte presentaron la morfología característica de las HEK293 con forma estrellada e interconectadas unas con otras semejando a células neuronales creciendo en forma de monocapa sobre el sustrato. Los cultivos con disminución a 2 y 3% de SFB más ExCyte/ITS/albúmina presentaron una morfología estrellada, en algunos casos más ovalada y un poco alargadas. Se ha reportado el efecto en la morfología celular aunada a la disminución a 2% de SFB en medio DMEM-F12 en cultivos de células estromales adiposas por Chua (2013), en donde las células presentaron alargamiento aplanado celular y un volumen citoplásmico relativamente grande a comparación de los cultivos suplementados a 10% de SFB. El crecimiento sobre la superficie fue menor debido a que el tiempo de duplicación de ambos cultivos es mayor a los demás, por lo que se observan algunos espacios vacíos sobre el sustrato evitando la interacción célula-célula. Esta unión es llevada a cabo por moléculas de adhesión celular (CAMs por sus siglas en inglés)

permitiendo a través de esta interacción la comunicación celular, el intercambio de información y la proliferación celular, además de interconectarse junto a componentes de la matriz extracelular como colágeno, laminina, fibronectina (siendo éstas las responsables al anclaje al sustrato) favoreciendo la adhesión celular (Lodish et al., 2016).

Los cultivos a 10% SFB y ExCyte presentaron un comportamiento distinto a los demás, los parámetros cinéticos no fueron comparables con los cultivos a 10% de SFB ( $\mu$  0.0297 h<sup>-1</sup> y un Td de 23.3 h) y el porcentaje de viabilidad encontrado fue del 92%, la densidad celular máxima alcanzada en el cultivo fue 67.36 % menos que los controles. La acumulación de metabolitos tóxicos (producción de lactato) no llegó a una concentración significativa como para afectar el crecimiento celular, sin embargo, presentó el mayor consumo específico de glucosa, producción de lactato y consumo específico de glutamina entre los cultivos evaluados. De acuerdo con los datos presentados, se infiere que el cultivo aún permanecía en un estado de adaptación, por lo que no se encontraban estables metabólicamente, y posiblemente los pases realizados para la adaptación no fueron suficientes.

Los cultivos a 5% de SFB y ExCyte presentaron una  $\mu$  0.027 h<sup>-1</sup> y un tiempo de duplicación de 25.6 h. A pesar de tener una disminución del 17.7% de CV/mL respecto a los controles, el porcentaje de viabilidad fue el más alto de entre todos los cultivos. De acuerdo a lo reportado por Tavira-Montalván (2014) quien analizó los parámetros cinéticos, los cultivos de HEK293 a 5% de SFB tuvieron una  $\mu$  y Td de 0.014 h<sup>-1</sup> y 49.51 h, por lo que en este trabajo, el cultivo de HEK293 a 5% SFB y suplemento ExCyte demuestra una eficiencia en el crecimiento celular en contraste de una disminución a 5% de SFB sin suplementar. Metabólicamente hablando, se obtuvo un consumo específico de glucosa y de glutamina más bajo, sin embargo, el aprovechamiento de glucosa para generar lactato ( $Y_{Lac/Gluc}$ ) fue el mayor. Algunos estudios han utilizado 5% de SFB como la concentración óptima para mejorar el crecimiento celular y mediante la adición suplemento celular CB5 (cell boost 5 por sus siglas en inglés) lograron una mejor eficiencia para la producción de partículas virales (Liste-Calleja et al., 2014). Entre los cultivos evaluados, el suplementado a

5% de SFB + ExCyte parece ser la suplementación que mejor se adapta para el mantenimiento celular sin hacer un gran sacrificio en cuanto a densidad celular.

Los tiempos de duplicación de los cultivos a 2% y 3% de SFB más ExCyte/ITS/albúmina fueron de 49.5 y 46.8 h, por lo que el crecimiento es más lento a lo presentado en los controles con un  $t_d$  de 20.4 h. La densidad celular fue menor a los cultivos de 5% de SFB más ExCyte y al control, sin embargo, el porcentaje de viabilidad celular presentada en ambos cultivos fue del 93% casi la misma a un cultivo con suplementación al 10% SFB. Ambos cultivos presentaron un comportamiento metabólico muy parecido (consumo de glucosa y producción de lactato) obteniendo los parámetros más bajos. Al presentar una disminución alta de SFB se empleó una suplementación extra para compensar el déficit nutricional como es el ITS y la albúmina tal y cómo lo recomienda la hoja de información del suplemento concordando a lo reportado para un cultivo en condiciones bajas en suero. El ITS es una mezcla de insulina, transferrina y selenio; cada uno cumple una función para el mantenimiento celular; la insulina ayuda en el transporte de glucosa y aminoácidos a la célula; la transferrina es una proteína acarreadora de hierro ayudando a la célula a mantener la homeostasis regulando la absorción de hierro; el selenio presentado comúnmente como selenito de sodio sirve como cofactor de enzimas dependientes de selenio, que catalizan el metabolismo y la renovación de glutatión. La albúmina es una proteína acarreadora de una variedad de sustancias incluyendo lípidos además de tener efecto neutralizador de toxinas y antioxidantes (Gstraunthaler, 2003; Yao & Asayama, 2017). La adición de estos suplementos se hace usualmente para tratar de reemplazar la carencia de SFB, generalmente en la formulación de medios libres de suero (Butler & Butler, 2004). Estos cultivos a pesar de haber alcanzado una disminución del 70 y 80 % de SFB y una disminución de la densidad celular cerca del 38 % respecto a la suplementación a 10% SFB del control, no demostraron una completa inhibición en el crecimiento por lo que cabe la posibilidad que el modelo se adapte en otro linaje celular.

