



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



Facultad
de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

FACULTAD DE FARMACIA

**OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA DE EXPRESIÓN
HEK 293/AD5-IFN γ HUMANO MEDIANTE EL
MANEJO DE LA DENSIDAD CELULAR Y LA
MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN FARMACIA**

PRESENTA LA

I.B.T. CONCEPCIÓN SOSA GARCÍA

CO-DIRECTORES DE TESIS

DRA. ANGÉLICA MENESES ACOSTA

DR. ANTONIO SERRATO PÉREZ

CUERNAVACA, MORELOS

FECHA: MAYO 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Facultad
de Farmacia
Compromiso al servicio de la salud

FACULTAD DE FARMACIA COORDINACIÓN DE POSGRADO

Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C.P. 62210
Tel. (01 777) 329 7089 y 329 7000 Ext. 3365



DISTINTIVO Empresa Incubadora
Gilberto Rincón Gallardo

Fecha: 12 de diciembre de 2017

Asunto: Dictamen a solicitud.

Medio de notificación: Impresa

Folio: FF/D/SAc/CIP/MF/136/2017

**IBT. CONCEPCIÓN SOSA GARCÍA
ESTUDIANTE AL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E**

Por este medio le informo que en sesión ordinaria del Consejo Interno de Posgrado celebrada el día 06 de diciembre de 2017, se analizó su solicitud de cambio de título y ratificación de jurado.

Una vez analizado el proyecto le informo que el CIP dictaminó ACEPTAR la solicitud antes mencionada, ratificando el jurado para evaluar la tesis: **“Optimización del sistema de expresión HEK293/Ad5Infy humano mediante el manejo de la densidad celular y la multiplicidad de infección”**

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

PRESIDENTE: Dra. Judith González Christen.

SECRETARIO: Dr. José Luis Montiel Hernández.

VOCAL 1: Dra. Irene Vergara Bahena.

VOCAL 2: Dr. Ramón González García Conde.

VOCAL 3. Dr. Oscar Peralta Zaragoza.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

**ATENTAMENTE
“POR UNA HUMANIDAD CULTA”**

**DR. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA
JEFATURA DE POSGRADO**



El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica (Laboratorio 7) de la Facultad de Farmacia en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), bajo la codirección de la Dra. Angélica Meneses Acosta y el Dr. Antonio Serrato Pérez (INER-SSA).

Se agradece el apoyo financiero otorgado por CONACyT CB-2015, 257408; y al apoyo CONACyT INFR-2014, por medio del proyecto 226271. Asimismo, se agradece al CONACyT por el otorgamiento de la beca 574588.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mi familia, a pesar de todo siempre estará conmigo, a mi Ma' Nene y a mi Alvarito, siempre viejitos y enojones.

A mi amigo y compañero: Marcus, siempre estuvo para apoyarme y también regañarme, para hacerme reír y llorar. Siempre para cuidar de mí.

A la Sra. Ángeles, por ser todo un ángel conmigo.

A los nuevos amigos: Lalo, Isa

A los viejos amigos: Lucero

Siempre con sus buenos consejos.

Y por qué no... al Sr. Kechimo, a mi Thorin y mi Guillermo, siempre tan guapos y cariñosos, nunca me dijeron una sola palabra, pero tan solo con su mirada se me llena de alegría el alma.

“A mi Loli, por siempre a ella”

Y ahora permanecen la fe, la esperanza y el amor, estos tres; pero el mayor de ellos es el amor. 1 Corintios 13.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los profesores que compartieron conmigo sus conocimientos y experiencia.

.

Agradezco a mis compañeros y amigos del laboratorio 7 de la Facultad de Farmacia: Carlos, Lalo, Lore, Abda, Yoa, Aarón, Gustavo, Mirna y Max, siempre recordaré los fines de semana que pasamos trabajando en el laboratorio.

Agradezco a la Dra. Judith González Christen, Dr. José Luis Montiel Hernández, Dra. Irene Vergara Bahena, Dr. Ramón González García Conde y Dr. Oscar Peralta Zaragoza, por su tiempo y conocimientos invertidos en esta tesis.

.

Agradezco a la Dra. Angélica Meneses y al Dr. Antonio Serrato por todo su apoyo, paciencia y confianza. Gracias por ayudarme y guiarme en esta gran aventura que fue el cultivo de células humanas, por adentrarme en el mundo maravilloso de los adenovirus y los biofármacos.

.

Recuerda mirar a las estrellas y no tus pies. Intenta dar sentido a lo que ves y pregúntate por lo que hace al universo existir. Sé curioso. Aunque la vida puede parecer difícil, siempre hay algo que puedes hacer y tener éxito. Lo importante es que no te rindas.

Stephen Hawking

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE TABLAS	IX
INDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE GRÁFICAS	XI
ABREVIATURAS	XII
1. RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XV
2. MARCO TEÓRICO	1
2.1 Las proteínas como productos del mercado farmacéutico	1
2.2 Biofármacos	1
2.2.1 Nomenclatura.....	1
2.2.2 Diferencias entre fármacos tradicionales y biotecnológicos.....	2
2.2.3 El papel de las autoridades regulatorias.....	3
2.2.4 Mercado.....	6
2.4 HEK 293	12
2.4.1 Vehículo para la producción de biofármacos.....	13
2.4.2 Metabolismo de HEK 293 en la producción de vectores virales y proteínas recombinantes.....	14
2.4.3 Expresión transitoria en HEK 293.....	15
2.5 Adenovirus	16
2.5.1 Estructura y organización del genoma del Adenovirus.....	16
2.5.2 Ciclo de replicación del adenovirus.....	19
2.5.3 Vectores adenovirales de primera generación.....	22
2.6 Mejoramiento de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes terapéuticas	23
2.6.1 Transducción.....	24
2.6.1.2 Transducción transitoria.....	25
2.6.3 Transducción estable.....	27
3. ANTECEDENTES	29
3.1 Densidad celular (DC)	29
3.2 Multiplicidad de infección (MOI)	32
3.3 Interferón gamma humano (IFN-γ)	35

4. JUSTIFICACIÓN.....	41
5. HIPÓTESIS.....	41
6. OBJETIVOS.....	41
6.1 Objetivo General.....	41
6.2 Objetivos específicos.....	42
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	43
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
8.1. Línea celular.....	44
8.2 Medios de cultivo.....	44
8.2.1. Medio de cultivo con suero fetal bovino.....	44
8.3 Cultivo y mantenimiento celular.....	45
8.3.1 Cultivo celular.....	45
8.3.2 Conteo celular mediante la técnica de exclusión con azul de tripano.....	46
8.3.3 Generación del banco celular HEK293.....	47
8.4 Cinéticas de crecimiento en cultivo estático de las células HEK293.....	48
8.4.1. Recolección de las muestras.....	48
8.5 Determinación del título viral.....	49
8.6 Cinéticas de infección.....	51
8.6.1 Procedimiento para montar las cinéticas de infección.....	51
8.6.2 Proceso de infección.....	52
8.7 Conteo celular de las cinéticas de infección.....	53
8.8 Cuantificación de metabolitos.....	53
8.9 Western Blot de IFN-γ de los sobrenadantes.....	54
8.9.1 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).....	55
8.9.2 Electrotransferencia en cámara húmeda.....	55
8.9.3 Incubación con anticuerpos.....	56
8.10 ELISA del IFN-γ.....	56
8.10.1 Procedimiento de ELISA IFN- γ	57
8.10.2 Cálculo de resultados.....	58
9. RESULTADOS.....	60
9.1 Morfología y cinética de crecimiento de la línea celular HEK293.....	60
9.1.1 Morfología de HEK293 en cultivos estáticos.....	60

9.1.2 <i>Cinética de Crecimiento</i>	60
9.2 <i>Determinación del título del stock adenoviral.</i>	62
9.3 <i>Cinéticas de Infección.</i>	63
9.3.1 <i>Efecto de la MOI y la DC sobre la viabilidad.</i>	63
9.3.2 <i>Evaluación del metabolismo celular en las cinéticas de infección.</i>	67
9.4 <i>Determinación del título viral a las 120 horas p.i.</i>	81
9.5 <i>Western Blot.</i>	82
9.6 <i>Cuantificación del IFNγ humano.</i>	83
10. <i>Discusión.</i>	85
11. <i>Conclusión.</i>	90
12. <i>Perspectivas.</i>	90
13. <i>Referencias</i>	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias entre medicamentos de síntesis química y de origen biotecnológico .	3
Tabla 2. Sistemas de expresión usados en la expresión de proteínas recombinantes de uso farmacéutico.	11
Tabla 3. Ventajas y Desventajas de HEK293 y CHO	12
Tabla 5. Proteínas Adenovirales. Localización y función	18
Tabla 6. Clasificación de los Métodos de transfección.	26
Tabla 7. Métodos para determinar la densidad celular.	31
Tabla 8. Métodos de cuantificación del virus. La tabla resume algunos de los métodos más comunes utilizados para la cuantificación del virus.	34
Tabla 9. Efecto del sistema de expresión sobre la producción de IFN- γ	39
Tabla 10. Guía para montar la placa de ELISA	57
Tabla 11. Rendimientos de la concentración celular viable obtenida a las 48 horas p.i.	64
Tabla 12. Consumo y producción específicos de glucosa, glutamina, lactato y glutamato, de la cinética de infección con densidad 0.6×10^6 cel/mL.	79
Tabla 13. Consumo y producción específicos de glucosa, glutamina, lactato y glutamato, de la cinética de infección con densidad 1×10^6 cel/mL.	80
Tabla 14. Consumo y producción específicos de glucosa, glutamina, lactato y glutamato, de la cinética de infección con densidad 1.5×10^6 cel/mL.	80

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. La industria biofarmacéutica mexicana en números.....	7
Figura 2. Mapa del sistema de CTI del sector Farmacéutico y Biofarmacéutico en Morelos	9
Figura 4. Representación esquemática de la estructura de adenovirus 5.	17
Figura 5. Ciclo infectivo del Adenovirus y vía de Replicación.	21
Figura 6. Estructura del genoma del adenovirus 5	22
Figura 7. Transfección Estable y Transitoria	28
Figura 8. Resumen de sistemas de expresión de Interferón gamma.	38
Figura 9. Morfología de cultivos estáticos de HEK293	60
Figura 10. End Point Dilution. Determinación del título viral del stock Ad5/IFNY	62
Figura 11. Variables dependientes e independientes de la matriz experimental.....	63
Figura 12. Western blot de los sobrenadantes obtenidos en las cinéticas de infección.....	83

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Cinética de crecimiento de la línea celular HEK293	61
Gráfica 2. Cinética de infección a densidad 0.6×10^6 cel/mL	64
Gráfica 3. Cinética de infección a densidad 1×10^6 cel/mL.....	65
Gráfica 4. Cinética de infección a densidad 1.5×10^6 cel/mL	66
Gráfica 5. Consumo de glucosa en la cinética de 0.6×10^6 cel/mL	67
Gráfica 6. Consumo de Glucosa en la cinética de 1×10^6 cel/mL.....	68
Gráfica 7. Consumo de glucosa en la cinética de 1.5×10^6 cel/mL	69
Gráfica 8. Consumo de glutamina en la cinética de 0.6×10^6 cel/mL.....	70
Gráfica 9. Consumo de Glutamina en la cinética de 1×10^6 cel/mL	71
Gráfica 10. Consumo de glucosa en la cinética de 1.5×10^6 cel/mL	72
Gráfica 11. Producción de lactato en la cinética de 0.6×10^6 cel/mL	73
Gráfica 12. Producción de Lactato en la cinética de 1×10^6 cel/mL	74
Gráfica 13. Producción de lactato en la cinética de 1.5×10^6 cel/mL	75
Gráfica 14. Producción de glutamato en la cinética de 0.6×10^6 cel/mL.....	76
Gráfica 15. Producción de glutamato en la cinética de 1×10^6 cel/mL.....	77
Gráfica 16. Producción de glutamato en la cinética de 1.5×10^6 cel/mL.....	78
Gráfica 17. Título viral obtenido en las cinéticas de infección a las 120 horas p.i	82
Gráfica 18. Producción de IFN a las 120 horas p.i	84

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
μ	Velocidad máxima de crecimiento
μl	Microlitros
μm	Micrómetros
A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico (ADN o DNA)
Ad5	Adenovirus tipo 5
Asn	Asparagina
ATCC	American Type Culture Collection
cel/mL	Células por mililitro
cm ²	Centímetro cuadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
CT26	Línea tumoral de carcinoma de color. Origen murino
DC	Densidad celular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FDA	Food and Drug Administration: Agencia de Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos
Fuc	Fucosa
g	Gramos
g/L	Gramos por litro
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
Hepa 1-6	Línea celular de hepatoma murino
HEPES	(Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico), hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid
HRP	Horseradish peroxidase, peroxidasa de rábano picante
IFN-γ	Interferón gamma
IL1	Interleucina-1 (o interleuquina 1)
Kb	Kilobase
KDa	KiloDaltons
Man	Manosa
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MOI	Multiplicity of infection, Multiplicidad de Infección
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
Neu5Ac	Ácido N-Acetilneuraminico
Neu5Gc	Ácido N-Glicolilneuraminico
PBS	Phosphate buffered saline: Solución salina reguladora de fosfatos
pH	Potencial Hidrogeno
pg/mL	Picogramos por litro
p.i.	Post infección
pvi/mL	Partículas virales infectivas por mililitro
qPCR	PCR cuantitativa
RNA	Ácido ribonucleico (ARN o RNA)
rpm	Revoluciones por minuto

TNF α	<i>Tumor necrosis factor</i> , factor de necrosis tumoral alfa
TD	Tiempo de duplicación
TCID 50	Median tissue culture infective dose, Dosis infectiva media de cultivo tisular
TBST	Tris Buffered Saline: solución amortiguadora de Tris
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
V	Voltio
WT	Wild type

1. RESUMEN.

Dado el éxito y la enorme demanda de las proteínas recombinantes terapéuticas, es necesario desarrollar en nuestro país nuevos sistemas de expresión y optimizar los existentes para aumentar, a un costo rentable, la cantidad y calidad de dichos medicamentos. En el caso de proteínas glicosiladas se ha utilizado mayoritariamente la línea celular CHO (Células de Ovario de Hámster chino), sin embargo, dicha línea tiene la desventaja de no glicosilar con el mismo patrón que el encontrado en las proteínas humanas. Las células HEK293, por ser humanas, expresan proteínas con el mismo patrón de glicosilación que su contraparte natural y son también un excelente sistema de expresión. La manipulación de parámetros básicos de cultivo celular como la densidad celular (DC) y la multiplicidad de infección (MOI) pueden contribuir de manera sencilla a optimizar dicho sistema de expresión. El objetivo del presente proyecto fue determinar el efecto de infectar los cultivos de HEK293 con tres diferentes densidades celulares (0.6 , 1.0 y 1.5×10^6 cel/mL) a tres diferentes MOI (0.1 , 1 y 5), utilizando el sistema de expresión HEK293/Ad5 y como proteína modelo IFN- γ . Se analizó el efecto sobre la producción de IFN- γ , el título viral producido, la proliferación celular así como el efecto sobre el consumo de las principales fuentes de carbono y energía (glucosa y glutamina) y la producción de metabolitos no deseados (lactato y glutamato). Una vez comparadas las productividades, estos resultados servirán de base para determinar si el costo beneficio del proceso por este sistema es adecuado para el análisis del patrón de glicosilación.

El mayor rendimiento de producción de vectores adenovirales recombinantes (8.76×10^8 pvi/mL), se obtuvo al infectar 0.6×10^6 cel/mL con una MOI de 5 . La productividad máxima de IFN- γ se obtuvo con la combinación de la densidad celular más baja (0.6×10^6 cel/mL) y la MOI más alta (5), bajo dichas condiciones y a las 120 horas post infección, la concentración máxima de proteína producida fue de 19.2 pg/mL. Así se identificaron las condiciones de infección que resultan en los mayores rendimientos de adenovirus infecciosos y de IFN- γ humano producidos por las células HEK293.

Se pudo determinar que la combinación de la densidad más baja utilizada (0.6×10^6 cel/mL) con la MOI más alta (5), y a las 120 horas post infección, son las condiciones que producen las mayores cantidades de IFN- γ y vectores adenovirales, en el sistema HEK293/Ad5- IFN- γ .

ABSTRACT.

Given the success and enormous demand for therapeutic recombinant proteins, is necessary to develop new expression systems in our country and optimize existing ones to increase, at a cost-effective, the quantity and quality of said drugs.

In the case of glycosylated proteins, the CHO cell line (Chinese Hamster Ovary Cells) has mostly been used, however, it has the disadvantage that does not glycosylate following the same pattern found in human proteins.

HEK293 cells (Human embryonic kidney 293), are from human origin, so they are able to express proteins with the same glycosylation pattern as their natural counterparts and are also an excellent expression system. Nevertheless, the main challenge is to get competitive productivities compared to CHO cells, so in this work, an analysis of different parameters was established to determine if it is possible to produce glycosylated gamma interferon in a dimeric form. The manipulation of basic cell culture parameters such as cell density (DC) and multiplicity of infection (MOI) can contribute in a simple way to optimize said expression system.

In this way, the objective of this project was to determine the effect of infecting HEK293 cultures at three different cell densities (0.6 , 1.0 and 1.5×10^6 cells / mL) with three different MOI (0.1 , 1 and 5), using the expression system HEK293/Ad5 and as protein model IFN- γ .

We analyzed the effect on the IFN- γ production, the produced viral title, the cell proliferation as well as the effect on the consumption of the main sources of carbon and energy (glucose and glutamine) and the production of unwanted metabolites (lactate and glutamate).

The highest production yield of recombinant adenoviral vectors (8.76×10^8 pvi/mL) was obtained by infecting 0.6×10^6 cells/mL with an MOI of 5 and the maximum productivity of IFN- γ was obtained with the combination of the lowest cell density (0.6×10^6 cel / mL) and the highest MOI (5), under these conditions and at 120 hours post infection, the maximum concentration of protein produced it was 19.2 pg/mL.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 Las proteínas como productos del mercado farmacéutico.

Las proteínas, los componentes básicos de la vida, son sintetizadas por todas las formas vivas como parte de su metabolismo natural y desempeñan un papel importante en la señalización celular, la respuesta inmune, la adhesión celular y el ciclo celular. Se producen comercialmente en industrias con la ayuda de la ingeniería genética y la ingeniería de proteínas, beneficiando a sectores importantes como la industria farmacéutica, la industria de enzimas y la industria agrícola. Los productos de estas industrias a su vez benefician los campos de la medicina, el diagnóstico, la alimentación, la nutrición, los detergentes, los textiles, el cuero, el papel, la pulpa, los polímeros y plásticos (Demain & Vaishnav, 2009).

Las proteínas recombinantes para uso farmacéutico o biofármacos son uno de los productos más prometedores de la biotecnología farmacéutica y están ganando una importancia creciente en la medicina, pues se espera que ayuden a curar enfermedades que todavía no son tratables.

2.2 Biofármacos.

2.2.1 Nomenclatura.

En las últimas dos décadas, términos como "*biofármacos*" y "*medicamentos biotecnológicos*" se han infiltrado en el vocabulario farmacéutico, y, aunque dichos términos a menudo se sobreponen tienen diferentes significados.

Los *Biofármacos* son el principio activo de un medicamento biotecnológico. Son compuestos terapéuticos producidos por técnicas de la biotecnología moderna, es decir por ingeniería genética, o por tecnología de hibridomas en el caso de anticuerpos monoclonales de acuerdo con la legislación mexicana. Un biofármaco también es definido como " Una sustancia farmacéutica a base de proteínas o ácidos nucleicos utilizada para fines de diagnóstico terapéutico o *in vivo*, que se produce por medios distintos de la extracción directa de una fuente biológica nativa" (Walsh, 2002) . De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-072-SSA1-2012, Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios, Biofármaco, es "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 las condiciones para ser empleada como principio activo de un medicamento biotecnológico”.

Mientras que los *Medicamentos Biotecnológicos* se definen como " aquellos productos que incluyen no solo macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, sino también células y tejidos completos; también definido como “ cualquier producto farmacéutico utilizado con fines de diagnóstico terapéutico o *in vivo*, que se produce total o parcialmente por medios biotecnológicos tradicionales o modernos” (Walsh, 2002).