Posteriormente, como parte de la evaluación de los cultivos de HEK293 suplementados con ExCyte, se realizó una infección con el vector Ad5/IFN- $\gamma$  a una

MOI de 5 en una densidad de  $0.6 \times 10^6$  CV/mL. En la búsqueda para la optimización en la producción de vectores adenovirales, primero se define y evalúa un medio para el crecimiento celular. Durante la fase de infección y cultivo de virus, la tasa de consumo específico de varios componentes del medio (como la glucosa y los aminoácidos) aumenta y debe tenerse en cuenta al definir la formulación del medio. (Altaras et al., 2005). Los parámetros obtenidos por Concepción-Sosa (2018) demostraron obtener una mayor cantidad del vector Ad5/IFN- $\gamma$  y una mayor concentración de IFN- $\gamma$ , por lo que sirvieron como base para evaluar si el suplemento ExCyte podría mejorar estos parámetros. Los resultados obtenidos usando la disminución más baja de SFB demuestran un panorama sobre la participación de ExCyte para el cultivo celular bajo la formulación de medio evaluada y para la obtención de vectores adenovirales y producción transitoria de proteína recombinante.

De acuerdo con las figuras 24 y 25, la infección con el vector Ad5/IFN- $\gamma$  fue exitosa tanto en los cultivos al 2% de SFB/ExCyte/ITS/albúmina, así como en los cultivos a 10% de SFB, presentando placas líticas y el agrupamiento en forma de racimo de uvas que es característico de una infección con adenovirus. Dentro la cinética de infección se observa que en ambos cultivos el crecimiento y el porcentaje de viabilidad no fue gravemente afectado, y la disminución de estos parámetros fue gradual conforme el tiempo de infección. La determinación de una MOI asegura que las células estén infectadas con un número adecuado de partículas virales para una máxima productividad del virus, debido a que las infecciones con adenovirus son bastante rápidas y líticas, una MOI alta puede ocasionar lisis celular rápida afectando el ciclo viral y por ende la disminución en la producción (Altaras et al., 2005). Se tiene reportado que el ciclo de producción del adenovirus, la replicación de ADN viral se lleva aproximadamente dentro 10–24 h post infección y el ensamblaje del virus y empaquetamiento ocurre aproximadamente entre las 20–48 h post infección (Altaras et al., 2005).

En cuanto al comportamiento metabólico que experimentaron los cultivos infectados con el vector Ad5/IFN- $\gamma$ , ambos cultivos (10% de SFB y 2% de SFB +

ExCyte/ITS/albúmina) presentaron un consumo de glucosa, glutamina, glutamato y producción de lactato muy parecidos. Ninguno de los cultivos presentó un completo consumo de glucosa, glutamina y glutamato, por lo que los nutrientes no fueron el factor limitante para la producción en el cultivo. La principal hipótesis que se tiene detrás del efecto de la densidad celular en un sistema productor es que el agotamiento de nutrientes y la acumulación de metabolitos dificulta el metabolismo celular y los hace incapaces de soportar la producción viral a altas densidades celulares, por lo que para mejorar la productividad y la eliminación de metabolitos tóxicos, los sistemas de perfusión han sido de gran estudio (Silva et al., 2010). Los principales cambios encontrados de un cultivo sin infectar y uno infectado, fueron el incremento del consumo de glucosa y la producción de lactato, mientras que el consumo de glutamina y glutamato no presentaron grandes cambios. Una particularidad para destacar del comportamiento metabólico presentado en el experimento fue el cambio de las vías metabólicas para la obtención de subproductos, tal fue el caso del cultivo infectado a 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina, el cual se cree que obtuvo un incremento de la concentración de lactato sin ser glucosa la fuente principal de su obtención pudiendo ser responsable la glutamina debido a su oxidación durante la glutaminólisis, demostrando la importancia de monitorear los flujos metabólicos como estudio para el comportamiento celular.

La producción de partículas virales se cuantificó a 120 h post infección, el cultivo control tuvo una producción de  $6.04 \times 10^7$  PVI/mL siendo mayor en comparación al cultivo a 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina con  $4.32 \times 10^7$  PVI/mL sufriendo una disminución del 28.5%. En el caso control, el título viral no es parecido al presentado por Concepción Sosa (2018) por lo que esta variación en el título viral puede ser debido a una posible degradación del virus por las condiciones del medio o por la descongelación/congelación de los viales para recuperar la mayor cantidad de virus intra celulares (Altaras et al., 2005) siendo el caso de los viales a 120 h, en donde no se pudo realizar adecuadamente el último ciclo de congelación a  $-80$  °C debido a problemas con el ultra congelador y se congeló a  $-20$  °C. De igual manera se sugiere un especial cuidado de una posible agregación viral ligado a la estabilidad

del virus, debido a que pueden ser irreversibles y como consecuencia pérdida de la infectividad (Silva et al., 2010). De acuerdo a lo reportado, ExCyte tiene la capacidad de mejorar la producción de proteínas recombinantes, sin embargo, esto puede depender de la línea celular empleada (Zeghari et al., 1996) y no se tiene registro del desempeño de producción de proteína empleando un sistema transitorio como un vector adenoviral. La búsqueda para mejorar la producción de vectores adenovirales ha llevado a: la evaluación de distintos medios de cultivos (conocidos por mejorar la transfección en células HEK293) y distintas combinaciones de suplementaciones que puedan mejorar la producción (Liste-Calleja et al., 2014; Fang et al., 2016); el control de parámetros que influyen en la cantidad y la calidad de la producción viral (línea celular, infección viral, condiciones de crecimiento y tipo de producción), obteniendo mejores títulos virales de Ad5 a temperatura de 35° C para células en anclaje y 37° C para suspensión con una productividad significativa en cultivos a pH 7.2 (Silva et al., 2010; Altaras et al., 2005); así como el desarrollo de sistemas por perfusión que aumentan la productividad y la concentración a emplear (Kamen & Henry, 2004; Vellinga et al., 2014).