Sin embargo, Artículo 222 Bis de la Ley General de Salud, considera que un medicamento biotecnológico es toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica, que se identifique como tal por su actividad farmacológica y propiedades físicas, químicas y biológicas. Los medicamentos biotecnológicos innovadores podrán ser referencia para los medicamentos biotecnológicos no innovadores, a los cuales se les denominará biocomparables. La Norma Oficial Mexicana NOM-072-SSA1-2012, Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios, Medicamento biotecnológico, es toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica, que se identifique como tal por su actividad farmacológica y propiedades físicas, químicas y biológicas.

2.2.2 Diferencias entre fármacos tradicionales y biotecnológicos.

La producción de fármacos de síntesis química implica el uso de disolventes orgánicos, altas temperaturas y presiones, a diferencia de la producción biofármacos donde se utilizan sistemas biológicos (bacterias, levaduras, células animales o humanas, virus, animales transgénicos o plantas). Las principales diferencias entre medicamentos de síntesis química y de origen biotecnológico se muestran en la tabla 1 (Geigert, 2013).

John Geigert Presidente de BioPharmaceutical Quality Solutions, y autor de “The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals and Other Biologics” dice que “Para que los sistemas vivos produzcan un producto biológico, el sistema de vida debe mantenerse vivo, debe ser feliz y debe ser saludable”.

Tabla 1. Diferencias entre medicamentos de síntesis química y de origen biotecnológico

Tipo de fármaco	Tradicionales	Biofármacos
Obtención	Síntesis química	Síntesis biológica
Proceso de producción	Controlado y pocos pasos críticos	Muchos pasos críticos
Estructura del compuesto	Simple, homogénea, bien caracterizada	Compleja, heterogénea
Peso molecular	Bajo (< 1 kDa)	Alto (> 50 kDa)
Riesgo de inmunogenicidad	Menor	Mayor

Tomado de: (Lybecker, 2016).

2.2.3 El papel de las autoridades regulatorias.

Actualmente la biotecnología farmacéutica ha tomado un mayor auge, lo que ha llevado a las autoridades mexicanas y en el mundo a tomar cartas en materia de la regulación.

2.2.3.1 Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration, FDA*).

La FDA representa a la autoridad reguladora estadounidense, cuyo objetivo es “proteger la salud pública”. Al cumplir esta función, regula muchos productos y artículos de consumo, como alimentos, suplementos nutricionales, fármacos: basados en síntesis química, biológicos y biofármacos; suministro de sangre y productos sanguíneos, cosméticos y artículos de tocador, dispositivos médicos, etc.; cuyo valor anual total se estima en 1 billón de dólares. El trabajo de la FDA implica inspeccionar y regular casi 100,000 establecimientos en los Estados Unidos (o aquellos en el exterior que exportan productos regulados para consumo estadounidense). Esta institución obtiene la mayoría de sus poderes legales de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (FD & C, por sus siglas en inglés). Esta legislación se promulgó originalmente en 1930, pero ha sido enmendada varias veces desde entonces.

La agencia interpreta y hace cumplir sus leyes por medio de publicaciones que incluyen: "Directrices escritas", "Cartas a la industria" y la Serie de documentos 'Puntos a considerar'.

Las principales actividades de aprobación y regulación de biofármacos se llevan a cabo principalmente por el Centro de Evaluación e Investigación de Medicamentos (CDER) y el Centro de Evaluación e Investigación de Biológicos (CBER) (Walsh, 2007).

2.2.3.2. Normativas Europeas.

En los últimos 10 a 15 años, todos los países integrantes de la Unión Europea han adoptado un conjunto sustancial de legislación farmacéutica armonizada. Esto ha facilitado la creación de un sistema común a escala europea para la autorización y supervisión posterior de medicamentos. Para ello, fue fundamental la creación de la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (European Medicines Evaluation Agency, EMEA). La EMEA, que comenzó a funcionar en febrero de 1995, se encarga de gestionar y coordinar el nuevo sistema de aprobación de medicamentos dentro de la Unión Europea. Este nuevo sistema de aprobación proporciona la evaluación de cualquier aplicación de comercialización de nuevos productos a través de una de dos rutas; una ruta "centralizada" obligatoria para todos los productos de la biotecnología y una ruta "descentralizada". Dentro de sus primeros tres años de funcionamiento, facilitó la concesión de 52 autorizaciones de comercialización en toda Europa, de las cuales 23 fueron productos de biotecnología. En general, la EMEA se ha ganado la confianza tanto de la industria farmacéutica europea como de las diversas autoridades reguladoras nacionales dentro de cada estado miembro de la UE (Walsh, 1995).

2.2.3.3. Registro de medicamentos en Japón.

Los japoneses son los mayores consumidores de productos farmacéuticos per cápita en el mundo. El Ministerio de Salud y Bienestar de Japón tiene la responsabilidad general de implementar la ley farmacéutica japonesa. Dentro del departamento se encuentra la Oficina de Asuntos Farmacéuticos (Pharmaceutical Affairs Bureau, PAB), que ejerce esta autoridad. Hay tres pasos básicos en el proceso regulatorio japonés:

La aprobación ('shonin') debe obtenerse para fabricar o importar un medicamento;

La obtención de una licencia ('kyoka'); y

El establecimiento de un precio oficial para el medicamento.

El PAB lleva a cabo evaluaciones de dossier (conjunto de informaciones recopilados sobre una persona o un asunto) de medicamentos, un proceso que normalmente lleva 18 meses.

Los requisitos y procesos de aprobación para productos farmacéuticos (incluidos los biofármacos) son, en términos generales, bastante similares a los de los Estados Unidos.

Además, los japoneses normalmente insisten en que al menos algunos ensayos clínicos se lleven a cabo en el propio Japón. Esta posición se adopta debido, a las diferencias en el

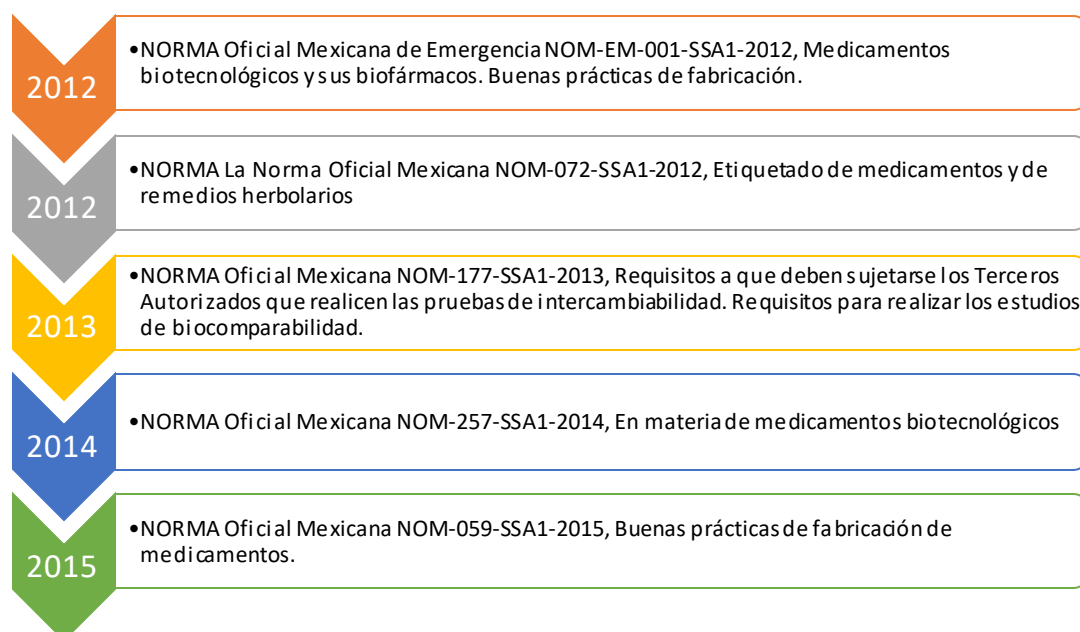
tamaño corporal y el metabolismo de los japoneses, en comparación con los ciudadanos estadounidenses y europeos. Además, la cantidad de ingrediente activo presente en las drogas japonesas es menor que en muchas otras regiones del mundo. Por lo tanto, se deben realizar ensayos para probar la eficacia del producto en las condiciones de uso previstas en Japón (Walsh, 2007).

2.2.3.4. Regulación en México.

El marco regulatorio sobre medicamentos biotecnológicos ha recorrido un largo camino en nuestro país. A finales de la década de 1990, se introdujeron algunas reformas legales con el fin de regular los medicamentos biotecnológicos innovadores, que para entonces ya tenían varios años en el mercado farmacéutico global.

En México se iniciaron formalmente, en 2007, diversos foros de discusión en el Congreso, los cuales generaron que en el 2009 se realizará una nueva reforma a la Ley General de Salud. Con dicha reforma se adicionó el artículo 222 bis, en el cual se establecieron las bases o principios generales del mercado de medicamentos biotecnológicos de entrada subsecuente en nuestro país, a los cuales la ley denominó biocomparables. En febrero de 2015, La Secretaría de Salud, a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), dio a conocer la entrada en vigor la reforma a la Norma Oficial Mexicana 257, con lo cual fueron aprobados para su uso en México los denominados medicamentos biotecnológicos de tercera generación (Silva, 2012).

Dentro del Marco Legal vigente en México se encuentran las siguientes normas:



2.2.4 Mercado.

2.2.4.1 Mercado Internacional

La empresa surcoreana Samsung es famosa por sus teléfonos, pero en 10 años podría serlo por sus biofármacos, la decisión de esta empresa quizá se deba a la proyección del mercado de los medicamentos biotecnológicos, pues según publicaciones de Bloomberg Businessweek (revista empresarial enfocada a las grandes empresas), este mercado podría superar los 223. 700 millones de dólares para el 2021.

La industrialización de las ciencias biomédicas se ha convertido en un componente importante de la economía global. En los Estados Unidos, el sector biofarmacéutico representa 854,000 empleos, \$ 150 mil millones de dólares en salarios, y el 3.8% de la producción total de este país en 2014. Sin embargo, el capital de inversión en esta industria ha aumentado y disminuido con el tiempo en respuesta a muchos factores, incluidos avances científicos preclínicos, datos de ensayos clínicos, cambios en la supervisión reguladora, reformas de la política de salud, fijación de precios y problemas de evaluación de tecnología sanitaria, y otros cambios en el entorno económico para el descubrimiento y desarrollo de fármacos (Thakor et al., 2017).

2.2.4.2 Mercado Nacional.

Hace casi una década, la empresa de servicios tecnológicos de salud IMS Health seleccionó 21 países que describió como “Farmaemergentes” – países en desarrollo con industrias farmacéuticas con importancia creciente, entre los cuales se encontraba México. Desde entonces, México ha crecido para convertirse en el segundo mercado farmacéutico en América Latina después de Brasil, y el número 11 a nivel global (Posma & Flores, 2015). En el 2017, México mantuvo el segundo lugar en el mercado de los biofármacos a nivel Latinoamérica después de Chile (Pugatch, 2017).

La necesidad de desarrollar nuevos productos y la presencia de un mercado local de tamaño relevante presenta una gran oportunidad de crecimiento para la industria biofarmacéutica de México (Figura 1).

México ha logrado crear la mayoría de las condiciones necesarias para desarrollar una industria farmacéutica fuerte, impulsada por la biotecnología. Sus ventajas naturales (posición geográfica y una población numerosa) se han combinado con un marco regulatorio sólido y buena infraestructura, lo que ha atraído un gran número de compañías

internacionales, así como inversionistas y colaboradores, lo que permite que el país esté bien posicionado para consolidarse como una potencia en la producción de biofármacos en los próximos cinco años (Fuentes & Salieri, 2016).

Algunas de las condiciones necesarias para poner a México en el camino hacia una mayor innovación biofarmacéutica ya se cumplen. Sin embargo, se necesitan más acciones para fortalecer al ecosistema de innovación, incluyendo incentivar la colaboración entre los sectores académico y privado, y aplicar las leyes de propiedad intelectual existentes (Papovich, 1997; Pugatch, 2017).

Un obstáculo significativo para el desarrollo de la industria biofarmacéutica es el complicado y largo proceso de aprobación de nuevos medicamentos. Es probable que los recortes al presupuesto público en salud vuelvan la penetración de medicamentos innovadores aún más lenta. En ese caso México podría permanecer como un país productor de medicinas de bajo valor agregado, o desarrollarse como un país generador de innovación. La segunda opción generaría crecimiento económico sostenido, empleos para personal altamente capacitado, y nuevas medicinas fabricadas a la medida de las necesidades específicas de los mexicanos. La mayoría de las piezas del rompecabezas están en su lugar –toca a la actual generación de servidores públicos completarlo (Fuentes & Salieri, 2016).



Figura 1. La industria biofarmacéutica mexicana en números

I+D: Investigación y desarrollo.

Hasta el 2015, 25 compañías biofarmacéuticas estaban operando en México, y se tiene previsto que para el 2025 se inviertan 500 millones de dólares en investigación y desarrollo, mientras que para el 2030 el 65% de los medicamentos serán de origen biológico. Tomado de: Fuentes & Salieri, 2016.

2.2.4.3 Mercado Estatal

El estado de Morelos tiene como una de sus áreas de especialización al sector farmacéutico y Biofarmacéutico.

De acuerdo a la información proporcionada en la Adenda de Innovación de Morelos – CONACYT, 2016/03, México es uno de los principales centros manufactureros a nivel internacional, en el país tienen presencia 14 de las 15 compañías más importantes del mundo. A nivel nacional, Morelos se sitúa en el cuarto lugar respecto al número de unidades económicas dedicadas a este sector, registrando un total de 28. En el 2012 el impacto del sector farmacéutico en el PIB (Producto Interno Bruto) nacional fue de 3.25% y de 11 % en el PIB estatal. La participación de éste en las actividades manufactureras en la entidad fue de 8.9%, para ocupar un tercer lugar. En lo que se refiere al IEL (índice de Especialización Local), este ámbito tiene un valor de 3.6. los empleos generados en este rubro fueron 2743.

En Morelos se cuenta con un amplio ecosistema de innovación en el sector farmacéutico y Biofarmacéutico: 9 empresas inscritas en el RENIECYT (Registro Nacional de Instituciones y Empresas Científicas y Tecnológicas), 9 CI (Centros e Institutos de Investigación públicos nacionales), 5 IES (Instituciones de Educación Superior públicas o privadas nacionales), 3 organismos intermedios y un parque tecnológico. Su temática principalmente gira en torno a productos químico – farmacéutico, (Figura 2).

Las condiciones de la industria farmacéutica en Morelos son favorables para la fabricación de materias primas y preparaciones farmacéuticas. Los puntos fuertes que respaldan al sector Farmacéutico y Biofarmacéutico en Morelos de acuerdo a (CONACYT, 2016) son:

1. La infraestructura actual en el estado de Morelos es adecuada para brindar impulso al sector
2. La posición actual del sector farmacéutico (cuarto lugar en cuanto al número de unidades económicas) representa un importante punto de partida.
3. El Gobierno del Estado tiene un gran interés en reactivar y apoyar este sector.

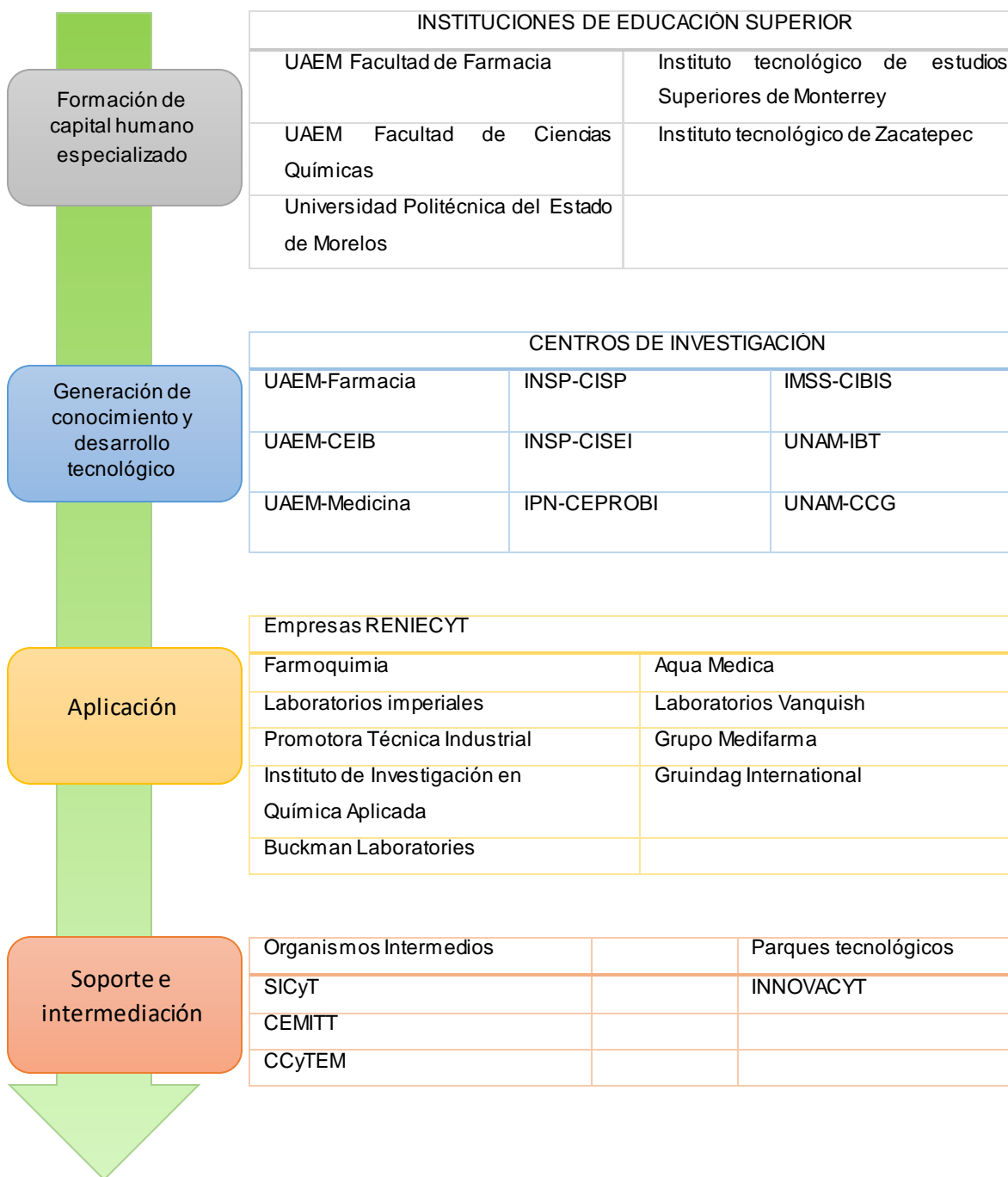


Figura 2. Mapa del sistema de CTI del sector Farmacéutico y Biofarmacéutico en Morelos

CTI: Ciencia, Tecnología e Innovación, CEIB: Centro de Investigación en Biotecnología, INSP: Instituto Nacional de Salud Pública, CISP: Centro de Investigación en Salud Poblacional, CEPROBI: Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, CIBIS: Centro de Investigación Biomédica del Sur, IBT: Instituto de Biotecnología, CCG: Centro de Ciencias Genómicas, SICyT: Secretaría de Innovación, Ciencia y Tecnología, CEMITT: Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Morelos, CCyTEM: Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Morelos, INNOVACYT: Parque Científico y Tecnológico Morelos. Fuente: Revista de Innovación de Morelos, Resumen ejecutivo, CONACYT, 2016/03.

2.3 Sistemas de expresión de proteínas recombinantes.

Biofármacos como anticuerpos, sustitutos de productos sanguíneos, vacunas, hormonas, citocinas y una gran variedad de otros agentes terapéuticos se expresan en sistemas biológicos, que van desde bacterias como *E. coli*, en la que se producen proteínas estructuralmente simples; hasta levaduras, células de insecto y mamífero, que producen proteínas con diversos niveles de complejidad estructural y funcional (Tabla 2) (Noguera & Fermin, 2013).