La producción del interferón gamma en los cultivos infectados se identificó exitosamente por medio de un RT-PCR. Se observó la presencia de los mRNA del IFN- $\gamma$  a 120 pb confirmando la transcripción para la producción de la proteína. De acuerdo con el Western Blot, se identificaron las bandas con un peso aproximado de 25 kDa, por lo que se sugiere que el IFN- $\gamma$  producido cuenta con glicosilaciones en las asparaginas 25 y 95 (en el carril control, la segunda banda en el rango de 15-16 kDa pertenece a un IFN- $\gamma$  sin ninguna glicosilación de acuerdo a la literatura) (Hooker & James, 1998; Mata-Espinosa & Hernández-Pando, 2008). La glicosilación juega un papel importante en la farmacocinética y la inmunogenicidad de un biofármaco, estos son afectados por los grupos glicanos añadidos durante los cambios postraduccionales de la proteína siendo dependientes del tipo de célula hospedera. Es por ello que la selección de la línea celular debe adecuarse al tipo de proteína a producir y garantizar la efectividad de la misma (Böhm et al., 2015; Goh & Ng, 2018; Lalonde & Durocher, 2017). Estudios demuestran el empleo de una construcción adenovirus/IFN- $\gamma$  vía intratumoral e intralesional como futura

herramienta en inmunoterapia (Dummer et al., 2004; Liu et al., 2004; Wu et al., 2009). De acuerdo con los resultados anteriores se demuestra que en cultivos de HEK293 infectados con el vector Ad5/IFN- $\gamma$  a 10% de SFB y 2% de SFB + ExCyte/ITS/albúmina producen IFN- $\gamma$  como proteína recombinante.

Si bien, una suplementación con ExCyte y una disminución de SFB no es equiparable a una suplementación a 10% de SFB, es un hecho que ayuda en el mantenimiento celular, permitiendo disminuir la cantidad de SFB empleado comúnmente y la probabilidad de nuevas suplementaciones para el cultivo de células HEK293 en medio DMEM-F12. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la respuesta al suplemento puede cambiar de acuerdo con el tipo celular, por lo que los resultados pueden variar y ser aún beneficiosos en otros cultivos celulares. A pesar de esto el suplemento puede ser una opción para el desarrollo o sustitución de SFB en diversos ensayos con células animales que pudiera mejorar las variaciones del ensayo al disminuir la cantidad de moléculas presentes en el medio por medio de la disminución de SFB en el medio de cultivo u obtener un modelo con una mejor reproducibilidad.

## **11 Conclusión.**

Los cultivos celulares de HEK293 a disminuciones de SFB y suplementación con ExCyte fueron: una baja no mayor al 38 % en la densidad celular y la variación de los parámetros cinéticos ( $\mu$  y Td) encontrados. Si bien, el efecto del suplemento ExCyte en el cultivo de HEK293 no mejoró el crecimiento celular, tampoco presentó inhibición total del crecimiento en los cultivos evaluados, permitiendo la posibilidad de disminuir la concentración de SFB para el cultivo de HEK293, sin elevar la producción de metabolitos tóxicos ni el consumo total de los nutrientes. En cuanto a producción, el suplemento es capaz de soportar el estrés que implica la producción viral y proteína recombinante, permitiendo la producción en cultivos celulares en la condición más crítica de disminución de 2 % de SFB + ExCyte.

### **11.1 Conclusiones particulares.**

Si bien no hay mejora en la concentración celular respecto al control, la viabilidad celular no se ve comprometida a cada disminución de SFB cuando se utiliza el suplemento ExCyte.

El número de pases de adaptación dentro del medio suplementado puede tener una relación en la respuesta del cultivo celular.

Medio de cultivo a 5% de SFB más ExCyte presenta las mejores condiciones de cultivo de HEK293 con sólo un decrecimiento del 17.17% de la densidad celular comparada al control.

Disminuciones a 2 y 3% de SFB suplementadas con ExCyte presentan un retraso en el tiempo de duplicación y disminución en la densidad celular, sin embargo el porcentaje de viabilidad es mayor a 90% y no hay inhibición completa en la proliferación celular.

El efecto del ExCyte en cultivos a 2% SFB infectados con Ad5/IFN- $\gamma$  permite una producción transitoria para la generación de vectores adenovirales y proteína recombinante.

## 12 Perspectivas.

- Estudio del cultivo de HEK293 en cultivo y producción utilizando medio libre de suero y suplemento ExCyte.
- Evaluar el efecto del suplemento ExCyte en cultivos en suspensión.
- Escalamiento de cultivos suplementados con ExCyte.
- Empleo de otro sustituto de SFB en cultivos de HEK293 con la finalidad de reducir costos de suplementación.
- Diseño de un método de purificación y caracterización de la proteína recombinante IFN- $\gamma$  producida por el vector Ad5/IFN-  $\gamma$ .