La producción de altas cantidades de proteína recombinante se realiza normalmente utilizando líneas celulares de expresión estable; sin embargo, la generación de estas líneas requiere de mucho tiempo, debido al largo proceso de selección de clonas, a menudo tomando hasta 12 meses (Wurm, 2004). Uno de los factores claves en la industria biofarmacéutica es el tiempo, por ello se ha recurrido a la expresión génica transitoria (TGE), la cual se ha convertido en una herramienta poderosa en la última década (Fliedl & Kaisermayer, 2011).

Existe una gama de diferentes líneas celulares utilizadas para la TGE, como HEK293 (Human Embryonic Kidney), CHO (Chinese Hamster Ovary), las células CAP (CEVEC's Amniocyte Production), que son una línea celular inmortalizada basada en amniocitos humanos primarios y las células Vero, aisladas a partir de células epiteliales de riñón extraídas de un mono verde africano, las más utilizadas en la expresión transitoria son las dos primeras, ambas líneas celulares con ventajas y desventajas, las que se muestran en la tabla 3.

Tabla 2. Sistemas de expresión usados en la expresión de proteínas recombinantes de uso farmacéutico.

Sistema	Ventajas	Desventajas
Bacterias <i>E. coli</i>	Rápida expresión de la proteína. Bajos costos de producción. Proceso simple de amplificación. Altas producciones de proteína. Genéticamente bien caracterizados.	No realiza modificaciones postraduccionales. Las proteínas se producen en cuerpos de inclusión.
Levaduras <i>P. pastoris</i> y <i>S. cerevisiae</i>	Expresión moderadamente rápida. Realizan glicosilación.	Las proteínas son glicosiladas con distinto patrón que las expresadas por mamíferos. Las glicoproteínas tienen una vida media baja. Sistema costoso.
Células de Insecto Sf9, Sf21/baculovirus	Expresión de proteínas moderadamente rápida. Realizan la glicosilación. Altos niveles de expresión.	Sistema costoso. Expresa glicoproteínas con diferente patrón a las expresadas por mamíferos. Las proteínas pueden expresarse como agregados intracelulares.
Células de mamífero (expresión estable) CHO (Chinese Hamster Ovary) NS0 (Mouse myeloma)	Expresión moderadamente rápida. Correcto plegamiento de las proteínas. Realizan glicosilación.	Sistema costoso. El DNA de interés se inserta en el genoma de la célula hospedera. Se requiere mucho tiempo para generar una línea estable (6-12 meses).
Células de mamífero (expresión transitoria) HEK293 (Human embryonic kidney) CHO (Chinese Hamster Ovary)	Realizan modificaciones postraduccionales y plegamiento adecuado de la proteína. El DNA de interés no se inserta en el genoma de la célula hospedera.	Sistema costoso. Expresan proteínas con diferentes patrones de glicosilación.

Tomado de: (Dumont, Ewart, Mei, Estes, & Kshirsagar, 2016; Schmidt, 2004; Sodoyer, 2004).

Tabla 3. Ventajas y Desventajas de HEK293 y CHO

Línea celular	Ventajas	Desventajas
CHO	<ol style="list-style-type: none"> 1. Línea celular bien conocida y caracterizada 2. Realizan modificaciones postraduccionales, como la glicosilación 3. Permite una rápida producción de proteínas 4. Crecen en cultivos libres de suero 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Bajo rendimiento proteico comparado con sistemas procariontes 2. Alto costo de cultivo 3. Añaden a la proteína estructuras de glicanos potencialmente inmunogénicos, que pueden resultar en un aumento del aclaramiento y la reducción de la eficacia del fármaco
HEK293	<ol style="list-style-type: none"> 1. Se cultivan fácilmente en medios libres de suero 2. Altamente eficaces en la producción de proteínas 3. Mayor tasa de eficacia de transfección 4. Son capaces de producir un perfil de glicanos similar al humano 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Bajo rendimiento proteico comparado con sistemas procariontes 2. Alto costo del cultivo

Tomado de: (Croset et al., 2012; Zemella, Thoring, Hoffmeister, & Kubick, 2015).

2.4 HEK 293.

La línea celular HEK 293, derivada de células embrionarias de riñón humano, está transformada con fragmentos de ADN de adenovirus tipo 5; es decir, esta línea tiene incorporada dentro de su cromosoma 19, la región E1 del adenovirus (F. Graham & Smiley, 1977), por lo que es usada para la producción de proteínas recombinantes y vectores virales (Swiech, Picanço-Castro, & Covas, 2012). HEK 293 es la línea celular predominante para la expresión transitoria de proteínas recombinantes; lo que permite la producción rápida de estas proteínas (Baldi, Hacker, Adam, & Wurm, 2007); tiene la habilidad de crecer en suspensión en medio libre de suero (Durocher, Perret, & Kamen, 2002); y constituye una atractiva plataforma para la expresión de proteínas recombinantes que requieren modificaciones postraduccionales como la glicosilación (Henry & Durocher, 2011).

2.4.1 Vehículo para la producción de biofármacos.

Hoy en día, las células HEK293 son ampliamente utilizadas en varias áreas y se han convertido en un poderoso vehículo y una nueva plataforma para la producción de proteínas terapéuticas recombinantes, vacunas, agentes anticancerígenos y vectores adenovirales recombinantes (J. Hu et al., 2018).

Algunas razones para la elección de HEK293 como células huésped son:

(a) Tienen una alta eficacia de transfección usando los reactivos de transfección más comunes con grandes cantidades de proteínas recombinantes producidas (Dalton & Barton, 2014).

(b) Son las células hospederas ideales para cultivos en suspensión a gran escala utilizados en la fabricación de proteínas de uso farmacéutico (Swiech et al., 2012).

(c) Tienen la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales y, al ser de origen humano son capaces de producir proteínas más similares a las que se sintetizan naturalmente en humanos (Dumont et al., 2016).

(d) Son una herramienta factible para la producción de biofármacos, debido a su alta tasa de crecimiento, metabolismo eficiente y flexible, y manipulación genética (Román et al., 2016).

(e) Las células HEK293 son células embrionarias de riñón humano, con características similares a las neuronas y se usa comúnmente como un modelo para el descubrimiento de nuevas drogas y pruebas de toxicidad (Amarouch, Syam, & Abriel, 2013; Eglen & Reisine, 2011; Mesnage, Bernay, & Séralini, 2013).

La primera proteína terapéutica recombinante producida en HEK293 y, que recibió aprobación en 2001 por la FDA y en 2002 por la EMA para el tratamiento de pacientes con sepsis fue Drotrecogin alfa (Xigris®). Posteriormente, los Estados Unidos y la Unión Europea aprobaron 4 nuevos productos biofarmacéuticos derivados de células HEK293 con fines terapéuticos: efmoroctocog alfa (Eloctate®), human-cl rhFVIII (Nuwiq®), efrnonacog alfa (Alprolix®), and dulaglutide (Trulicity™) (Dumont et al., 2016; Swiech, Picanço-Castro, & Covas, 2017).

2.4.2 Metabolismo de HEK 293 en la producción de vectores virales y proteínas recombinantes.

Cada sistema “virus/célula” tiene demandas específicas, que implican un gran número de desafíos para alcanzar altos rendimientos de producción de virus y proteínas recombinantes. Todos estos desafíos están relacionados con el concepto de “mantener o mejorar la fisiología celular a lo largo del proceso de producción”, que está estrechamente relacionado con el estado metabólico de la célula, las producciones de desechos metabólicos se pueden determinar a partir de la cuantificación de las concentraciones de metabolitos (Petiot, Cuperlovic-Culf, Shen, Kamen, & et al, 2015).

Células transformadas como HEK 293 consumen cantidades de glucosa y glutamina superiores a las necesarias para satisfacer sus necesidades de energía y biosíntesis, lo que resulta en una acumulación de grandes cantidades de lactato y amoníaco en el medio. Esto, a su vez, tiene un efecto negativo en el crecimiento celular, la productividad celular y la calidad del producto (Andersen & Goochee, 1994; Ozturk, Riley, & Palsson, 1992; Ryll, Valley, & Wagner, 1994).

Se han desarrollado modelos computacionales de redes metabólicas o “análisis de flujo metabólico” (MFA), que permiten determinar la conversión del conocimiento biológico en un formato matemático y el cálculo posterior de estados fisiológicos para abordar una variedad de preguntas científicas y aplicadas, permitiendo determinar el grado de participación de diferentes vías en los procesos metabólicos y funciones celulares, un ejemplo de este tipo de modelo computacional es Recon 2 (Thiele et al., 2013). En el 2014, el equipo de Stefanie Dietmair, utilizó Recon 2 para el análisis de flujo de las células HEK 293, los resultados mostraban que las células HEK 293 catabolizaban activamente la alanina, aunque típicamente la glutamina se considera como una fuente de energía principal con alanina como subproducto solamente (Nadeau et al., 2000). Aunque Dietmair *et al*, concluyeron que Recon 2 es una base de datos de reacciones del metabolismo humano altamente precisa, sus análisis todavía están restringidos por las limitaciones de los métodos de producción convencionales de proteínas recombinantes (Quek et al., 2014).

2.4.3 *Expresión transitoria en HEK293.*

Las células transfectadas transitoriamente expresan un gen extraño por un periodo de tiempo finito, generalmente de varios días, después del cual el transgen se pierde a través de la división celular; es decir, el gen no se integra al genoma de las células transfectadas o transducidas. La expresión transitoria ha ganado popularidad durante la última década ya que acorta los plazos para la producción de proteínas recombinantes (Fliedl & Kaisermayer, 2011), y es de gran utilidad para el estudio de los elementos que regulan la expresión de genes o cuando es importante tener resultados experimentales dentro de un corto periodo de tiempo (Novelli, 2000).

Diferentes líneas celulares se utilizan para la transfección transitoria de genes, la predominante es HEK293, debido a su mayor tasa de eficacia de transfección y expresión de proteínas (Derouazi et al., 2004; Galbraith, Tait, Racher, Birch, & James, 2006; Preuss, Connor, & Vogel, 2000).

Existen diversas estrategias de transfección, las cuales se clasifican en métodos físicos, químicos y virales. La elección del protocolo depende del tipo de célula.

En los métodos virales se utilizan virus no replicativos o defectivos, es decir, el genoma viral se modifica de tal manera que se interfiere con el ciclo de vida viral, por lo tanto, se requiere una línea celular productora específica para proporcionar la transcomplementación y superar la modificación y permitir la producción viral (Kovesdi & Hedley, 2010). De hecho, el Adenovirus tipo 5 (Ad 5) se ha convertido en los sistemas de vectores más utilizados para administrar genes terapéuticos en ensayos clínicos de terapia génica humana y para la producción de proteínas recombinantes (Ferreira, Ferreira, Carrondo, & Alves, 2005).

2.5 Adenovirus.

Los adenovirus humanos mejor caracterizados y más utilizados en terapia génica son los Ad tipo 2 y 5, ambos pertenecientes al subgrupo C. Los Adenovirus tipo 5 (Ad5) de tipo silvestre pueden replicarse en numerosos tipos de tejidos, pero para utilizar vectores de Ad con fines terapéuticos su genoma requiere de cierta modificación; en particular si el genoma viral se modifica de tal manera que el ciclo de vida viral sea interferido, se requiere una línea celular productora específica para proporcionar complementación, superar la modificación y permitir la producción viral; tal es el caso de la línea celular HEK 293 utilizada para los vectores adenovirales de primera generación (Kovesdi & Hedley, 2010).

2.5.1 Estructura y organización del genoma del Adenovirus.

La estructura del virión adenoviral consiste en un cápside icosaédrica sin cubierta con un diámetro de entre 70- 100 nm, se caracteriza por no poseer cubierta externa. La cápside está constituida por tres proteínas principales: hexón (II), base de pentón (III) y fibra nodulada (IV), junto con una serie de otras proteínas menores, VI, VIII, IX, IIIa y IVa2 (figura 4 y Tabla 5) (Stewart, Fuller, & Burnett, 1993).

El genoma del virus es de ADN bicatenario lineal con una proteína terminal (TP) unida covalentemente a las terminaciones 5', que tienen repeticiones terminales invertidas (ITRs) (Rekosh, Russell, Bellet, & Robinson, 1977). El ADN del virus está íntimamente asociado con la proteína VII altamente básica y un péptido pequeño denominado mu (μ) (Anderson, Young, & Flint, 1989). Otra proteína, la V, se empaqueta con este complejo ADN-proteína y parece proporcionar un enlace estructural a la cápside a través de la proteína VI (Matthews & Russell, 1995). El virus también contiene una proteasa (Pr), que es necesaria para el procesamiento de algunas de las proteínas estructurales y para producir virus infecciosos maduros (Weber, 1976; Webster, Russell, Talbot, Russel, & Kemp, 1989).

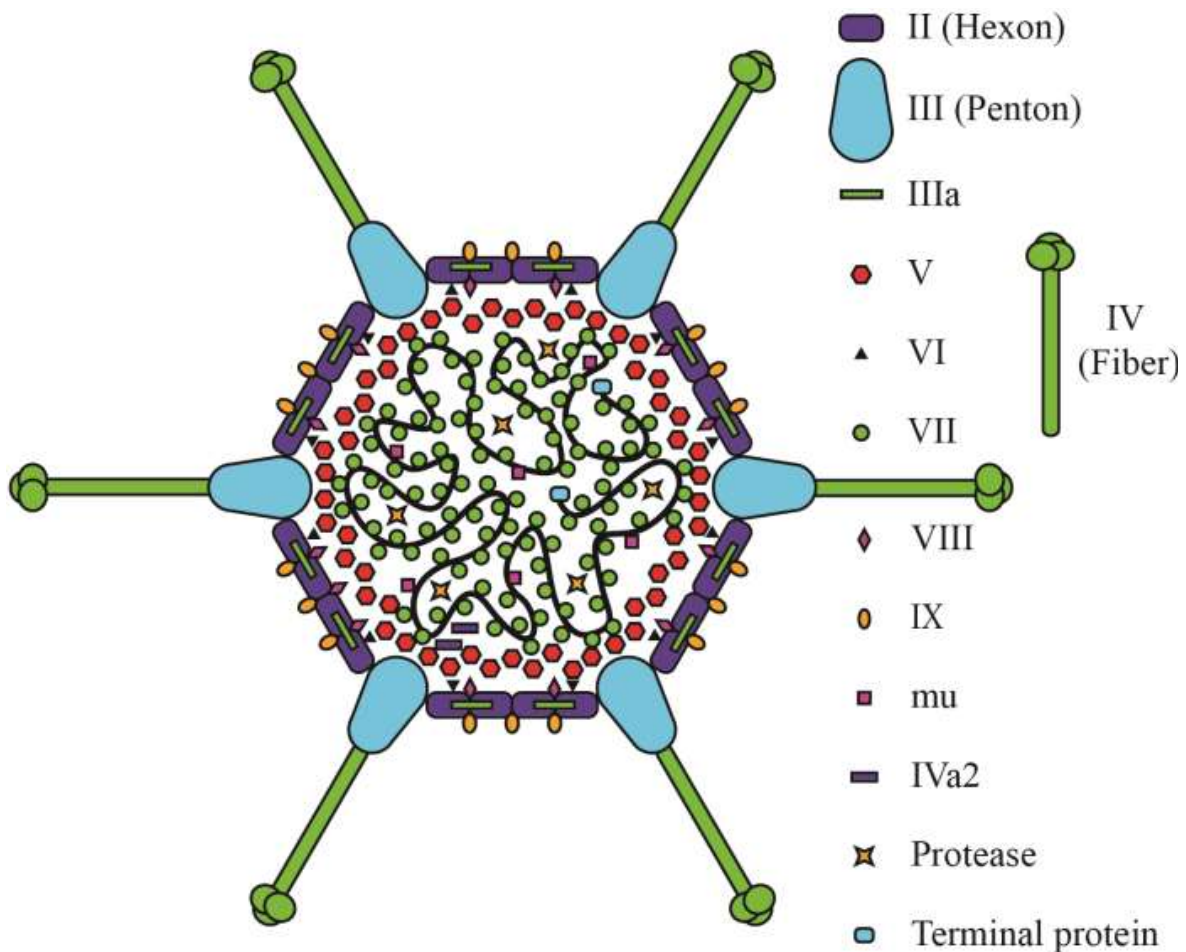


Figura 3. Representación esquemática de la estructura de adenovirus 5.

Representación esquemática de la estructura adenoviral basada en microscopía crio-electrónica y la cristalografía. La estructura de los adenovirus está constituida por una cápside icosaédrica que se compone de tres elementos principales: hexón situado en las caras y los bordes de la cápside; base pentón ubicada en los 12 vértices y las fibras unidas a la base de pentón. Otros componentes menores: IIIa, VI, VIII y IX también están asociados con la cápside. En su interior se encuentra la proteasa de virión que desempeña un papel vital en el ensamblaje del virión y el genoma de ADN de doble hebra asociado con cinco polipéptidos: proteína terminal (TP), V, VII, Mu y IVa2. Adaptada de (Giberson, Davidson, & Parks, 2012).

Tabla 4. Proteínas Adenovirales. Localización y función

Proteína	Localización y función	
II (Hexón)	Unidad estructural principal de la cápside. 240 hexones forman la cápside.	Proteínas de la cápside
III (Pentón)	12 pentones forman la cápside. Se compone por el pentón base y la fibra, interactúa con integrinas para iniciar el proceso de internalización.	
IV (Fibra)	Responsable de la interacción con diversos receptores (CAR, CD46, oligosacáridos que contienen ácido siálico).	
IIIa	Es la proteína de unión más grande en la cápside. Se sabe que desempeña un papel en el ensamblaje y la maduración viral.	Proteínas de unión
Iva2	Interacciona con las proteínas IIIa, VI, VIII y IX para estabilizar la cápside o conectar la cápside exterior con el complejo ADN-proteína.	
VI	Se asocia con la proteína VI, el hexón y también con el ADN. Se localiza en la superficie interior de la cápside, en las proximidades del genoma viral.	
VIII	Se relaciona con las proteínas V y VI para estabilizar la interacción entre hexones.	
IX	Ayuda a estabilizar el virión.	
V	Se empaqueta con el complejo ADN-proteína del Ad, se cree que forma una envoltura que rodea el complejo de proteína VII – ADN y sirve como enlace entre el ADN y la cápside interna. Interactúa con las proteínas V, VI y VII para estabilizar los hexones y vincularlos con otros hexones. Interactúa con los pentones.	Proteínas del núcleo
VII	Esta proteína se condensa y compacta el ADN, para facilitar su empaquetado dentro de las limitaciones de la cápside.	
Mu (μ)	Se cree que puede estar involucrada en la compactación y relajación del ADN viral. Ensambla y desensambla la partícula adenoviral.	
Proteasa	Cataliza el procesamiento mutarrotacional de 6 proteínas (IIIa, VI, VII, VIII, μ , TP), paso esencial para la producción de partículas adenovirales infecciosas.	
Proteína Terminal (TP)	Esta unida covalentemente a los extremos de ADN viral y puede facilitar la circularización del genoma viral. Junto con la polimerasa codificada por el virus dan inicio a la replicación del ADN viral. Funciona como iniciador, a partir del 3'OH	

Tomado de: (Flint Jane S, 2001).

2.5.2 Ciclo de replicación del adenovirus.

El ciclo infeccioso de los adenovirus se divide en dos fases. La primera fase o fase temprana incluye la entrada del virus en la célula hospedera, el transporte del genoma viral al núcleo y la transcripción (Russell, 2007). Los sucesos tempranos modulan las funciones de la célula facilitando la replicación del genoma viral y el inicio de la expresión de los genes tardíos. La segunda fase o fase tardía la constituye los procesos posteriores a la replicación y termina con el ensamblaje de las proteínas estructurales y la maduración del virus infeccioso en el núcleo. La infección adenoviral finaliza con la lisis celular y liberación de nuevas partículas adenovirales. La primera fase suele requerir, en células permisivas, entre 6 y 8 horas, mientras que la fase tardía suele ser más rápida liberando partículas virales entre 4 y 6 horas. El genoma adenoviral se puede dividir en dos regiones, dependiendo de que su transcripción sea anterior o posterior a la replicación del mismo; la región de transcripción temprana, dividida en las regiones E1, E2, E3 y E4 y las regiones transcripción tardía denominadas L1 a L5 (codifican para las proteínas estructurales) (F. L. Graham & Prevec, 1991; Saha, Wong, & Parks, 2014).