## 13 Referencias.

- Adan Gökbulu, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213–1221. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>
- Altaras, N. E., Aunins, J. G., Evans, R. K., Kamen, A., Konz, J. O., & Wolf, J. J. (2005). Production and formulation of adenovirus vectors. In Springer (Ed.), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 99, Issue November, pp. 193–260). [https://doi.org/10.1007/10\\_008](https://doi.org/10.1007/10_008)
- Amelian, A., Wasilewska, K., Megias, D., & Winnicka, K. (2017). Application of standard cell cultures and 3D in vitro tissue models as an effective tool in drug design and development. *Pharmacological Reports*, 69(5), 861–870. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.03.014>
- Arden, N., & Betenbaugh, M. J. (2004). Life and death in mammalian cell culture: Strategies for apoptosis inhibition. *Trends in Biotechnology*, 22(4), 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.02.004>
- Assanga, I., & Luján, L. (2013). Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*, 4(4), 60–70. <https://doi.org/10.5897/IJBMBR2013.0154>
- Bachman, J. (2013). Reverse-transcription PCR (RT-PCR). In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 530, pp. 67–74). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6>
- Baek, E., Kim, C. L., Park, J. H., & Lee, G. M. (2015). *Cell Engineering for Therapeutic Protein Production*. 565–590. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-10320-4>
- Baldi, L., Hacker, D. L., Adam, M., & Wurm, F. M. (2007). Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: State of the art and future perspectives. *Biotechnology Letters*, 29(5), 677–684. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9297-y>
- Blanche, F., Cameron, B., Barbot, A., Ferrero, L., Guillemin, T., Guyot, S., Somarriba, S., & Bisch, D. (2000). An improved anion-exchange HPLC method for the detection and purification of adenoviral particles. *Gene Ther*, 7(12), 1055–1062. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301190>
- Böhm, E., Seyfried, B. K., Dockal, M., Graninger, M., Hasslacher, M., Neurath, M., Konetschny, C., Matthiessen, P., Mitterer, A., & Scheiflinger, F. (2015). Differences in N-glycosylation of recombinant human coagulation factor VII derived from BHK, CHO, and HEK293 cells. *BMC Biotechnology*, 15(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0205-1>

- Bruner-tran, K. L., Eisenberg, E., Yeaman, G. R., Anderson, T. E. D. A., Bean, J. M. C., Osteen, K. G., & Health, R. (2002). Steroid and Cytokine Regulation of Matrix Metalloproteinase Expression in Endometriosis and the Establishment of Experimental Endometriosis in Nude Mice. *Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(10), 4782–4791. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020418>
- Brunner, D., Appl, H., Pfaller, W., & Gstraunthaler, G. (2010). *Serum-free Cell Culture : The Serum-free Media Interactive Online Database*. December 2009, 53–62.
- Butler, M. (2005). *Animal cell cultures : recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals*. 283–291. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1980-8>
- Butler, M. (2015). Serum and Protein Free Media. In *Monitoring of Cell Culture* (pp. 223–236). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-10320-4>
- Butler, M., & Butler, M. (2004). Animal Cell Culture and Technology. In G. Bushell (Ed.), *Rotledge Taylor & Francis group, UK* (2nd ed). BIOS Scientific Publishers. <https://scholar.google.com.tr/citations?view>
- Butler, M., & Meneses-Acosta, A. (2012). Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. *Microbiol Bioechnol*, 96, 885–894. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4451-z>
- Chroboczek, H., Le, J., Rubinjll, B. Y., Yips, Y. K., & Naglersii, C. (1984). *Three Molecular Weight Forms of Natural Human Interferon- ? Revealed by Immunoprecipitation with Monoclonal Antibody \**. 259(7), 4301–4305.
- Chua, K. H., Raduan, F., Wan Safwani, W. K. Z., Manzor, N. F. M., Pinguan-Murphy, B., & Sathapan, S. (2013). Effects of serum reduction and VEGF supplementation on angiogenic potential of human adipose stromal cells in vitro. *Cell Proliferation*, 46, 300–311. <https://doi.org/10.1111/cpr.12029>
- Delenda, C., Chillon, M., Douar, A.-M., & Merten, O.-W. (2007). Cells for Gene therapy and vector Production. In R. Pörtner (Ed.), *Animal Cell Biotechnology* (second, Vol. 24, pp. 23–91). <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02458-1>
- Dummer, R., Hassel, J. C., Fellenberg, F., Eichmüller, S., Maier, T., Slos, P., Acres, B., Bleuzen, P., Bataille, V., Squiban, P., Burg, G., & Urosevic, M. (2004). Adenovirus-mediated intralesional interferon- $\gamma$  gene transfer induces tumor regressions in cutaneous lymphomas. *Blood*, 104(6), 1631–1638. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0360>
- Dumont, J., Ewart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. (2016). *Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing : history , status , and future perspectives*. 8551(6), 1110–1122. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266>
- Ertl, H. C. (2016). Viral vectors as vaccine carriers. *Current Opinion in Virology*, 21, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.06.001>

- Eskes, C., Boström, A., Bowe, G., Coecke, S., Hartung, T., Hendriks, G., Pamies, D., Piton, A., & Rovida, C. (2017). Good cell culture practices & in vitro toxicology. *Toxicology in Vitro*, *45*, 272–277. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.022>
- Fang, C., Jacob, D., Zhu, T., Bernier, A., Shao, Z., Yu, X., Patel, M., Lanthier, S., & Kamen, A. (2016). Optimization and scale-up of cell culture and purification processes for production of an adenovirus-vectored tuberculosis vaccine candidate. *Vaccine*, *34*(29), 3381–3387. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.090>
- Finley, L. W. S., & Thompson, C. B. (2015). The Metabolism of Cell Growth and Proliferation. In *The Molecular Basis of Cancer* (Fourth Ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4066-6.00013-5>
- Freshney, R. I. (2010). *Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications* (Blackwell Pub (Ed.); 6th ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Gálvez, J., Lecina, M., Solà, C., Cairó, J. J., & Gòdia, F. (2012). Optimization of HEK-293S cell cultures for the production of adenoviral vectors in bioreactors using on-line OUR measurements. *Journal of Biotechnology*, *157*(1), 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.11.007>
- Gerard, R. D., & Meidell, R. S. (1993). Adenovirus-mediated gene transfer. *Trends Cardiovasc Med*, *3*(5), 171–177. [https://doi.org/10.1016/1050-1738\(93\)90002-N](https://doi.org/10.1016/1050-1738(93)90002-N)
- Ginn, S. L., Alexander, I. E., & Edelstein, M. L. (2013). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *Gene Medicne*, *15*, 65–77. <https://doi.org/10.1002/jgm>
- Ginn, S. L., Amaya, A. K., Alexander, I. E., Edelstein, M. L., & Abedi, M. R. (2018). Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *Journal of Gene Medicine*, *20*(5), 1–16. <https://doi.org/10.1002/jgm.3015>
- Goh, J. B., & Ng, S. K. (2018). Impact of host cell line choice on glycan profile. *Critical Reviews in Biotechnology*, *38*(6), 851–867. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1416577>
- Graham, F., Smiley, J., Russell, W., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by D N A from Human Adenovirus Type 5. *General Virology*, *36*, 59–74. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>
- Gstraunthaler, G. (2003). Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum : Serum-free Cell Cuture. *Alternatives to Animal Experimentation*, *20*(4), 275–281.
- Gstraunthaler, G., Lindl, T., & Valk, J. Van Der. (2013). *A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media*. 791–793. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9633-8>
- Helms, H. C., Abbott, N. J., Burek, M., Cecchelli, R., Couraud, P., Deli, M. A.,

- Galla, H. J., Romero, I. A., Shusta, E. V, Stebbins, M. J., Vandenhaute, E., Weksler, B., & Brodin, B. (2016). In vitro models of the blood – brain barrier : An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 36(5), 862–890. <https://doi.org/10.1177/0271678X16630991>
- Hemeda, H., Giebel, B., & Wagner, W. (2014). Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. In *Cytotherapy* (Vol. 16, Issue 2, pp. 170–180). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.11.004>
- Henry, O., Dormond, E., Perrier, M., & Kamen, A. (2004). Insights into adenoviral vector production kinetics in acoustic filter-based perfusion cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(7), 765–774. <https://doi.org/10.1002/bit.20074>
- Hink, F. (1991). A serum-free medium for the culture of insect cells and production of recombinant proteins. *Tissue Culture Association*, 27(May), 397–401.
- Hooker, A., & James, D. (1998). The Glycosylation Heterogeneity of Recombinant Human IFN- $\gamma$ . *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 18, 287–295.
- Hossler, P., Khattak, S. F., & Jian-Li, Z. (2009). *Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture*. 19(9), 936–949. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp079>
- Jee Yon, K., Yeon-gu, K., & Gyun Min, L. (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins : current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93(3), 917–930. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3758-5>
- Jenkins, N; Castro, P; Menon, S.; Ison, A; Bull, A. (1994). Effect of lipid supplements on the production and glycosylation of recombinant interferon- “ $\gamma$ ” expressed in CHO cells. *Cytoechnology*, 15, 209–215.
- Jesus, M. De, & Wurm, F. M. (2011). European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(2), 184–188. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.01.005>
- Kafoury, R. M., Pryor, W. A., Squadrito, G. L., Salgo, M. G., Zou, X., & Friedman, M. (1999). Induction of Inflammatory Mediators in Human Airway Epithelial Cells by Lipid Ozonation Products. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160(26), 26–30.
- Kamen, A., & Henry, O. (2004). Development and optimization of an adenovirus production process †. *Gene Medicicne*, 6, 184–192. <https://doi.org/10.1002/jgm.503>
- Kantardjieff, A., & Zhou, W. (2014). Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 139, 1–