Células permisivas

Para replicarse, un virus debe obtener acceso a una célula permisiva, es decir, una célula que permitirá la replicación del virus. Para los virus que se unen a la superficie de la célula huésped como el primer paso en la infección, la célula debe tener el

La adsorción del virus a la célula diana está mediada por la unión entre la protuberancia de la fibra adenoviral y receptores situados en la superficie de la membrana celular. El principal receptor para el subgrupo C de adenovirus es el receptor del Virus Coxsackie B/Adenovirus (CAR) (Bergelson, Cunningham, Hong, Horwitz, & Crowell, 1997). Además de CAR, el dominio $\alpha 2$ de la cadena pesada de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHCI) también se ha descrito como un correceptor para la adsorción del adenovirus (Hong, Karayan, Tournier, Curiel, & Boulanger, 1997).

Después de la interacción de la fibra adenoviral con sus receptores, tiene lugar la internalización de la partícula viral por un proceso de endocitosis mediada por receptor. El proceso de internalización está promovido por la interacción directa entre un motivo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), que queda expuesto en la base pentona del adenovirus, y, las integrinas celulares que contienen la cadena αV , principalmente $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$, actúan

también como receptores de internalización (Bergelson, 1999; Li, Stupack, Bokoch, & Nemerow, 1998; Li, Stupack, Klemke, Cheresch, & Nemerow, 1998). Una vez en el interior del endosoma, en un proceso mediado por la base pentona y bajo pH, la membrana endosomal se degrada y el endosoma se lisa liberando su contenido al citosol (Seth, Willingham, & Pastan, 1984). El virión es desensamblado por etapas durante el proceso de internalización y transporte al núcleo. Al parecer la proteasa codificada por el virus permite la desorganización de la cápside adenoviral por proteólisis de la proteína estructural VI. El virión, parcialmente desensamblado, es transportado hasta la membrana nuclear y el genoma viral es introducido en el núcleo a través del poro nuclear; este proceso estaría mediado por la asociación del «core» viral (genoma más TP, VII, V y μ) y requiere la participación de dineína y microtúbulos. La transcripción, replicación y encapsidación del genoma del adenovirus tienen lugar en el núcleo de la célula infectada y comienza con la transcripción de los genes tempranos (Greber et al., 1997; Greber, Webster, Weber, & Helenius, 1996).

Después de la replicación del DNA VIRAL comienza la fase de transcripción tardía. En ese momento prácticamente todas las proteínas de la célula infectada dejan de ser traducidas debido a la actividad de los productos de E1 y E4. La transcripción tardía está controlada por el MLP (Mayor Late Promoter) y da lugar a 5 transcritos (L1-L5) por procesos de *splicing*. L1-L5 codifican las proteínas estructurales y las proteínas necesarias para la encapsidación del genoma viral y para la maduración de los viriones. También se expresa la proteína IX que contribuye a la estabilidad del adenovirus y a la eficiencia de encapsidación del genoma viral completo. El proceso de encapsidación está dirigido por la presencia en el genoma adenoviral de la señal de empaquetamiento situada en el extremo izquierdo (Ψ) y que consiste en una serie de secuencias ricas en A-T (Hearing, Samulski, Wishart, & Shenk, 1987).

La producción de viriones continúa durante 40 horas tras la internalización, y está acompañada de importantes cambios en la estructura y la permeabilidad nuclear, facilitando la salida del virus con la lisis celular (Figura 5) (Rao, Perez, & White, 1996; Tollefson, Scaria, et al., 1996; Tollefson, Ryerse, Scaria, Hermiston, & Wold, 1996).

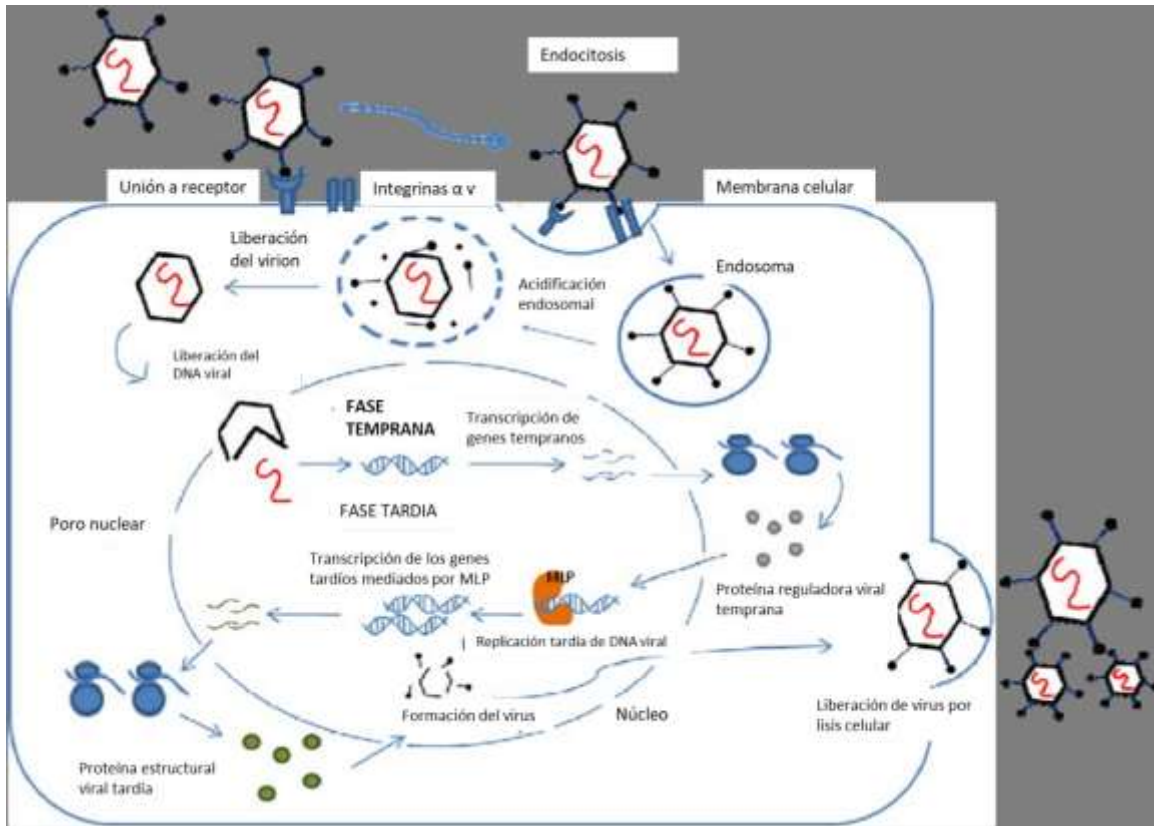


Figura 4. Ciclo infeccioso del Adenovirus y vía de Replicación.

El ciclo de replicación de adenovirus se divide en dos etapas: fase temprana y fase tardía. La fase temprana expresa las proteínas reguladoras que funcionan para activar otros genes del virus, para evitar la muerte prematura de las células infectadas y para alterar la expresión de las proteínas hospederas y así evitar la síntesis de su ADN. Una vez que los componentes para la replicación del ADN viral están listos, la fase tardía puede comenzar. El promotor tardío principal (MLP) media la transcripción de genes de virus tardíos que codifican las proteínas estructurales virales y las proteínas para la maduración de partículas virales. El virus se ensambla en su virión y se libera para infectar otras células mediante lisis celular inducida por virus. Adaptada de (Waye & Sing, 2010).

2.5.3 Vectores adenovirales de primera generación.

Existen vectores terapéuticos de Ad5 no replicativos (o deficientes en la replicación), ya que en su genoma se encuentran eliminadas regiones que les proporcionan espacio para cassette de expresión de genes alternativos o transgenes; en el caso de los vectores adenovirales de primera generación se les ha eliminado de su genoma la región E1 a menudo en combinación con la región E3, con una capacidad de transgen de aproximadamente 6 Kb. La región E1 codifica proteínas necesarias para la expresión de genes tempranos y tardíos, implicados en la iniciación del ciclo viral. Por tanto, cuando la región E1 se sustituye por un cassette de expresión para producir el producto génico, se requiere una línea celular productora que contiene secuencias E1 de adenovirus para complementar esta región; tal es el caso de las células HEK 293. La región E3, codifica productos que contrarrestan los mecanismos de defensa del hospedero (Kovesdi & Hedley, 2010) (Figura 6).

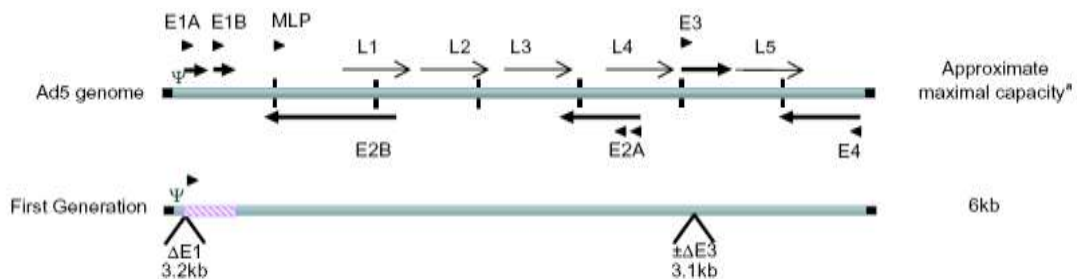


Figura 5. Estructura del genoma del adenovirus 5

Se muestra la estructura del genoma del Adenovirus tipo 5, así como las correspondientes estructuras de los genomas de los vectores adenovirales de primera generación. Los ITR se muestran en cuadros negros, Ψ indica la señal de empaquetamiento, las flechas negras indican los genes tempranos y las grises los tardíos. Adaptada de (Kovesdi & Hedley, 2010).

2.6 Mejoramiento de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes terapéuticas.

El reto para la industria farmacéutica de producción de proteínas terapéuticas (biofarmacéutica) de segunda y tercera generación es conseguir producir proteínas terapéuticas -tanto biocomparables como innovadoras- seguras y eficaces, a costos competitivos y en tiempos relativamente cortos. Es *conditio sine qua non* el trabajo multidisciplinario de las ciencias biológicas, exactas e ingenierías para conseguir bioprocesos robustos y rentables; que cuenten con estrategias innovadoras de ingeniería de bioprocesos durante las etapas de producción del biofármaco (Upstream) como es la etapa de cultivo celular; pero también durante las etapas de purificación, acondicionamiento y formulación (Downstream) (Baldi et al., 2007).

Existen también sistemas de expresión de proteínas recombinantes -tan longevos como los usados convencionalmente en la actualidad- que presentan ventajas sobre estos últimos (sobre todo en términos de calidad del producto) pero que se han restringido para fines como la producción de vacunas. Dichos sistemas de expresión, como es el caso particular del sistema de expresión HEK 293/Adenovirus tipo 5 de primera generación (HEK 293/Ad5) y modelo de estudio del presente proyecto requieren de su estudio y caracterización desde una óptica de sistema de expresión de proteínas recombinantes terapéuticas glicosiladas. Para dicho fin, el estudio del efecto de parámetros básicos de cultivo como la densidad celular (DC) y la Multiplicidad de Infección (MOI) sobre el título y perfil de glicosilación de una glicoproteína con potencial terapéutico son requisito fundamental.

Mediante un enfoque que involucró tanto la biología como la ingeniería (bioingeniería), en el presente proyecto se determinó el efecto de, la densidad celular (DC) y la Multiplicidad de Infección (MOI) sobre el título de producción de la proteína de interés, para este caso Interferón gamma humano (IFN- γ) y el título adenovirus producido mediante el sistema de expresión HEK 293/Adenovirus tipo 5 de primera generación (HEK 293/Ad5).

La producción de proteínas recombinantes en dicho sistema se realiza en un proceso de dos etapas; inicialmente, se cultivan las células HEK 293 hasta obtener la concentración celular deseada, posteriormente, se agrega un volumen del stock de (Ad5) que contiene el transgen de interés, y del que se conoce su título viral.

Para producir las proteínas recombinantes de interés es necesario un proceso de infección viral, que consiste en la introducción de material genético (ADN o ARN) extraño en una célula eucariota, usando en este caso el virus que se replicará en la célula hospedera. Sin embargo, existe medios químicos, físicos que también se usan para introducir el material genético (Tabla 6). La transfección es el uso de un agente químico o físico para introducir material genético a una célula (Figura 7) (Kim & Eberwine, 2010).

2.6.1 Transducción

El método más comúnmente utilizado en la investigación clínica es transfección mediada por virus, también conocida como transducción (Pfeifer & Verma, 2001).

La transducción es altamente eficiente y es fácil para lograr la expresión transgénica sostenible *in vivo* debido a la naturaleza viral de la integración en el genoma del hospedero.

Los principales inconvenientes de la transducción son la inmunogenicidad y la citotoxicidad. La introducción de un vector viral puede causar una reacción inflamatoria y una mutación insercional, porque los vectores virales se integran aleatoriamente en el genoma del hospedero, lo que puede alterar los genes supresores de tumores, activar oncogenes o interrumpir los genes (Woods et al., 2003)

Otra desventaja de este método es que un paquete de virus tiene un espacio limitado para que un gen extraño mantenga la infectividad. Por estas razones, se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar métodos de transfección no virales a pesar de que la transfección mediada por virus es altamente efectiva y fácil de usar (Kim & Eberwine, 2010).

La transducción se clasifica en transducción transitoria y transducción estable, durante la transducción transitoria, el gen de interés no se integra con el genoma de la célula hospedera y se expresa temporalmente dentro de ella durante un corto plazo mientras que, en transducción estable, el gen de interés se integra con el genoma de la célula hospedera y se mantiene a largo plazo en varias generaciones (Kim & Eberwine, 2010).

2.6.1.2 *Transducción transitoria.*

La transducción transitoria es un método bien establecido para expresar rápidamente proteínas recombinantes de células de mamíferos. La aceleración de la actividad en el desarrollo de biofármacos, la demanda de reactivos basados en proteínas, la investigación de vacunas y las grandes iniciativas en estudios estructurales y funcionales de proteínas han impulsado la necesidad de generar cantidades moderadas a altas de proteínas recombinantes y otras macromoléculas de una manera flexible y rápida. El progreso en los últimos 10 a 15 años ha demostrado que la transducción transitoria se pueden ampliar de forma confiable y fácil para manejar de mililitros a decenas de litros de cultivos en suspensión de células y obtener de miligramos a gramos de proteína recombinante en un proceso que solo requiere de días a semanas (Chiou et al., 2014).

La naturaleza misma de la transducción transitoria requiere que las líneas celulares utilizadas para este fin sean altamente transfectables y capaces de mantener altos niveles de expresión génica. La capacidad de crecer y mantener una alta viabilidad celular en el cultivo en suspensión también es importante para conferir una mayor facilidad de manejo, expansión del stock y escalabilidad, otro rasgo que deben mantener las líneas celulares es que no deben replicarse demasiado rápido, ya que el rápido crecimiento de las células después de la transducción puede afectar negativamente la expresión debido a la pérdida del plásmido transducido durante la replicación. Las múltiples divisiones pueden dar como resultado células de progenie que ya no contienen suficiente plásmido para mantener la expresión. El alto crecimiento también agota más rápidamente los nutrientes en los medios y desvía mucha de la energía de la célula a la división en lugar de a la expresión (Pham, Kamen, & Durocher, 2006).

Las células HEK293 poseen algunas de las características más ideales para el trabajo de expresión transitoria, ya que se adaptan bien al cultivo en suspensión, son altamente transfectables y tienen tasas de crecimiento relativamente bajas.

Por el contrario, las células de ovario de hámster chino (CHO), aunque también se adaptan bien al cultivo en suspensión, son más difíciles de transfectar y crecen mucho más rápidamente, con tiempos de duplicación de 16-19 h, en comparación con las 23-29 h exhibidas por HEK293 (Chiou et al., 2014).

Tabla 5. Clasificación de los Métodos de transfección

Método	Ventajas	Desventajas	Ejemplos
Mediado por virus	Alta eficiencia Fácil de usar	Peligro potencial para el personal del laboratorio Inmunogenicidad	Herpes simplex Adenovirus Adenoasociados
Químico: Polímero catiónico Fosfato de calcio Lípido catiónico	Gran variedad de productos disponibles comercialmente	Toxicidad química para algunos tipos de células Eficacia de transfección variable por tipo de célula o condición Es difícil dirigirse a las células específicas	Fosfato de calcio DEAE-dextrana Lipofectina Lipofectina
Fusico: Biobalística Microinyección directa Electroporación Irradiación láser	Principio simple y sencillo Reubicación física de ácidos nucleicos en la célula No es necesario un vector Menos dependiente del tipo y condición de la célula	Necesita instrumentos especiales Los Ácidos nucleicos están vulnerables Exige habilidad del experimentador Procedimiento laborioso	Micro-aguja Punta de AFM Pistola de genes Nucleofector Amaxa,

Tomado de: (Kim & Eberwine, 2010).

2.6.3 Transducción estable.

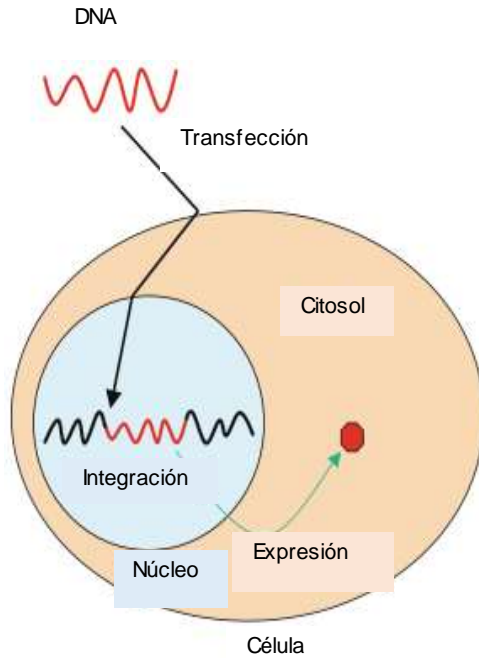
Las líneas celulares estables sobre expresan la proteína de interés de manera uniforme e indefinida, lo que permite que el proceso sea reproducible y se puede escalar fácilmente; sin embargo, el establecimiento de líneas celulares estables requiere un tiempo y esfuerzo sustancial en comparación con los procesos de transducción transitoria (Büssow, 2015).

Para la transducción estable, el material genético introducido, generalmente tienen un gen marcador de selección que se integra en el genoma de la célula hospedera y sostiene la expresión del transgen incluso después de que las células del huésped se repliquen (Glover, Lipps, & Jans, 2005). Por lo tanto, las células que recibieron un transgén activo integrado en el genoma deben seleccionarse mediante un marcador. La resistencia a los antibióticos se usa comúnmente, pero puede ser un gen reportero no confiable para la expresión transgénica uniforme de alto nivel (Kaufman et al., 2008).

La proteína verde fluorescente (GFP) es una alternativa útil. Las células que integran de manera estable un vector de expresión de GFP se identifican directamente por fluorescencia intracelular y se puede aislar mediante clasificación de células FACS preparativa (Mancia et al., 2004).

Las líneas HEK293 y CHO son excelentes células hospederas para la producción estable de proteínas de mamífero con modificaciones postraduccionales apropiadas (Almo & Love, 2014).

A. Transfección estable



B. Transfección transitoria

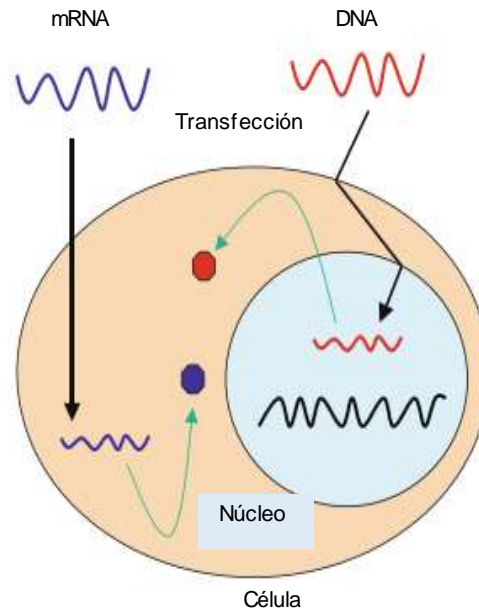


Figura 6. Transfección Estable y Transitoria

(A). Transfección estable. El ADN extraño (onda roja) se envía al núcleo por el paso a través de las membranas celulares y nucleares. El ADN extraño se integra en el genoma de la célula hospedera (onda negra) y se expresa de forma sostenible.

(B). Transfección transitoria. El ADN extraño se envía al núcleo, pero no está integrado en el genoma. El ARNm extraño (onda azul) también se envía al citosol, donde se traduce. Los hexágonos son proteínas expresadas a partir de ácidos nucleicos transfectados. Las flechas negras indican la administración de ácidos nucleicos extraños. Modificado de (Kim & Eberwine, 2010).

3. ANTECEDENTES.

El control de las condiciones y el entorno de cultivo son importantes para producir productos celulares, ya sean virus, anticuerpos o proteínas recombinantes. Sin embargo, también es importante darse cuenta de que las condiciones específicas del cultivo pueden afectar la glicosilación del producto independientemente de las características de la línea celular. Durante el transcurso de un cultivo por lotes, el consumo de nutrientes y la acumulación de productos cambian el entorno celular generalmente de una manera que puede disminuir gradualmente el grado de glicosilación de las proteínas a lo largo del tiempo (Jenkins & Curling, 1994).

Algunos de los parámetros que han demostrado afectar las estructuras de las glicoproteínas son: la Multiplicidad de infección (MOI), la densidad celular (DC), el tiempo de infección, el tiempo de cosecha y el método de cultivo (Nadeau & Kamen, 2003), que están relacionados con la concentración de nutrientes, oxígeno disuelto y pH (Restelli & Butler, 2002).

La estrategia de producción de proteínas recombinantes en el sistema HEK293/Ad5-IFN- γ se basa en la manipulación de la concentración celular y la multiplicidad de infección (MOI), estas variables están interrelacionadas, se manipulan fácilmente y tienen un impacto significativo en los rendimientos obtenidos (Y. Hu & Bentley, 2001).

3.1 Densidad celular (DC).

La densidad celular se refiere al número de células por unidad de volumen. A menudo se denota como células viables, que es el número de células vivas por unidad de volumen, y está determinada por la integridad de su membrana (Browne & Al-Rubeai, 2011; Walker, 2013).

La densidad celular es uno de los parámetros más relevantes en el cultivo de células de mamífero y esto se debe al hecho de que todas las etapas del cultivo celular se basan en una determinación precisa de la densidad celular, desde el establecimiento de una simple rutina de subcultivo, hasta en el cultivo de células para una estrategia de control de procesos para la producción comercial (Konstantinov, 1996).

Se han desarrollado diferentes estrategias para determinar la densidad celular (Tabla 7), siendo uno de los primeros métodos para evaluar la viabilidad celular es el método exclusión de azul de Tripano (Evans & Schulemann, 1914), que se basa en la permeabilidad dependiente de la integridad de la membrana celular. Las células viables tienen una

membrana celular intacta y, por lo tanto, pueden excluir en colorante y aparecen sin teñir bajo el microscopio. Sin embargo, en el caso de las células muertas (con membranas celulares comprometidas), ya no son capaces de controlar el paso de macromoléculas, toman el colorante y en consecuencia se ven de color azul bajo la luz del microscopio (Walker, 2013).

De acuerdo con los resultados obtenidos por Cadena *et al* (2015), se observó que tanto los métodos manuales como los automatizados son adecuados para realizar recuentos de células viables. En general, mostraron resultados similares en todas las características evaluadas (exactitud, precisión, linealidad y rango). El método manual continúa siendo el más empleado debido a la calidad de sus resultados y bajo costo, sin embargo; requiere un cierto grado de experiencia del analista.

Se ha establecido que, en diferentes sistemas biológicos, especialmente en células animales, la producción de proteína recombinante disminuye con el incremento de la densidad celular, incrementa el consumo de nutrientes y el oxígeno del cultivo. Esto se refiere a menudo como el "efecto de densidad celular", que consiste en la reducción de la productividad específica a medida que aumenta la concentración celular; mientras que el uso de bajas concentraciones ocasiona que las células infectadas no continúen su crecimiento (Palomares & Chavez-Peña, 2010). Por ello, en cultivos de células de mamíferos que producen proteínas terapéuticas, la viabilidad óptima es esencial para prolongar la duración del cultivo y mantener la calidad del producto (Ferreira et al., 2005; Henry, Perrier, & Kamen, 2005).

Para lograr una buena productividad de proteína recombinante algunos estudios demuestran que se pueden usar densidades entre 0.3 y 0.5×10^6 cel/ mL (Yamada et al., 2009), y que infecciones con densidades entre 1 y 2×10^6 cel /mL requieren un reemplazo de medio a las 24 horas post infección (p.i). (Garnier, Côté, Nadeau, Kamen, & Massie, 1994).

Tabla 6. Métodos para determinar la densidad celular

Método	Ventajas	Desventajas
Métodos basados en colorantes		
Exclusión de azul de Tripano (Hemocitometro)	Permite realizar pruebas rápidas y directas. Método económico.	Se emplea mucho tiempo. Está sujeto a la variación inter-usuario en función del grado de experiencia del analista.
Exclusión de azul de Tripano (Automatizado)	Ensayo rentable Evita la variabilidad del proceso manual.	Alta inversión inicial en equipos Los errores sistemáticos pueden ser causados por ajustes en el equipo.
Métodos que no se basan en colorantes		
Impedancia Eléctrica	Análisis rápido Es posible analizar varias muestras en corto tiempo, lo que disminuye el error estadístico Sin impacto en la viabilidad por causa de colorantes potencialmente citotóxicos.	Debido a que el análisis de las células se realiza mediante el examen de una señal eléctrica, no es posible un control directo (visualización) de los eventos medidos, esto puede conducir a la mala interpretación causada por agregados y/o desechos).
Capacitancia	Medición en línea, sin contacto. Posible análisis in situ. Sin impacto en la viabilidad por causa de colorantes potencialmente citotóxicos.	Al ser un análisis que no se basa en imágenes, necesita una correlación de datos espectroscópicos con mediciones de biomasa fuera de línea. Opel et al. (2010) reportaron variaciones dependientes de la fase de crecimiento .
Microscopía	Muestreo de datos visuales libres en tiempo real Sin impacto en la viabilidad por causa de colorantes potencialmente citotóxicos.	Los algoritmos de análisis de imágenes deben adaptarse a especies de células específicas.

Tomado de: (Al-Rubeai, 2015).

3.2 Multiplicidad de infección (MOI).

MOI es un término muy usado en la virología desde su uso original por Max Delbrück y sus colegas hace unos 60 años. En ese momento, se usó como un término para describir la relación de los fagos T4 y bacterias en una suspensión agitada con el fin de calcular el número promedio de viriones que infectaban cada célula. El propósito era definir la concentración relativa de virus y bacterias que conduciría a un número controlado de infecciones por bacteria. MOI es un parámetro que refleja la relación entre el número de partículas virales infectivas iniciales y la concentración de células (Ellis & Delbrück, 1939). Se ha reconocido que el rendimiento de un sistema de expresión basado en virus depende fuertemente de esta relación (Edwige Dormond et al., 2008). Para determinar la MOI es necesario conocer el título del stock viral, es decir, cuantificar los virus de un volumen específico.

Los métodos de medición de MOI e pueden agrupar en general en cuatro categorías: (a) determinación de niveles de infectividad, (b) medir la presencia o función de proteínas virales, (c) detectar la presencia de ácido nucleico viral o marcador dentro del genoma viral y (d) contabilizar partículas virales físicas (Tabla 8) (Heider & Metzner, 2014).

Los métodos para determinar los niveles virales incluyen:

- La determinación de efectos citopáticos tales como la formación de placas y ensayos de dosis infectivas de cultivo de tejidos o dosis efectiva 50 (TCID 50), que determina la concentración a la cual el virus es capaz de infectar el 50% del cultivo.
- El análisis de partículas virales individuales ha sido remitido durante mucho tiempo al microscopio electrónico. Recientemente, el progreso técnico en el campo de la microscopía y la adaptación de aplicaciones desarrolladas originalmente para su uso en nanotecnología se cruzó con los usos en virología e hizo más factible el análisis cuantitativo de partículas virales individuales como entidades físicas.

Efecto citopático (ECP) o Cytopathic effect (CPE)

Las alteraciones entre virus y células susceptibles en cultivo de tejidos a menudo resultan en alteraciones celulares denominadas efectos citopáticos. Estos incluyen cambios morfológicos y fisiológicos que resultan en metabolismo alterado y en detención o estimulación de la multiplicidad celular. Los cambios adicionales descritos en las células infectadas con adenovirus incluyen dilatación y distorsión nuclear, contracción citoplásmica y desprendimiento de células, que se agrupan para formar racimos de uvas (Pereira, 1962).

Algunas de estas tecnologías incluyen a la citometría de flujo (Brussaard, Marie, & Bratbak, 2000; Ferris et al., 2011), y microscopia de fuerza atómica (Ohnesorge et al., 1997) entre otras.

- En los ensayos de hemaglutinación se tienen virus en solución y se agregan eritrocitos. El virus puede interactuar con las células sanguíneas y formar una estructura reticular como consecuencia de la aglutinación de los eritrocitos. Las metodologías serológicas también miden la presencia de antígenos virales, aunque indirectamente (Heider & Metzner, 2014). En general, el uso de la tecnología de anticuerpos ha tenido un gran impacto en la cuantificación de virus, como la técnica de inmunoabsorción enzimática (ELISA), ya que se logran alta especificidad y sensibilidad, sin embargo, la rigurosidad de los enfoques ELISA para la cuantificación del virus puede considerarse baja, ya que el elemento viral medido no está necesariamente ligado a una partícula vírica (Boer, Back, & Osterhaus, 1990; Heider & Metzner, 2014).
- El advenimiento de las técnicas moleculares, especialmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), también ha dejado su huella en la cuantificación de las partículas virales. Tanto los niveles de ARN como de ADN se pueden medir usando PCR cuantitativas. La cuantificación absoluta (es decir, números de copias o números de partículas) puede obtenerse a partir de datos crudos relativos usando diluciones estándar de ADN vector o ARN. La PCR también puede usarse para cuantificar los niveles de proteína. Sin embargo, la rigurosidad de estas técnicas también puede considerarse baja, ya que el elemento viral medido -en este caso el ácido nucleico- no es necesariamente parte del virus (infeccioso o no) y los cálculos pueden sobreestimar significativamente el número de partículas presentes (Heider & Metzner, 2014; Roldão, Oliveira, Carrondo, & Alves, 2009).

Existe cierta restricción para las técnicas que cuantifican proteínas virales, ácidos nucleicos o partículas virales, ya que el elemento viral medido, no es necesariamente parte de un virión infeccioso, y los cálculos pueden sobreestimar significativamente el número de partículas presentes (Heider & Metzner, 2014).

Tabla 7. Métodos de cuantificación del virus. La tabla resume algunos de los métodos más comunes utilizados para la cuantificación del virus.

Categoría	Método	Tiempo de resultados	Exactitud	Comentarios
Infectividad	Ensayo de placa	Días	Alta	El virus debe replicarse en cultivo
	TCID50	Días	Alta	
Proteína	ELISA	Horas	Baja	El elemento viral medido no necesariamente está ligado a las partículas virales
	Hemaglutinación	Horas	Baja	
Ácidos nucleicos	qPCR	Horas	Baja	El elemento viral medido no necesariamente está ligado a las partículas virales
Partícula	Citometría de flujo Microscopía electrónica	Minutos – horas	Media	La preparación de la muestra influye en los resultados

Tomado de: (Heider & Metzner, 2014; Virocyt, 2013).

La cuantificación viral representa un paso importante en múltiples puntos en la producción de proteínas recombinantes, estudios de los mecanismos de infección viral y desarrollo y fabricación de vacunas. La determinación exacta de la concentración viral permite que las infecciones víricas se normalicen con precisión y los procesos de expansión viral se supervisen, optimicen y alteren para obtener rendimientos máximos.

Estudios realizados por Yamada *et al* (2009), examinaron la producción de vectores adenovirales con infecciones a baja y alta multiplicidad. En el caso de la infección a una baja MOI (< 1), sólo una pequeña proporción de células se infecta inicialmente con la adición del stock viral. Las células no infectadas se infectarán después de que las células inicialmente infectadas comiencen a liberar la progenie del virus (infección secundaria). Por lo tanto, para una producción eficiente de vectores de adenovirus por infección de baja multiplicidad, se requieren tiempos de cultivo más largos para que todas las células se infecten y se complete la replicación del virus. A una alta MOI (> 5), esencialmente todas las células se infectarán tras la adición del stock viral, y la infección resultante será sincrónica (Yamada et al., 2009).

A MOI mayores de 5, el 100% de la población es infectada con el virus recombinante adicionado al cultivo. En consecuencia, el virus toma el control de la célula, promueve la

síntesis de sus proteínas y evita la síntesis de las proteínas celulares (O'Reilly, Miller, & Luckow, 1994; Palomares, Estrada-Mondaca, & Ramirez, 2006).

3.3 Interferón gamma humano (IFN- γ).

De acuerdo al artículo 81 Bis del Reglamento de Insumos para la Salud (RIS) se considera que un biofármaco es 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 las condiciones para ser empleada como principio activo de un medicamento biotecnológico.

En 1957, Isaacs y Lindenmann descubrieron una sustancia que protegía a las células *in vitro* de la infección viral, ellos la denominaron interferón. Hoy se sabe que ésta es una familia de proteínas con actividad antiviral secretadas en respuesta a diferentes estímulos, constituyéndose en las primeras citocinas descritas y utilizadas terapéuticamente (Isaacs & Lindenmann, 1957).

En humanos, el gen del IFN- γ se localiza en el cromosoma 12 (12q24.1, región cromosomal), su secuencia fue reportada por primera vez en 1982 por Gray y Goeddel. Años después, en 1995 Young y colaboradores reportaron que el IFN- γ es codificado por un solo gen conformado por cuatro intrones y tres exones (P. Gray & Goeddel, 1982; Naylor et al., 1983; Young & Hardy, 1995).

El IFN- γ o interferón tipo II, es una citocina producida principalmente por linfocitos T CD4+, CD8+ en respuesta al reconocimiento antigénico y por células Natural Killers (NK) al identificar componentes de los microorganismos o por la presencia de IL-12 (Muruve, 2004).

El IFN- γ humano es sintetizado como una proteína precursora de 166 aminoácidos (aa), los primeros 23 aa corresponden a una secuencia señal. Durante la biosíntesis del IFN- γ , los péptidos son N-glicosilados en la Asparagina-25 y Asparagina-97 (Ahmed, Burkhart, Mujtaba, Subramaniam, & Johnson, 2003; Rinderknecht, O'Connor, & Rodriguez, 1984; Sareneva, Pirhonen, Cantell, & Julkunen, 1995), los residuos de glicano que se encuentran en Asparagina-25 juegan un papel importante en la resistencia a proteasas tales como la catepsina G, la elastasa y la plasmita. Por lo tanto, una adecuada glicosilación aumenta el tiempo de vida media del IFN- γ biológicamente activo en la circulación, la cual corresponde a un homodímero estabilizado por fuerzas no covalentes, y con un peso molecular

aproximado de 50 kDa (Sareneva, 1995 *et al*; Schroder, Hertzog, Ravasi, & Hume, 2004). Se ha demostrado que la IFN- γ nativo derivado de linfocitos T está heterogéneamente glicosilado, que dan como resultado moléculas de IFN- γ de diferentes masas moleculares, 16.7 kDa para las estructuras no glicosiladas, 20 kDa para el IFN- γ con un sitio de glicosilación y 24 con 2 sitios de glicosilación, con una considerable variación en las estructuras de carbohidratos (> 30 formas diferentes) (Sareneva, Mørtz, Tölö, Roepstorff, & Julkunen, 1996).

Algunos de los productos aprobados por la FDA son IMUKIN® y ACTIMMUNE®, los cuales están designados para el tratamiento de la enfermedad granulomatosa crónica para disminuir la gravedad y el número de infecciones en pacientes; contra la osteopetrosis maligna para posponer la progresión de la enfermedad. También se ha demostrado que ACTIMMUNE es efectivo contra una amplia variedad de enfermedades, incluyendo cáncer, tuberculosis (infecciones por *Mycobacterium avium complex*), fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, esclerodermia, infecciones fúngicas invasivas, especialmente en pacientes inmunodeprimidos, como leucemia, en el tratamiento de la osteopetrosis congénita, en el tratamiento contra infecciones fúngicas en pacientes con trasplante de riñón (Armstrong-James et al., 2010; Miller, Maher, Young, & et al, 2009); sin embargo, estos biofármacos son expresados en *Escherichia coli* y se refieren solo al monómero.

Sistemas de expresión utilizados para la producción del Interferón gamma (Figura 8)

En la década de 1980, e IFN- γ se producía exponiendo los linfocitos T humanos a estímulos mitogénicos o traduciendo ARNm en oocitos, lo que daba como resultado una baja expresión y actividad del IFN- γ . Hubo una serie de problemas con la purificación debido a la formación de agregados citoplásmicos a los que se les denomina cuerpos de inclusión, que provocaba costosos procesos de desnaturalización (Arbabi et al., 2003).

Con el desarrollo de la tecnología de ADN recombinante, el cDNA del IFN- γ fue clonado con éxito y expresado en *E. coli* en 1982 (P. W. Gray et al., 1982). *E. coli* es uno de los sistemas de expresión más utilizados para la producción de proteínas heterólogas debido a su simple requerimiento de nutrientes, alta tasa de crecimiento, a su fisiología y genética molecular bien entendida (Babaeipour, Shojaosadati, Khalilzadeh, Maghsoudi, & Farnoud, 2010). Sin embargo, este sistema de expresión presenta algunas limitaciones, como son:

- 1) El IFN- γ recombinante forma cuerpos de inclusión intracelulares insolubles en *E. coli*, en los que la proteína se desnaturaliza parcial o totalmente; complicando

su purificación porque se requiere un paso de desnaturalización/renaturalización (Petrov, Nacheva, & Ivanov, 2010).

- 2) Los sistemas de expresión bacterianos no son capaces de realizar la glicosilación, dando como resultado un IFN- γ recombinante no glicosilado que tiene una vida media más corta en la circulación sanguínea en comparación con IFN- γ nativo (Bocci et al., 1985; Sareneva, Cantell, Pyhälä, Pirhonen, & Julkunen, 1993).
- 3) La producción de proteínas recombinantes en *E. coli*, suele estar acompañada de impurezas como endotoxinas y ácidos nucleicos que contaminan el producto, (Mohammadian-Mosaabadi et al., 2007; Rojas et al., 2010).

Investigaciones de (Wang et al., 2014) dijeron haber sobre expresado el IFN- γ en la levadura *P. pastoris*, pero más tarde (Prabhu, Veeranki, & Dsilva, 2016; Razaghi, Tan, et al., 2016) demostraron la irreproducibilidad de esos resultados, ya que los rendimientos logrados no fueron competitivos con *E. coli* (Tabla 9).

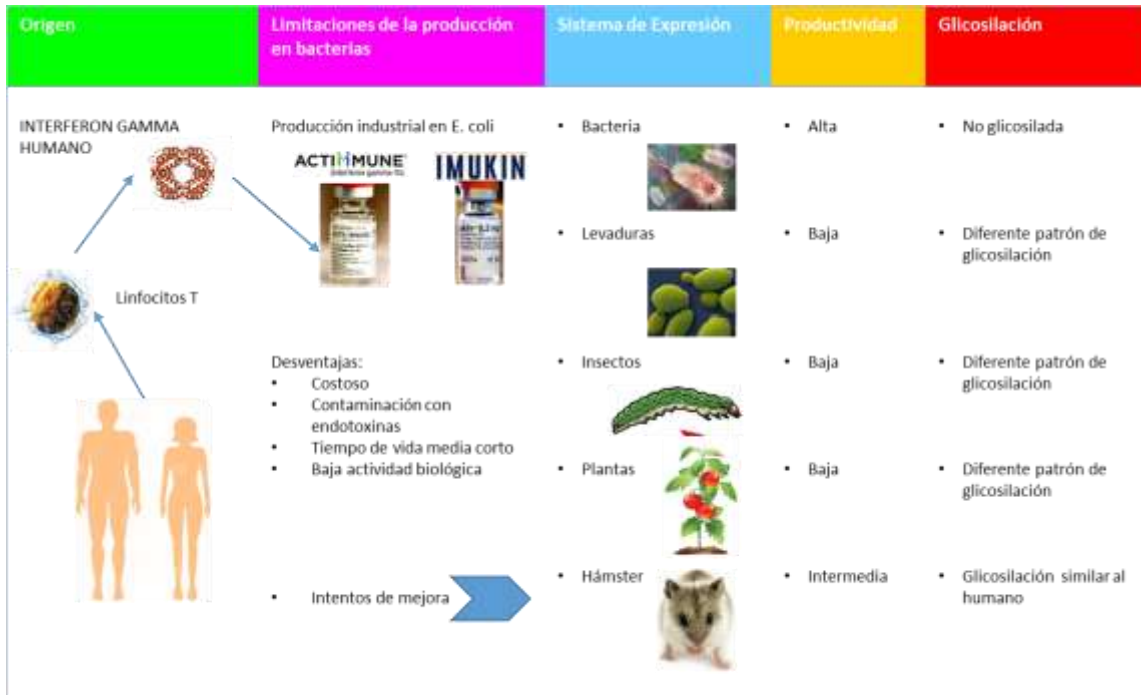


Figura 7. Resumen de sistemas de expresión de Interferón gamma.