9. [https://doi.org/10.1007/10\\_2013\\_255](https://doi.org/10.1007/10_2013_255)
- Kretzmer, G. (2002). Industrial processes with animal cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(3), 135–142. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0991-y>
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.007>
- Lalonde, M. E., & Durocher, Y. (2017). Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *Journal of Biotechnology*, 251, 128–140. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.028>
- Lao, M., & Toth, D. (1997). *Effects of Ammonium and Lactate on Growth and Metabolism of a Recombinant Chinese Hamster Ovary Cell Culture*. 688–691.
- Lasaro, M. O., & Hildegund, C. E. (2009). New insights on adenovirus as vaccine vectors. *Molecular Therapy*, 17(8), 1333–1339. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.130>
- Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., Zhao, C., Wu, Y., Ho, S., Athiviraham, A., Lee, M. J., Moriatis, J., & Reid, R. R. (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes & Diseases*, 4, 43–63. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001>
- Legorreta-Herrera, M., Martínez-Flores, F., Sánchez-Hernández, F., & Zentella-Dehesa, A. (2012). Los Vectores Virales Y La Transgénesis. *Revista Especializada En Ciencias de La Salud*, 15(1), 5–14. <http://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2012/vre121a.pdf>
- Lieberman, M. M., Patterson, G. M. L., & Moore, R. E. (2001). In vitro bioassays for anticancer drug screening : effects of cell concentration and other assay parameters on growth inhibitory activity. *Cancer Letters*, 173(1), 21–29.
- Liebert, M. A. (2004). HIROYUKI MIZUGUCHI 1 and TAKAO HAYAKAWA 2. *Human Gene Therapy*, 1044(November), 1034–1044.
- Lim, Y., Wong, N. S. C., Lee, Y. Y., Ku, S. C. Y., Wong, D. C. F., & Yap, M. G. S. (2010). *Engineering mammalian cells in bioprocessing – current achievements and future perspectives*. 189, 175–189. <https://doi.org/10.1042/BA20090363>
- Lin, Y., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Roy, N. Van, Soete, A., Drmanac, R., Chen, J., Reumers, J., Moisse, M., Lambrechts, D., Peer, Y. Van De, Tavernier, J., & Callewaert, N. (2014). *Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations*. 11. <https://doi.org/10.1038/ncomms5767>
- Liste-Calleja, L. (2015). *Study and characterisation of human Hek293 cell line as a platform for recombinant protein production*. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA.

- Liste-Calleja, L., Lecina, M., & Cairó, J. J. (2014). HEK293 cell culture media study towards bioprocess optimization : Animal derived component free and animal derived component containing platforms. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *117*(4), 471–477. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.09.014>
- Liu, M., Acres, B., Balloul, J., Bizouarne, N., Paul, S., Slos, P., & Squiban, P. (2004). Gene-based vaccines and immunotherapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(suppl 2), 14567–14571. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404845101>
- Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Z. & D. (2016). *Molecular Cell Biology* (W. H. Freeman (Ed.); 8th ed.). MacMillan Learning.
- Louis, N., Evelegh, C., & Graham, F. L. (1997). *Cloning and Sequencing of the Cellular – Viral Junctions from the Human Adenovirus Type 5 Transformed 293 Cell Line*. *429*(233), 423–429.
- Lukashev, A. N., & Zamyatnin, A. A. (2016). Viral vectors for gene therapy: Current state and clinical perspectives. *Biochemistry (Moscow)*, *81*(7), 700–708. <https://doi.org/10.1134/S0006297916070063>
- Lynch, J. (1990). Part One - Basic Methodology. In H. A. Erlich (Ed.), *PCR Technology - Principles and Applications for DNA Amplification* (pp. 1–5). Stockton Press. <https://doi.org/10.1002/9783527628230.ch1>
- Masters, J. R. W. (2000). *Animal Cell Culture : A Practical Approach* (Oxford University press (Ed.); 3rd ed.).
- Mata-Espinosa, D. A., & Hernández-Pando, R. (2008). Interferón gamma : aspectos básicos , importancia clínica y usos terapéuticos. *Revista de Investigación Clínica*, *60*(5), 421–431.
- Millipore, M. (2015). Ex-CytE Growth Enhancement Media Supplement. In *Product Information* (p. 2).
- Mohammad, S., Haghparast, A., Kihara, T., & Miyake, J. (2015). Distinct mechanical behavior of HEK293 cells in adherent and suspended states. *PeerJ*, *3*(7), 1–13. <https://doi.org/10.7717/peerj.1131>
- Mojica-Henshaw, M. P., Jacobson, P. A. M., Morris, J., Kelley, L., Pierce, J. A. N., Boyer, M., & Reems, J. (2013). Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Journal of Cytotherapy*, *15*(12), 1458–1468. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.06.014>
- Mycoplasmes, L. (1993). Use of a serum substitute for the cultivation of certain Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, *17*(81), 293–295.
- Nallet, S., Fornelli, L., Schmitt, S., Parra, J., Baldi, L., Tsybin, Y. O., & Wurm, F. M. (2012). Glycan variability on a recombinant IgG antibody transiently produced in HEK- 293E cells. *New BIOTECHNOLOGY*, *29*(4), 471–476. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.02.003>

- Newsholme, P., Lima, M. M. R., Procopio, J., Pithon-Curi, T. C., Doi, S. Q., Bazotte, R. B., & Curi, R. (2003). Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(2), 153–163. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2003000200002>
- Orion, E., Wolf, R., & Matz, H. (2002). Interferons: Unapproved Uses, Dosages, or Indications. *Clinic InDermatology*, 20, 493–504.
- Oyeleye, O. O., Ogundeji, S. T., Ola, S. I., & Omitogun, O. G. (2016). Basics of animal cell culture: Foundation for modern science. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 11(2), 6–16. <https://doi.org/10.5897/BMBR2016.0261>
- Ozturk, S. S., & Hu, W. (Eds.). (2006). *Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1021/cen-v071n018.p046>
- Palm, W., & Thompson, C. B. (2017). Review Nutrient acquisition strategies of mammalian cells. *Nature Publishing Group*, 546(7657), 234–242. <https://doi.org/10.1038/nature22379>
- Palomares Laura A, Valdez-Cruz N, R. O. T. (2011). *Superando los retos del cultivo de células animales a través de la bioingeniería*. 385–399.
- Parekh, T. V, Gama, P., Wen, X., Demopoulos, R., Munger, J. S., Carcangiu, M., Reiss, M., & Gold, L. I. (2002). *Transforming Growth Factor beta Signaling Is Disabled Early in Human Endometrial Carcinogenesis Concomitant with Loss of Growth Inhibition*. 2778–2790.
- Pillon, N. J., Croze, M. L., Vella, R. E., Soulère, L., Lagarde, M., & Soulage, C. O. (2012). Nonenal ( 4-HNE ) Induces Insulin Resistance in Skeletal Muscle through Both Carbonyl and Oxidative Stress. *Endocrinology*, 153(5), 2099–2111. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1957>
- Price, P. J., Gregory, E. A., & Services, H. (1982). Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. *In Vitro*, 18(6).
- Quek, L., Dietmair, S., Krömer, J. O., & Nielsen, L. K. (2010). Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. *Metabolic Engineering*, 12, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.09.002>
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene*, 27(3), 493–497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
- Reglamento de insumos para la salud, 1 (2014).
- Román, R., Miret, J., Scalia, F., Casablanco, A., Lecina, M., & Cairó, J. J. (2016). Enhancing heterologous protein expression and secretion in HEK293 cells by means of combination of CMV promoter and IFN  $\gamma$  2 signal peptide. *Journal of Biotechnology*, 239, 57–60. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.005>