El IFN- γ recombinante se utiliza como un biofármaco y tiene un potencial para ser utilizado como inmunoterapéutico contra el cáncer. A nivel industrial se produce en *Escherichia coli*, comercialmente se conoce con las marcas Imukin® y Actimmune®. La elección del sistema de expresión afecta el patrón de glicosilación y la estructura del IFN- γ , lo que posteriormente afecta su tiempo de vida media y actividad. Las plataformas de producción basadas en células de mamíferos producen una glicosilación similar a la proteína endógena, por lo que diferentes investigadores han centrado sus estudios en mejorar la producción en estos sistemas. Imagen adaptada de (Razaghi, Owens, & Heimann, 2016).

Tabla 8. Efecto del sistema de expresión sobre la producción de IFN- γ

Sistema de Expresión	Producción (mg/L)	Peso molecular (KDa)	Referencia
Glándula mamaria de ratón (<i>Mus spp.</i>)	23 x 10 ⁻⁶ 350 - 570	20 -25	(Bagis et al., 2011) (Lagutin et al., 1999)
Células de ovario de hámster chino (CHO) (<i>Cricetulus sp.</i>)	15	*	(McClain, 2010)
<i>Spodoptera spp./Baculovirus</i>	2	18 - 23	(Chen et al., 2011)
<i>Bacillus sp.</i>	2 - 20	17	(Rojas et al., 2010)
<i>Leishmania sp.</i>	9.5	17	(Davoudi et al., 2011)
<i>Pichia pastoris</i>	1 – 16 x 10 ⁻³	*	(Razaghi, Tan, et al., 2016)
	300	15	(Wang et al., 2014)
Arroz (<i>Oryzea sativa</i>)	17 x 10 ⁻³	24 -27	(Chen et al., 2004)
<i>E. coli</i>	1700	17	(Huang et al., 2013)

* Dato no publicado, Modificado de: (Razaghi, Owens, & Heimann, 2016)

Para el presente proyecto se utilizó un vector adenoviral que expresa Interferón gamma humano (pAdenoINF- γ), el cual fue construido por Romero-Martínez (2014). En este trabajo se reportan los resultados que comprueban la generación del vector adenoviral de primera generación en cuatro etapas:

- Construcción del vector pShuttleIFN- γ : esta construcción fue necesaria para la escisión del cassette de expresión que contiene los sitios PI-Sce/I-CeuI, el promotor del citomegalovirus (CMV) y la secuencia de interés INF- γ .
- La segunda etapa fue la ligación del cassette de expresión en el DNA lineal del adenovirus, que, de igual manera, contenía los sitios PI-Sce/I-CeuI.
- La tercera etapa consistió en la transfección de células HEK 293 con el vector adenoviral recombinante linealizado para la producción de partículas adenovirales recombinantes. Romero-Martínez, mediante RT-PCR comprobó que las células HEK 293 infectadas con los adenovirus recombinantes expresaron transcritos del IFN- γ , y corroboró mediante Western blot que las células HEK 293 infectadas con las partículas recombinantes secretaron el IFN- γ al medio de cultivo.

- Finalmente, la cuarta etapa consistió en la amplificación del vector adenoviral obtenido en el pase cero por medio de infecciones subsecuentes en células HEK 293 hasta obtener un título de 1.57×10^6 PFU/mL.

Así, considerando que las células HEK293 son humanas y capaces de producir proteínas con las glicosilaciones adecuadas, en este proyecto se sientan las bases para el estudio de un sistema de expresión transitorio en el cual las células HEK293 puedan ser infectadas con el Ad5/INF- γ y producir una proteína humana recombinante con características totalmente humanas.

4. JUSTIFICACIÓN.

El mercado actual de los biofármacos está aumentando constantemente, de hecho, tan solo en el periodo de 2010-2014 los biofármacos producidos en células de mamífero alcanzaron un 60%, comparado con un 40% de productos aprobados y producidos por otros sistemas de expresión, como bacterias y levaduras. Por ello, la necesidad de continuar mejorando y desarrollando sistemas de expresión para la obtención de proteínas recombinantes sigue siendo materia de estudio, basados en parámetros básicos de cultivo celular como son la multiplicidad de infección (MOI) y la densidad celular. Si bien, la principal línea productora de proteínas recombinantes es la línea CHO, este sistema no glicosila con el mismo patrón de las proteínas humanas, por lo que se convierte en un reto poder determinar si las células HEK293, que son de origen humano serían un adecuado sistema de producción de biofármacos para posteriormente analizar el patrón de glicosilación que ofrecen. Por lo tanto, se propone analizar el sistema de expresión HEK293/Ad5IFN- γ como productor alternativo de proteínas recombinantes.

5. HIPÓTESIS.

La densidad celular y multiplicidad de infección influyen de manera directa la producción de IFN- γ en el sistema productor transitorio HEK293/Ad5.

6. OBJETIVOS.

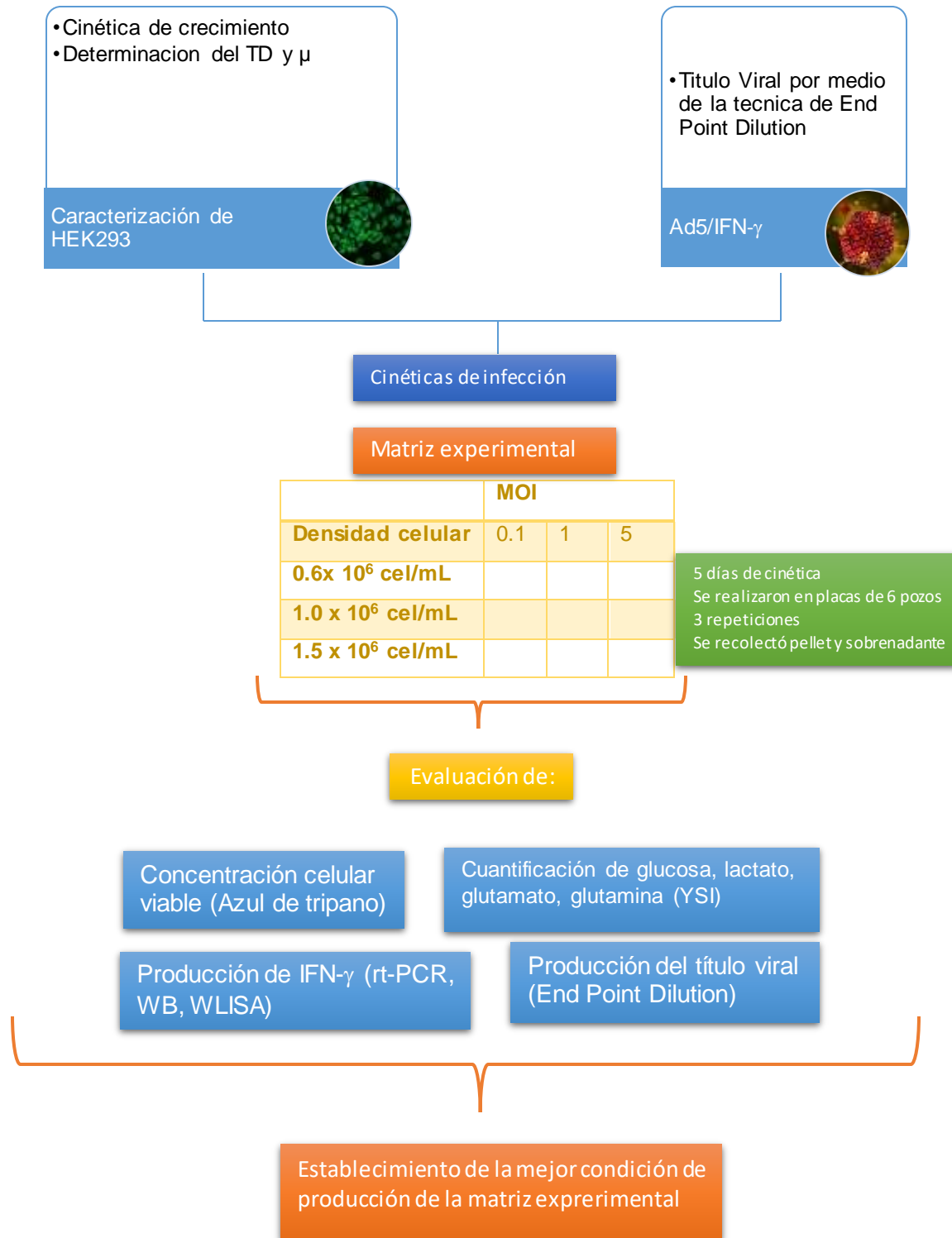
6.1 Objetivo General.

Evaluar el efecto de la Multiplicidad de Infección y la Densidad Celular, sobre el metabolismo celular, la producción de IFN- γ y el título adenoviral usando el sistema de expresión transitorio HEK293/Ad5.

6.2 Objetivos específicos.

- Realizar cinética de crecimiento y perfil de metabolitos para caracterizar la línea HEK293
- Evaluar el efecto de diferentes densidades celulares y MOI sobre las infecciones de células HEK293 para producir el IFN- γ .
- Evaluar la producción de IFN- γ y del vector adenoviral en cada infección para determinar las condiciones óptimas de producción.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.



8. MATERIALES Y MÉTODOS.

Para cumplir con los objetivos establecidos se utilizaron un conjunto de técnicas que ayudaron a establecer los efectos de la DC y la MOI sobre la producción de IFN- γ y de vectores adenovirales. Se realizó una cinética de crecimiento de la línea HEK293 para determinar su tiempo de duplicación (TD) y velocidad máxima de crecimiento (μ). En la matriz experimental se establecieron las combinaciones y condiciones de infección a evaluar. Los pellets se utilizaron para determinar el número de células viables por medio de la técnica de exclusión con azul de tripano; y el sobrenadante para determinar el consumo de glucosa y glutamina, y la producción de lactato y glutamato, los que se analizaron en el equipo YSI 2200. Por medio de la técnica End Point Dilution, se determinó el título viral del stock de adenovirus utilizado, así como el título de los vectores adenovirales obtenidos en la matriz experimental desarrollada. Finalmente se realizó un Western Blot para confirmar la presencia del IFN- γ . La producción de IFN- γ se determinó por la técnica de ELISA.

8.1. Línea celular.

La línea celular que se utilizó en este trabajo fue HEK293 (Human embryonic kidney) adquirida en ATCC (CRL-1573) la cual es proveniente de riñón de embrión humano. Ésta fue conservada en nitrógeno líquido a -196°C hasta su uso.

8.2 Medios de cultivo.

8.2.1. Medio de cultivo con suero fetal bovino.

El medio de cultivo utilizado fue D-MEM/F-12 (GIBCO No. 12500) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) estéril, de la marca Fetal Bovine Serum, Biowest S1650-500, el cual fue desactivado por calentamiento a 56°C por 50 min. Éste se distribuyó en alícuotas de 50 mL las cuales se mantuvieron congeladas a -20°C hasta su uso.

La preparación del medio de cultivo se realizó mediante la siguiente metodología:

1. Se disolvió el contenido de un sobre de D-MEM/F-12 (GIBCO) en 900 mL de agua estéril para el caso de la concentración al 10% de SFB, homogenizando perfectamente.
2. El medio estaba suplementado con 4 mM de glutamina.
3. Se agregaron al medio 2.438 g de NaHCO_3 y 3.576 g de HEPES de acuerdo a la .

4. Se ajustó el pH a 7.2 en un potenciómetro calibrado y se aforó a 1 L.
5. Se filtró el medio en una unidad de filtración con una membrana de tamaño de poro 0.2 μm (Life Sciences, 74588M) estéril.
6. El medio filtrado se alicuotó en frascos estériles y rotulados con el nombre del medio, marca y lote.
7. Se realizaron pruebas de esterilidad a cada frasco de medio de cultivo fresco de la siguiente manera:

En tubos de vidrio de 10 mL estériles con tapa de rosca y previamente identificados se colocó 1 mL de medio de cultivo recién preparado y filtrado y, 1 mL de caldo nutritivo. Estos se incubaron a 37°C, por 72 horas, y cada 24 horas se revisaban para descartar posible contaminación.

8. Los frascos con medio de cultivo para células animales se mantuvieron en refrigeración a 4 °C.

8.3 Cultivo y mantenimiento celular.

Los cultivos estáticos de células HEK293 se mantuvieron en frascos T (CORNING) de 25 cm^2 y 75 cm^2 a 37°C, 5% de CO_2 , atmósfera húmeda, con un volumen de medio D-MEMF-12 de 5 y 15 mL respectivamente.

8.3.1 Cultivo celular.

1. El proceso se iniciaba con una inspección bajo el microscopio invertido de contraste de fases. Se observaba la confluencia celular con objetivos de 10x, 20x y 40x, el proceso de subcultivo se realizaba cuando la confluencia era mayor al 80%.

El cultivo de células siempre se realizó en la campana de flujo laminar nivel de bioseguridad II.

2. Con una pipeta estéril se retiró el medio de cultivo de la caja T25.
3. Para realizar un lavado de la monocapa celular se agregó 1 mL de PBS 1x (estéril y filtrado), se retiró el PBS y desechó. Este paso está diseñado para eliminar trazas de suero que inhibirían la acción de la tripsina.

4. Se agregaron 1.5 mL de una solución de Tripsina-EDTA 0.25% (SIGMA, 8L0784) para asegurar que la monocapa estuviera completamente cubierta.
5. La caja T se incubó por 4 minutos a 37°C y 5% de CO₂.
6. Se agregó medio para detener la reacción de la tripsina diluyéndola.
7. Se dispersaron las células por pipeteo repetido suave, se pasó la suspensión a un tubo de 15 mL y se centrifugó a 900 rpm/ 5 min.
8. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 mL de medio D-MEM/F-12 al 10% SFB.
9. Esta solución se colocó en la caja T25, se anotó la fecha de subcultivo, número de pase y línea celular sobre la caja.
10. Al final se volvió a observar a microscopio la morfología celular presentada al momento del subcultivo.
11. De acuerdo con el tipo de experimento, las células se ajustaron a la concentración deseada y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂.

Nota: El conteo celular con azul de tripano se realizó después de cada subcultivo.

8.3.2 Conteo celular mediante la técnica de exclusión con azul de tripano.

En este procedimiento, una suspensión de células es mezclada con una solución de azul tripano antes de ser observada bajo el microscopio haciendo uso de un hemocitómetro de Neubauer. El protocolo utilizado en el conteo celular fue:

1. Se preparó una solución de azul de tripano al 10% con PBS 1x.
2. Se limpió la cámara de Neubauer con agua y alcohol, se secó bien con papel.
3. El cubre objetos se acomodó en el centro de la cámara.
4. Se inició con una dilución 1:2, realizada en un tubo eppendorf limpio, se homogenizó completamente la solución con suaves pipeteos.
5. Se colocaron 10 µL de esta mezcla en la cámara de Neubauer y se observó a microscopio.

6. Se contaron entre 30 y 200 células vivas (refringentes, no coloreadas) y muertas (opacas y coloreadas de azul) en diez cuadrantes.

7. Cuando el conteo sobrepasaba las 200 células, se realizaron diluciones más altas y repitieron los pasos anteriores hasta contar entre 30 y 200 células.

9. Los conteos se realizaron por triplicado y se sacó el promedio.

La concentración de células en la suspensión se calculó mediante la siguiente fórmula:

Para las células totales por mililitro (CT/mL):

$$\frac{CT}{mL} = \frac{nct}{\# \text{ de cuadrantes}} (1 \times 10^4)(FD)$$

Para las células viables por mililitro (CV/mL):

$$\frac{CV}{mL} = \frac{ncv}{\# \text{ de cuadrantes}} (1 \times 10^4)(FD)$$

Para el porcentaje de viabilidad:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{CV/ml}{CT/ml} \times 100$$

Donde nct: promedio de células totales contabilizadas (vivas y muertas)

ncv: promedio de células vivas contabilizadas

de cuadrantes: número de cuadrantes en los que se contaron las células

1x10⁴: Factor de la cámara de Neubauer

FD: factor de dilución de la mezcla de células y azul de tripano

8.3.3 Generación del banco celular HEK293.

La línea celular HEK293 se conservó en nitrógeno líquido a -196°C hasta su uso. Se inició a partir del vial ATCC CRL-1573 pase 17 y se utilizó hasta el pase 33 en cultivos estáticos de medio D-MEMF-12 al 10% SFB.

Durante la criopreservación se pueden generar cristales de agua en el interior de la célula y producir un choque osmótico al disminuir el contenido intracelular de ésta, por lo que, para disminuir el daño celular durante la criopreservación, la velocidad de congelación debe tener un alto régimen de control de temperatura y debe usarse un criopreservador. El criopreservador utilizado en este trabajo fue el Dimetilsulfóxido (DMSO) (SIGMA). El protocolo de congelamiento es una modificación de lo reportado en O'Reilly et al., 1994, describiéndose a continuación:

1. Los crioviales se rotularon con los siguientes datos: línea celular, pasaje, No. de células y fecha, nombre de la persona que realizó el proceso.
2. Se siguió el protocolo de cultivo celular hasta el punto de retirar el sobrenadante después de la centrifugación.
3. Se preparó el medio de congelación: 10% DMSO + 90% de medio D-MEM/F-12 suplementado con 20% de SFB.
4. Se resuspendió el pellet celular en un 1 mL de la solución de congelación.
5. Se llenaron las crioviales hasta $\frac{3}{4}$ del volumen total de ésta (siempre se dejó una cámara de aire) y se cerraron cuidando no tocar la boca del criovial.
6. Se colocaron los crioviales a -70°C antes de su almacenamiento en nitrógeno líquido.

8.4 Cinéticas de crecimiento en cultivo estático de las células HEK293.

Las cinéticas de crecimiento se realizaron en cultivos estáticos en medio D-MEM/F-12 (10% de SFB). Éstas se montaron en placas de 6 pozos con un volumen total de 2 mL, partiendo de un inóculo inicial de 2×10^5 cel/mL. La cinética se siguió durante 8 días. Cada condición se hizo por triplicado y, los pozos se disgregaron cada 24 horas. Todo el material que tuvo contacto con las muestras se encontraba estéril.

8.4.1. Recolección de las muestras.

1. Se observó la confluencia celular con el microscopio invertido de contraste de fases con objetivos de 10x, 20x y 40x.
2. Se retiraron los sobrenadantes de los pozos correspondientes con puntas y micropipeta de 1000 μL y se recolectaron en tubos de 15 mL, se centrifugaron a 900 rpm/ 5 minutos.

3. Los sobrenadantes centrifugados se recuperaron en tubos eppendorf de 1 mL, previamente identificados con la línea celular, fecha, y nombre del experimento.
4. Los tapetes celulares de cada pozo se lavaron con 500 μ L de PBS 1X estéril y filtrado, después de 30 segundos se retiró y desechó.
5. Se disgregaron las células con 500 μ L de una solución de Tripsina-EDTA 0.25% (SIGMA, 8L0784) y se incubaron por 4 minutos a 37°C. Pasado este tiempo se sacaron las placas de la incubadora y se paró la reacción de tripsinización con 500 μ L de medio para destripsinizar (medio RPMI).
6. Esta mezcla se retiró de cada pozo y se colocó en el mismo tubo de 15 mL donde se centrifugó el sobrenadante, con la finalidad de asegurar que tanto células vivas como muertas se utilizaran para todos los ensayos.
7. Los tubos se centrifugaron a 900 rpm/5 minutos. Después de la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se recuperó el pellet celular en tubos eppendorf de 1 mL, previamente identificados con la línea celular, fecha, y nombre del experimento.
8. Los sobrenadantes y pellets se guardaron a -80°C hasta su análisis.

8.5 Determinación del título viral.

Con la finalidad de cuantificar las partículas virales infectivas del stock de Ad5/IFN- γ se empleó la técnica de End Point Dilution (punto final de dilución). Esta técnica se basa en la realización de una serie de diluciones a partir de un stock viral, que se incubó en cultivos celulares. Después de cierto tiempo se determinó de manera visual el efecto citopático. A partir de este efecto se calculó la cantidad de partículas virales infectivas /mL mediante un programa estadístico. Esta determinación se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. En dos placas de 96 pozos se sembraron 20,000 células de HEK293 en un volumen final de 100 μ L en medio D-MEM/F-12 (10% de SFB) por pozo.
2. Una vez alcanzada la confluencia del 85%, se procedió a realizar diluciones seriadas del stock del vector Ad5/IFN- γ de la sexta amplificación y del stock Ad5/WT tal como se muestra a continuación:

	D1 10 ¹	D2 10 ²	D3 10 ³	D4 10 ⁴	D5 10 ⁵	D6 10 ⁶	D7 10 ⁷	D8 10 ⁸	D9 10 ⁹	D10 10 ¹⁰	D11 10 ¹¹	D12 10 ¹²	D13 10 ¹³	D14 10 ¹⁴	D15 10 ¹⁵
Vol. Dilución (μL)	10 del Stock Viral	10 de D1	10 de D2	10 de D3	10 de D4	100 de D5	100 de D6	100 de D7	100 de D8	100 de D9	100 de D10	100 de D11	100 de D12	100 de D13	100 de D14
Vol. de DMEM/F12 Sin suero (μL)	90	90	90	90	90	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900

3. Posteriormente, se procedió retirar todo el medio y lavar la placa con PBS 1X, cuidando de no tocar la monocapa celular.

4. Finalmente, se agregaron en cada placa 100 μL de las diluciones preparadas siguiendo la tabla que a continuación se muestra:

	Ctrl (+)	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	Ctrl (-)
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

En la columna de control positivo se usaron células HEK293 infectadas con Ad5/WT; las columnas D fueron pozos de células HEK293 infectadas con las diluciones del vector Ad5/IFN-γ; la columna de control negativo fueron pozos de células HEK293 sin infectar.

La placa se incubó a 37°C a una concentración de CO₂, por 7 días. En el día 4 se agregaron 50 μL de medio D-MEM/F-12 suplementado al 10% de SFB.

5. Al término de los 7 días los pocillos de cada placa se observaron bajo el microscopio para determinar si existía efecto citopático en ellos. Se tomó el dato como positivo (+) para la presencia de efecto citopático y negativo (-) para su ausencia.

6. Después de observar cada pozo los resultados se procesaron en una hoja de cálculo, para conocer el título viral en pvi/mL.

8.6 Cinéticas de infección.

Las cinéticas de infección se realizaron en cultivos estáticos en medio D-MEM/F-12 (10% de SFB), donde se montaron placas de 6 pozos con un volumen de medio de 2 mL, se siguió la matriz experimental planteada a continuación:

	MOI		
	0.1	1	5
Densidad celular			
0.6x 10 ⁶ cel/mL			
1.0 x 10 ⁶ cel/mL			
1.5 x 10 ⁶ cel/mL			

Cada experimento se realizó por triplicado y los pozos se disgregaron cada 24 horas durante 5 días.

8.6.1 Procedimiento para montar las cinéticas de infección.

Células cultivadas en cajas T25 o T75 se disgregaron y contaron por la técnica de azul de tripano, se obtuvo la viabilidad celular y se realizaron los siguientes cálculos para poder inocular cada placa de 6 pozos con la densidad correspondiente:

$$X(ml) = \frac{(Wml) \left(Y \frac{cel}{ml} \right)}{Z \frac{cel}{ml}}$$

Donde

Wml : Volumen final de las 3 placas (36 mL)

$Y \frac{cel}{ml}$: Densidad requerida para el experimento

$Z \frac{cel}{ml}$: Viabilidad de la suspensión de células utilizada

X_{ml} : mL de la suspensión de células contada

1. El volumen requerido de células se aforó a 36 mL con medio D-MEM/F-12 (10% SFB) en un tubo de 50 mL y se homogenizó con una pipeta.
2. Se colocaron 2 mL de esta suspensión en los pozos de cada placa, previamente identificada con fecha, línea celular y densidad.
3. Se taparon las cajas y se les colocó en un extremo una tira pequeña de cinta adhesiva para evitar que al manipular las placas se abrieran.
4. Cada pozo se observó a microscopio.

8.6.2 Proceso de infección.

Las placas previamente inoculadas se infectaron de la siguiente manera:

1. Se realizó la dilución viral utilizando el título que se obtuvo por el método de End Point Dilution, Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

Sabiendo que la MOI corresponde al número de pvi,

$$\# \frac{cel}{ml} \times (MOI) \longrightarrow \frac{pvi}{ml}$$

Donde

$\# \frac{cel}{ml}$: corresponde a la densidad celular a infectar

(MOI): Multiplicidad de infección utilizada para esa densidad

$\frac{pvi}{ml}$: Partículas virales infectivas que corresponden a esa MOI

El volumen del stock de Ad5/IFN- γ que se tomó para la infección a la MOI correspondiente se determinó con los siguientes cálculos:

$$X_{ml} = \frac{\left((2 \text{ ml}) \left(a \frac{pvi}{ml} \right) \right)}{b \frac{pvi}{ml}}$$

Donde:

2 ml: Volumen por pozo

$a \frac{pvi}{ml}$: pvi correspondientes a la MOI a infectar

$b \frac{pvi}{ml}$: Título viral

X_{ml} : mL que se deben tomar del stock viral para infectar a la correspondiente MOI (si la cantidad es muy pequeña transformar a μ l).

Estos mL se multiplicaron por el número de pozos a infectar. Teniendo estos datos se realizó la dilución del stock viral:

En un tubo de 50 mL se colocaron 27 mL de medio D-MEMF-12 libre de SFB. Con una micropipeta se colocaron los mL o μ L del stock viral obtenidos por los cálculos anteriores y se resuspendieron con una pipeta, teniendo cuidado de no formar burbujas.

2. Se retiró el medio de las células y se lavaron con 500 μ L de PBS 1X (estéril y filtrado).
3. Se agregaron 1.8 mL de la dilución viral a cada pozo, excepto los controles, a estos se les agregó 1.8 mL de medio D-MEMF-12 libre de SFB.
4. Se colocó la tapa a cada placa y se identificó con la MOI a la que se infectó.
5. Se homogenizó el medio con suaves movimientos circulares y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂.
6. Tres horas después de la infección, se agregaron a cada pozo 0.2 mL de SFB, y se homogenizó con suaves movimientos circulares.
7. Las placas se incubaron a 37°C, 5% de CO₂.
8. Cada 24 horas se recolectaron sobrenadantes y pellets como se indica en el apartado 7.4.1. Recolección de las muestras. Los tubos eppendorf se identificaron previamente con fecha, densidad celular, MOI, tiempo de recolección y experimento.

8.7 Conteo celular de las cinéticas de infección.

El conteo celular de las cinéticas de infección se realizó de acuerdo al apartado 7.3.3 Conteo celular mediante la técnica de exclusión con azul de tripano.

8.8 Cuantificación de metabolitos.

Existen varios sistemas comerciales disponibles, para la cuantificación de metabolitos; por ejemplo; BioProfile Flex (Nova Biomedical, Waltham, USA), CedexBio (Roche Diagnostics,

Mannheim, Germany) o YSI (YSI, Yellow Springs Instruments; Yellow Springs, USA). Los tres analizadores son, entre otros, capaces de determinar las concentraciones de glucosa, L-glutamina, lactato y amoniaco en soluciones acuosas.

El estado metabólico de las cinéticas de infección se caracterizó en cuanto al consumo de glucosa y glutamina, y la producción de lactato y glutamato, utilizando un analizador bioquímico (YSI 2200), que se basa en principios enzimáticos. El analizador tiene sondas equipadas con una membrana de tres capas, que contiene enzimas inmovilizadas en la capa media.

Se analizaron los sobrenadantes de cada condición de infección.

1. Las muestras fueron sacadas de su resguardo de -80°C .
2. Se descongelaron a temperatura ambiente.
3. Se centrifugaron a 3000 rpm/10 min.
4. En un tubo eppendorf nuevo y previamente identificado, se alicuotaron 50 μL de cada muestra.
5. Las muestras se analizaron en el YSI 2200, los datos obtenidos se graficaron y se realizaron cálculos de velocidad de consumo y producción de cada metabolito.

8.9 Western Blot de IFN- γ de los sobrenadantes.

Western Blot es una técnica analítica, ampliamente utilizada, para el estudio de proteínas, este método que fue descrito por primera vez por Towbin, *et. al* en 1979, permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica, esta especificidad de se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés.

Con la técnica de Western Blot se puede estimar el tamaño de una proteína, confirmar la presencia de modificaciones postraduccionales como la fosforilación o la glicosilación y ser utilizado para comparar cuantitativamente los niveles de proteína entre muestras.

Esta técnica permite transferir las proteínas de un gel de poliacrilamida a una membrana absorbente, siendo las proteínas transferidas a la membrana una copia exacta del gel donde han sido separadas por electroforesis. Esta membrana es incubada con dos

anticuerpos; el anticuerpo primario se une a las proteínas de la membrana, mientras que el anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario. Una vez terminado el tiempo de incubación, se añade un fluoróforo (peroxidasa de rábano), el cual emitirá una luz que nosotros vemos en forma de bandas (las cuales corresponden a las proteínas) (Jensen, 2012; Kurien & Scofield, 2006; Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979).

8.9.1 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

La identificación del IFN- γ secretado al medio de cultivo por las células infectadas, se realizó por una separación de proteínas mediante SDS-PAGE. Se utilizó un gel prefabricado marca BIO-RAD Mini- PROTEAN® TGX™ (4 – 20%).

1. Las muestras fueron sacadas de su resguardo de -80°C y se descongelaron a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 3000 rpm/10 min, se alicuotaron 50 μL de cada muestra en tubos eppendorf nuevos y previamente identificados.
2. En otros tubos eppendorf nuevos y previamente identificados se colocaron 7.5 μL de cada muestra, incluyendo el control negativo y se les agregaron 7.5 μL de Loading Buffer 2x con beta mercaptoetanol, para un volumen final de 15 μL .
3. Para el control positivo, se colocaron 5 μL del estándar de IFN γ utilizado para el ELISA (Human IFN gamma, Platinum ELISA, BMS228, affymetrix eBioscience, 114398000), 7.5 μL Loading Buffer 2x con beta mercaptoetanol y 2.5 μL de PBS 1x (estéril y filtrado). Volumen final 15 μL .
4. Las muestras y controles se colocaron en el termoblock por 5 minutos a 95°C .
5. Transcurridos los 5 minutos, las muestras se centrifugaron por unos segundos y se cargaron en el gel, se mezclaron los 15 μL de cada muestra y 3 μL del marcador de peso molecular. Las condiciones usadas fueron las siguientes: 200 V/ 1 hora.

8.9.2 Electrotransferencia en cámara húmeda.

Después del SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, siguiendo las instrucciones del fabricante (Comparative Proteomics Kits I and II: Protein Profiler Module and Western Blot Module #1662850EDU).

1. Para comprobar la transferencia de proteínas, la membrana de nitrocelulosa se colocó en un recipiente y se tiñó con rojo Ponceau por 20 min en agitación. Se lavó con buffer TBST 1x hasta quitar el colorante.
2. La membrana se bloqueó incubándola toda la noche con leche Svelty al 5% en temperatura de refrigeración.

8.9.3 Incubación con anticuerpos.

1. Al día siguiente se retiró la leche y la membrana se enjuagó con 10 mL de TBST 1x (3 lavados de 10 minutos cada uno).
2. Se agregó el anticuerpo primario anti-IFN- γ Gene Tex GTX100452 (Ig G policlonal de conejo) al recipiente que contenía la membrana, y se incubó por una hora en agitación constante y a temperatura ambiente. El anticuerpo se preparó de la siguiente manera: 5 mL de TBST 1x con 0.1 % de leche y 5 μ l del anticuerpo.
3. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se desechó la solución con el primer anticuerpo y la membrana se lavó tres veces por 10 minutos con el buffer TBST 1x.
4. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario Gt XRblgG (H+L) Millipore AP132A (Ig G policlonal anti conejo de cabra) y se incubó por una hora en agitación constante y a temperatura ambiente. El anticuerpo se preparó de la siguiente manera: 5 mL de TBST 1x y 2 μ l del anticuerpo.
5. Transcurrido el tiempo de incubación se desechó la solución con el segundo anticuerpo y la membrana se lavó tres veces por 10 minutos con el buffer TBST 1X.
6. Posteriormente se reveló la membrana con los reactivos Clarity™ Western ECI Substrate de BIO-RAD.

8.10 ELISA del IFN- γ .

La técnica ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) es una técnica en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro.

8.10.1 Procedimiento de ELISA IFN- γ

El IFN- γ de los sobrenadantes se cuantificó con el kit Human IFN gamma, Platinum ELISA, BMS228, affymetrix eBioscience el protocolo que se siguió se menciona a continuación:

Las muestras fueron sacadas de su resguardo de -80°C y se descongelaron a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 3000 rpm/10 min, se alicuotaron 50 μL de cada muestra en tubos eppendorf nuevos y previamente identificados.

Antes de iniciar con el protocolo de ELISA se realizaron las diluciones de los buffer y Estandar a utilizar, de acuerdo a las tablas incluidas en el protocolo de la técnica.

Posteriormente se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

1. Se determinó el número de tiras de micropocillos necesarias de acuerdo a la Tabla 10.
2. Se lavaron los micropocillos dos veces con 400 μL de buffer de Lavado, esto con ayuda de una micropipeta multicanal y, se desechó el buffer de lavado.

Tabla 9. Guía para montar la placa de ELISA

	1	2	3	4
A	Estándar 1 (100.0 pg/mL)	Estándar 1 (100.0 pg/mL)	Muestra 1	Muestra 1
B	Estándar 2 (50.0 pg/mL)	Estándar 2 (50.0 pg/mL)	Muestra 2	Muestra 2
C	Estándar 3 (25.0 pg/mL)	Estándar 3 (25.0 pg/mL)	Muestra 3	Muestra 3
D	Estándar 4 (12.5 pg/mL)	Estándar 4 (12.5 pg/mL)	Muestra 4	Muestra 4
E	Estándar 5 (6.3 pg/mL)	Estándar 5 (6.3 pg/mL)	Muestra 5	Muestra 5
F	Estándar 6 (3.1 pg/mL)	Estándar 6 (3.1 pg/mL)	Muestra 6	Muestra 6
G	Estándar 7 (1.6 pg/mL)	Estándar 7 (1.6 pg/mL)	Muestra 7	Muestra 7
H	Blanco	Blanco	Muestra 8	Muestra 8

3. Se agregó en cada pozo destinado a la curva estándar, la dilución del mismo (letra A-G).
4. Se añadieron 100 μL de Diluyente de muestra, a los pocillos identificados como Blanco.
5. Se añadieron 50 μL de Diluyente de muestra a los pocillos identificados como Muestra.
6. Se añadieron 50 μL de muestra, a los pocillos de Muestra designados.

Todas las muestras, estándar y blancos se analizaron por duplicado, de acuerdo a las indicaciones de la técnica.

7. Se preparó el conjugado de Biotina y se añadieron 50 μL a todos los pocillos.
8. Se cubrieron los pocillos con la película adhesiva y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente (18° a 25°C) a 400 rpm.
9. Se preparó la Estreptavidina-HRP.
10. Se removió la película adhesiva, se vaciaron y lavaron los pocillos 3 veces con 400 μL del tampón de lavado.
11. Se añadieron 100 μL de Estreptavidina-HRP diluida a todos los pocillos, incluyendo los blancos.
12. Se cubrieron las tiras de pocillos con la película adhesiva y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente (18° a 25°C) a 400 rpm.
13. Se removió la película adhesiva, se vaciaron y lavaron los pocillos 3 veces con 400 μL del tampón de lavado.
14. Se añadieron 100 μL de solución de sustrato TMB a todos los pocillos.
15. Se cubrieron los pocillos con papel aluminio, para evitar la exposición directa con la luz y se incubaron aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente (18° a 25°C) a 400 rpm.
16. La solución de parada se agregó cuando la DO (densidad óptica) del estándar 1 se encuentre entre 0.9-0.95 a 620 nm.
17. Se añadieron 100 μL de solución de parada a todos los pocillos.
18. Se leyó la absorbancia de cada pocillo usando a 450 nm.

8.10.2 Cálculo de resultados.

- Se calcularon los valores medios de absorbancia para cada duplicado de estándar y muestras.
- Se creó una curva estándar trazando la absorbancia media para cada concentración estándar en ordenadas frente a la concentración de IFN- γ humano en abscisas y se graficó una curva que mejor se ajustó a través de los puntos del gráfico.

- Para determinar la concentración de IFN- γ humano circulante para cada muestra, se utilizó la ecuación de la recta.
- Las muestras se diluyeron 1: 2 (50 μ l de muestra + 50 μ l de Diluyente de muestra) y la concentración leída de la curva estándar se multiplico por el factor de dilución (2X).

9. RESULTADOS.

9.1 Morfología y cinética de crecimiento de la línea celular HEK293.

9.1.1 Morfología de HEK293 en cultivos estáticos.

La caracterización del cultivo se realizó a diferentes niveles, empezando por la morfología de la línea celular. Como se muestra en la Figura 9, los cultivos estáticos de células HEK293 en medio D-MEM/F-12 al 10% de SFB, presentan morfología de tipo fibroblástica donde las células adoptan formas irregulares o fusiformes ya que crecen adheridas a la superficie tratada de cajas T debido a que estas células producen proteínas de adhesión formando una red proteica o monocapa de células; ésta es la razón por la que se usa un agente proteolítico (Tripsina) para disgregar la monocapa y permitir el subcultivo.



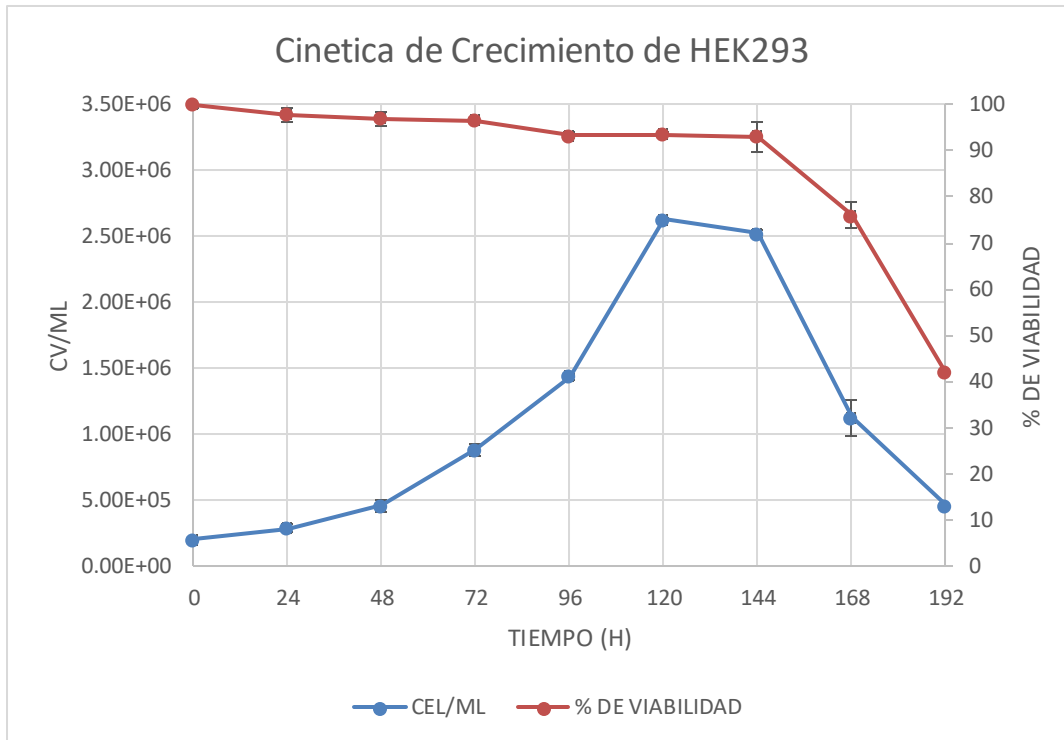
Figura 8. Morfología de cultivos estáticos de HEK293

Morfología de cultivos de células HEK293 vistas en microscopio invertido (10x). Cultivo estático en medio D-MEM/F-12 al 10% de SFB.