- Romero-Martínez, N. (2014). *Construcción y evaluación de vectores moleculares que expresen interferón gamma en células humanas como potencial tratamiento inmunoestimulador*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gillmore, L. K., Parrott, R. H., & Ward, T. G. (1953). Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. *Experimental Biology and Medicine*, 84(3), 570–573.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon- $\alpha$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(February), 163–189. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>
- Shirsat, N. P., English, N. J., & Glennon, B. (2015). Modelling of Mammalian Cell Cultures. In *Animal Cell Culture* (pp. 259–326). Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-10320-4>
- Silva, A. C., Peixoto, C., Lucas, T., Küppers, C., Cruz, P. E., Alves, P. M., & Kochanek, S. (2010). *Adenovirus Vector Production and Purification*. 437–455.
- Soret, B., Lee, H., Finley, E., Lee, S. C., & Vernon, R. G. (1999). Regulation of differentiation of sheep subcutaneous and abdominal preadipocytes in culture. *Journal of Endocrinology*, 161, 517–524.
- Sosa-García, C. (2018). *Optimización del sistema de expresión HEK293/AD5-IFN-gamma humano mediante el manejo de la densidad celular y la multiplicidad de infección*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Stoddart, M. J. (2011). Mammalian Cell Viability. In *Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 740, pp. 1–6). Springer Science+Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6>
- Suchanek, A. L., & Salati, L. M. (2015). Construction and evaluation of an adenoviral vector for the liver-specific expression of the serine/arginine-rich splicing factor, SRSF3. *Plasmid*, 82, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.07.004>
- Tavira-Montalván, C. A. (2014). *Caracterización de cultivos de células Hek293 estáticos, en suspensión y en medio libre de suero para producción de adenovirus*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Valk, J. Van Der, Brunner, D., Smet, K. De, Svenningsen, Å. F., Honegger, P., Knudsen, L. E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M. L., & Gstraunthaler, G. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*, 24(4), 1053–1063. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.016>
- Vellinga, J., Smith, J. P., Lipiec, A., Majhen, D., Lemckert, A., van Ooij, M., Ives, P., Yallop, C., Custers, J., & Havenga, M. (2014). Challenges in Manufacturing Adenoviral Vectors for Global Vaccine Product Deployment. *Human Gene*

- Therapy*, 25(4), 318–327. <https://doi.org/10.1089/hum.2014.007>
- Viswanathan, S., Srinivasan, P., & Prabhu, S. (2015). Adenoviruses in Gene Therapy- A Review. *Bioengineering and Bioscience*, 3(1), 1–5. <https://doi.org/10.13189/bb.2015.030101>
- Volpers, C., & Kochanek, S. (2004). Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *Gene Medicine*, 6, 164–171. <https://doi.org/10.1002/jgm.496>
- Walsh, G. (2007). *Pharmaceutical Biotechnology: Concepts and Applications* (Wiley (Ed.); ilustrada,).
- Wiley, J. (2019). *Vectors used in gene therapy 2019*. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, John Wiley & Sons. <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>
- Wolf, M. (2003). High Density Suspension Culture for Recombinant Protein Production from CHO cells. In *INTEGRA Biosciences*.
- Wu, J., Xiao, X., Jia, H., Chen, J., Zhu, Y., Zhao, P., Lin, H., & Huang, W. (2009). *Dynamic distribution and expression in vivo of the human interferon gamma gene delivered by adenoviral vector*. 7, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-55>
- Wurm, F. M. (2004). *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*. 22(11), 1393–1398. <https://doi.org/10.1038/nbt1026>
- Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(2), 99–117. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>
- Zeghari, N., Miccoli, L., Maugras, M., & Donner, M. (1996). Effects of lipid supplementation of culture media on cell growth, antibody production, membrane structure and dynamics in two hybridomas. *Journal of Biotechnology*, 48, 161–173.
- Zhang, C., & Zhou, D. (2016). Adenoviral vector-based strategies against infectious disease and cancer. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 12(8), 2064–2074. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1165908>
- Zhang, J. (2010). Mammalian cell culture for biopharmaceutical production. In R. H. Baltz, J. E. Davies, & A. L. Demain (Eds.), *Manual of industrial microbiology and biotechnology* (3rd ed., p. 784). American Society for Microbiology Press. <https://doi.org/10.1128/9781555816827>
- Zheng, W. E. N. L. I., Sierra-rivera, E., Luan, J., Osteen, K. G., Ong, D. E., Z, D. B. W. L., & Gynecology, E. S. R. (2000). Retinoic Acid Synthesis and Expression of Cellular Retinol-Binding Protein and Cellular Retinoic Acid- Binding Protein Type II Are Concurrent with Decidualization of Rat Uterine Stromal Cells \*. *Endocrine Society*, 141(2), 802–808.

## 14 Anexos.

### I. Preparación gel de agarosa.

Para el gel a 1.5% de agarosa empleado para la separación de fragmentos de ADN se realizó el siguiente procedimiento:

1. Pesar 0.375 g de agarosa y disolver en un matraz con 24.5 mL de buffer TBE 0-5X a una temperatura alrededor de 100 °C.
2. Una vez disuelta la agarosa y la solución se encuentre a una temperatura alrededor de 35 °C (calor tolerable al contacto con el antebrazo) añadir 1 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL) y homogenizar
3. Verter inmediatamente antes de empezar la gelificación sobre el soporte con el peine en la cámara de electroforesis (evitar la formación de burbujas en el gel) y esperar a que gelifique completamente.

**NOTA:** utilizar guantes y desechar apropiadamente la punta que tenido contacto con el bromuro de etidio. El matraz y el soporte que estuvieron en contacto con la solución del gel deberán ser de uso exclusivo para la preparación de geles con bromuro de etidio.

### II. Preparación de buffer TBE.

- **Buffer TBE concentración 10X**

Disolver 27 g de Tris base, 13.75 g de ácido bórico y 10 mL de EDTA 0.5 M a un aforo de 250 mL de agua tipo 1. El pH del buffer stock tendrá un pH aproximado de 8.3.

- **Buffer para electroforesis TBE concentración 0.5X**

Disolver 5 mL de buffer TBE 10X en 95 mL de agua tipo 1 por cada 100 mL de buffer para electroforesis.

### III. Soluciones para preparar gel de poliacrilamida para electroforesis (SDS-PAGE).

- **Lower buffer (1.5 M Tris + 0.4 % SDS).**

Disolver 18.17 g de Tris en 50 mL de agua tipo 1 y agregar 2 mL de SDS al 20 %.

Ajustar pH a 8.8 con HCl concentrado y aforar hasta 100 mL.

- **Upper buffer (0.5 M Tris + 0.4 % SDS).**  
Disolver 6.06 g de Tris en 50 mL de agua tipo 1 y agregar 2 mL de SDS al 20 %.  
Ajustar pH a 6.8 con HCl concentrado y aforar hasta 100 mL.
  - **Solución de acrilamida (Acrilamida 30 %: 0.8 % Bis- Acrilamida).**  
Disolver 49.5 g de acrilamida (BIO-RAD No. Cat. 161-0100) y 1.32 g de bis-acrilamida (BIO-RAD No. Cat. 161.0200) en un volumen final de 165 mL de agua tipo 1.
- NOTA:** Utilizar guantes, bata cerrada, cubre bocas y lentes de seguridad al manipular los reactivos debido a su alta toxicidad, de preferencia cubrir la zona de trabajo con papel destreza, al finalizar la preparación desechar adecuadamente el papel empleado y descontaminar la zona de trabajo.
- **Solución de persulfato de amonio.**  
Disolver 0.1 g de persulfato de amonio (BIO-RAD No. Cat. 161.0700) en 1 mL de agua tipo 1.

#### IV. Preparación de buffer y soluciones para Western Blot.

- **10X SDS running buffer TGS concentración 10X.**
  1. Disolver 30.3 g de Tris base, 144.4 g de glicina, 10 g de SDS en un volumen final de 1 L de agua tipo 1.
  2. Para preparar 1 L de SDS running buffer TGS concentración 1X, tomar 100 mL del concentrado 10X y diluir con 900 mL de agua tipo 1.
- **Buffer de transferencia 1X.**  
En 500 mL de agua tipo 1 disolver 28.8 g de glicina, 6.04 g de tris base y añadir 200 ml de metanol, llevar el aforo a un volumen final de 2 L.
- **Buffer TBS concentración 10X.**
  1. Disolver 24.23 g de Tris HCl, 80.06 g de NaCl en 800 mL de agua tipo 1, ajustar el pH de la solución a 7.6 y aforar hasta 1 L de buffer.
  2. Para preparar 1 L de buffer TBS concentración 1X, tomar 100 mL del concentrado 10X y diluir con 900 mL de agua tipo 1
- **TBST 1X.**  
Tomar 100 mL de TBS 10X, agregar 1 mL de Tween 20 y llevar el aforo hasta 1 L.



*Poster Presentation*

THIS DOCUMENT HEREBY CERTIFIES THAT THE POSTER:

**HEK293/Ad5 transient expression system: The role of ExCyte supplementation, multiplicity of infection and cell density on the production of recombinant protein and viral particles**

*By Concepción Sosa-García, Gustavo Rojas-Ortiz, and Angélica Meneses-Acosta*

WAS PRESENTED AT THE ISBIOTECH 9<sup>TH</sup> SPRING MEETING  
HELD MARCH 4-6, 2019 IN NORFOLK, VIRGINIA USA

Keith L. Carson, ChE, MBA  
Founder & Program Director



*“No he fracasado. He encontrado  
10 000 maneras que no  
funcionan”.*

Thomas A. Edison

En este lugar perdemos demasiado tiempo mirando hacia atrás. Camina hacia el futuro. Abriendo nuevas puertas y probando cosas nuevas, sé curioso... porque nuestra curiosidad siempre nos conduce por nuevos caminos.

Walt Disney