9.1.2 Cinética de Crecimiento.

Se realizó la cinética de crecimiento de la línea celular HEK293 en cultivos estáticos con medio D-MEM/F-12 al 10% de SFB, pase 20. Como se puede observar en la gráfica 1, la curva tiene una duración de 8 días, en los cuales la viabilidad llegó hasta un mínimo de 42% durante el último día; se observa que la fase lag tiene una duración de 48 horas, la

fase exponencial 72 horas y la fase estacionaria 24 horas. La velocidad específica de crecimiento (μ) calculada fue de 0.027 h^{-1} que corresponde a un tiempo de duplicación de 25.45 h, y la máxima concentración celular fue de $2.63 \times 10^6 \text{ cel/mL}$, obtenida a las 120 horas.



Gráfica 1. Cinética de crecimiento de la línea celular HEK293

La Gráfica corresponde a la Cinética de crecimiento de la línea celular HEK293 en cultivo estático en DMEM/F12 (10% SFB), la línea azul corresponde a las células viables/mL, la línea roja al % de viabilidad, las barras corresponden a la desviación estándar. Los experimentos se realizaron por triplicado.

La μ obtenida en este trabajo (0.027 h^{-1}) concuerda con lo reportado por (Tavira, 2014), quien estableció que al utilizar un pase 39, su velocidad específica de crecimiento (μ) corresponde a 0.028 h^{-1} .

9.2 Determinación del título del stock adenoviral.

La determinación del título viral se realizó por la técnica de End Point Dilution (punto final de dilución) que consiste en realizar una serie de diluciones a partir de un stock viral, las cuales se incuban en cultivos celulares de la línea HEK293. El número de cultivos infectados se determina de manera visual, se busca el efecto citopático en cada dilución, y a partir de este efecto se calcula mediante un programa estadístico la cantidad de partículas virales infectivas por mL. El efecto citopático por lo general, consiste en aumento de volumen, redondeamiento y agregación de las células afectadas en racimos como de uvas, que se puede apreciar en la Figura 10.

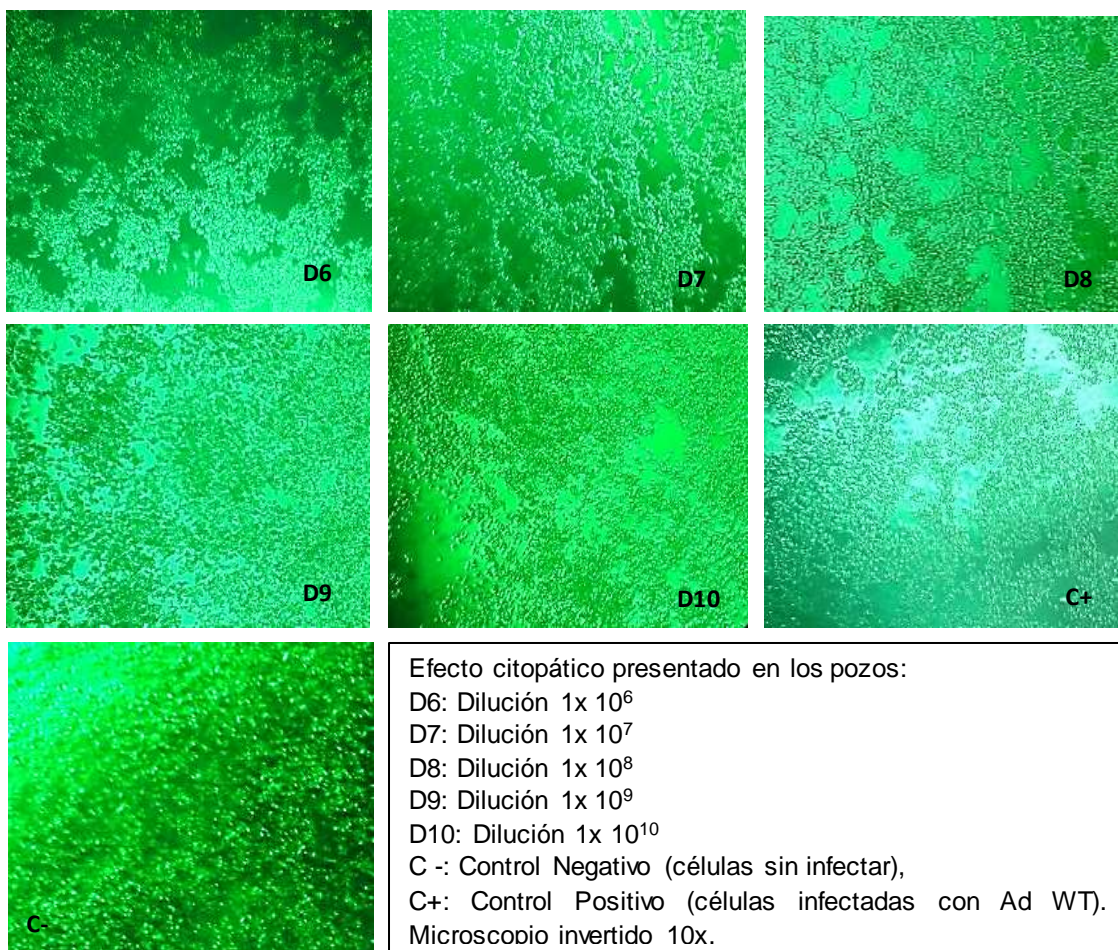


Figura 9. End Point Dilution. Determinación del título viral del stock Ad5/IFNY.

En la Figura 10, se observa la morfología de diferentes diluciones usadas para obtener el título viral del stock Ad5/IFN- γ , se puede apreciar que a mayor dilución menor es el efecto citopático observado. De acuerdo al análisis estadístico realizado mediante el método de

Reed and Muench (Reed & Muench, 1958), el título viral que se obtuvo para el AdenoIFN- γ fue de 5.5×10^{10} pvi/mL,

9.3 Cinéticas de Infección.

Una vez conocidas las células y establecido el título viral, se estableció la matriz experimental que inicialmente generó un total de 9 combinaciones de las variables a evaluar, según se describe en la Figura 11. Una vez infectados los cultivos, se colectaron muestras cada 24 horas y se realizaron análisis para detectar diferencias en el crecimiento celular, evaluación del metabolismo celular, generación de adenovirus y producción de proteína, causadas por las condiciones de cultivo e infección utilizadas.

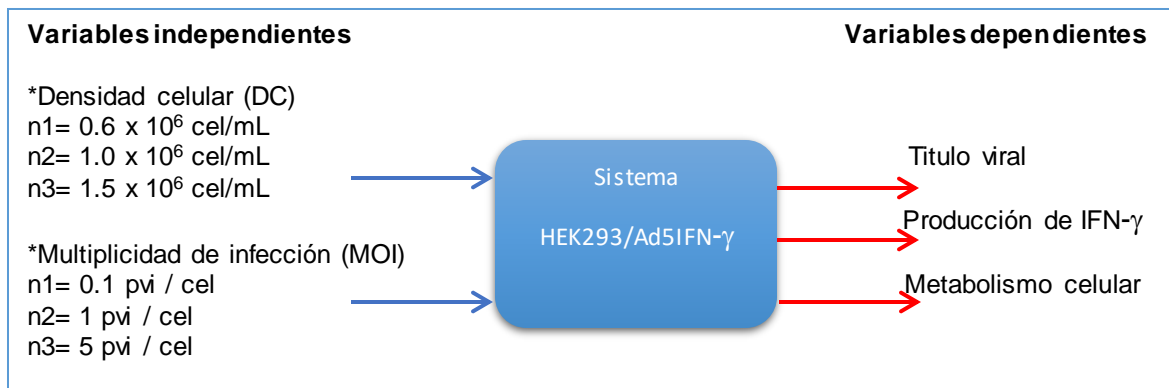


Figura 10. Variables dependientes e independientes de la matriz experimental

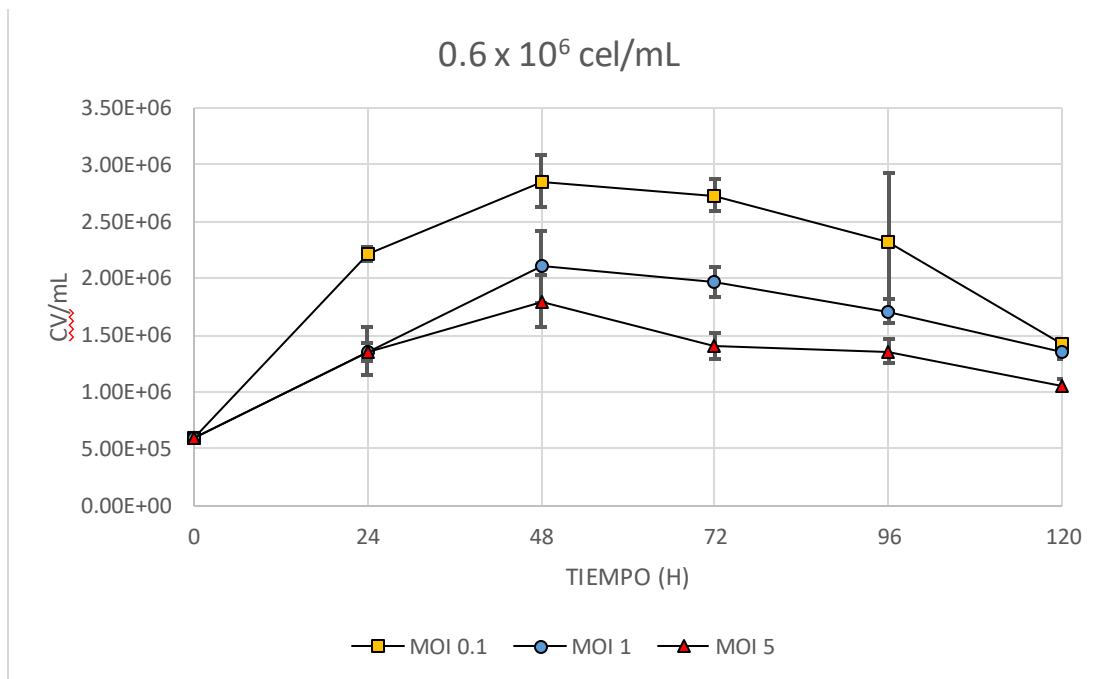
9.3.1 Efecto de la MOI y la DC sobre la viabilidad.

En las gráficas 2,3 y 4 se muestran las cinéticas de infección a densidades 0.6×10^6 , 1×10^6 y 1.5×10^6 cel/mL, respectivamente. En ellas se puede observar que, las infecciones utilizando la MOI más pequeña (0.1), permiten un mayor crecimiento celular; mientras que, al infectar los cultivos con la MOI más alta (5), la concentración celular viable alcanzada es la más baja. En la tabla 11 se muestran los mayores rendimientos de las células viables obtenidas en cada cinética de infección, estos se obtuvieron a las 48 horas post infección (p.i.).

Tabla 10. Rendimientos de la concentración celular viable obtenida a las 48 horas p.i.

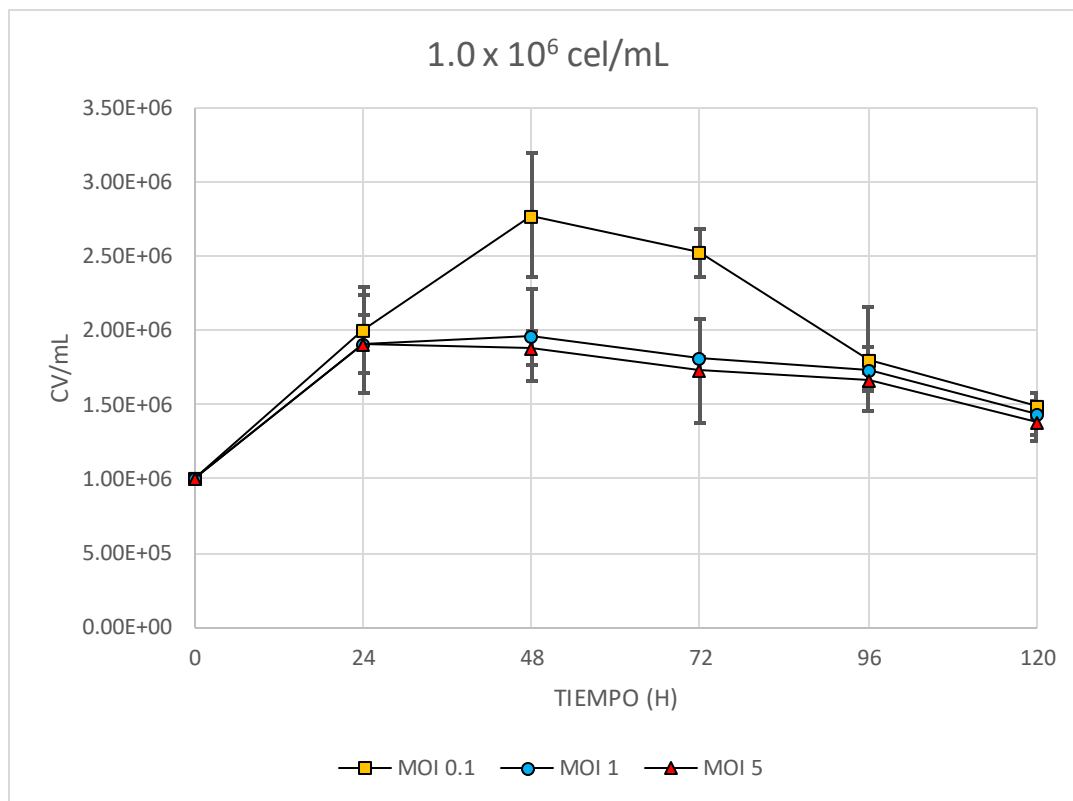
MOI	Densidad celular viable (cel/mL)		
	0.6	1	1.5
0.1	$2.85 \times 10^6 \pm 2.27 \times 10^5$	$2.78 \times 10^6 \pm 4.16 \times 10^5$	$3.08 \times 10^6 \pm 6.69 \times 10^4$
1	$2.10 \times 10^6 \pm 3.17 \times 10^5$	$1.97 \times 10^6 \pm 3.13 \times 10^5$	$1.79 \times 10^6 \pm 5.42 \times 10^4$
5	$1.80 \times 10^6 \pm 2.28 \times 10^5$	$1.91 \times 10^6 \pm 1.95 \times 10^5$	$1.78 \times 10^6 \pm 7.54 \times 10^4$

Se puede observar que la MOI más adecuada para permitir un crecimiento celular es la más baja, es decir 0.1, y que la máxima concentración celular viable se alcanza a las 48 horas p.i.; resultados que concuerdan con lo reportado por (Yamada et al., 2009). También se puede observar que conforme aumenta la DC, la diferencia de células viables entre las infecciones con MOI 1 y 5 se hacen menores.



Gráfica 2. Cinética de infección a densidad 0.6×10^6 cel/mL

En esta gráfica se puede apreciar el efecto de la MOI sobre la concentración celular viable, se infectaron 0.6×10^6 cel/mL a MOI 0.1, 1 y 5, los experimentos se realizaron en placas de 6 pozos y se recolecto el pellet celular cada 24 horas. Las barras representan la desviación estándar de los experimentos que se realizaron por triplicado.



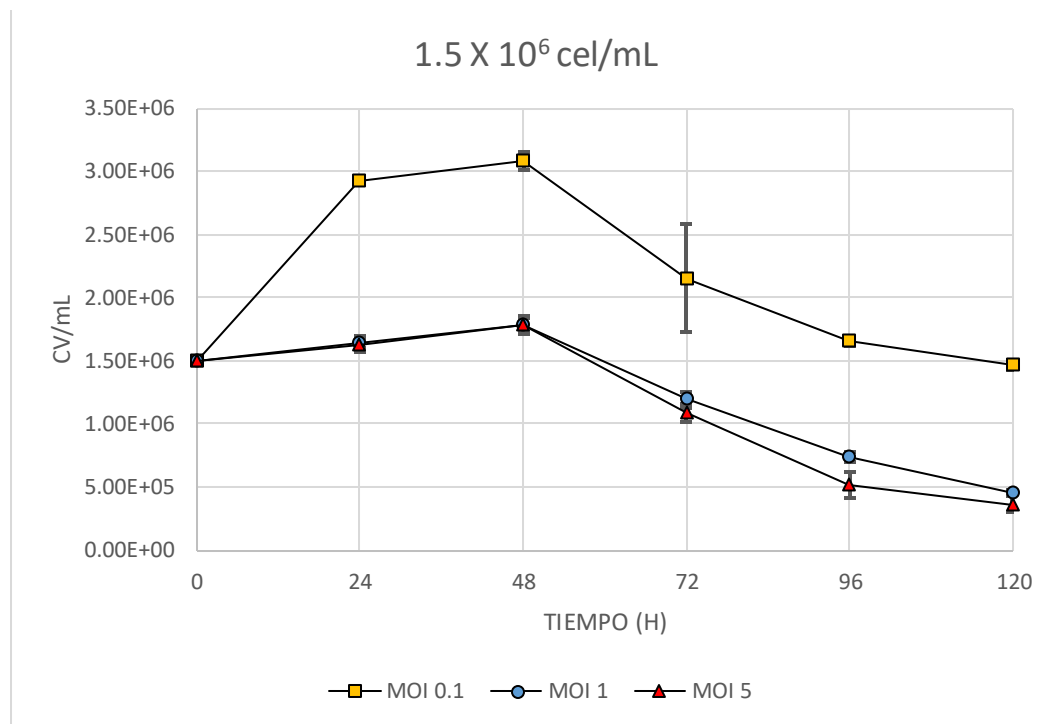
Gráfica 3. Cinética de infección a densidad 1×10^6 cel/mL

En esta gráfica se puede apreciar el efecto de la MOI sobre la concentración celular viable, se infectaron 1×10^6 cel/mL a MOI 0.1, 1 y 5, los experimentos se realizaron en placas de 6 pozos y se recolectó el pellet celular cada 24 horas. Las barras representan la desviación estándar de los experimentos que se realizaron por triplicado.

En las gráficas anteriores (2,3 y4), se puede observar el efecto que ejercen la MOI y la DC sobre el crecimiento celular de HEK293 durante el proceso de infección, pues la concentración celular viable disminuye a un intervalo de tiempo menor cuando se utilizan la MOI de 1 y 5 en combinación con las densidades de 1×10^6 cel/mL y 1.5×10^6 cel/mL, es decir, que con las infecciones con densidad 0.6×10^6 cel/mL y MOI 0.1, la concentración celular viable comienza a decrecer a las 96 horas p.i.; a MOI 1 decrece a las 72 horas y a MOI 5 a las 48 horas. Las infecciones con densidad 1×10^6 cel/mL y MOI 0.1, la concentración celular viable comienza a decrecer drásticamente a las 72 horas p.i.; a MOI 1 decrece a las 48 horas y a MOI 5 a las 48 horas. Las infecciones con densidad 1.5×10^6 cel/mL y MOI 0.1, la concentración celular viable comienza a decrecer marcadamente a las 48 horas p.i.; a MOI 1 decrece a las 48 horas y a MOI 5 a las 48 horas. Estos tiempos son importantes porque son los puntos de máxima viabilidad de células infectadas que podrían

ser cosechadas y para próximos estudios estas máximas viabilidades podrían usarse de referencia para un reemplazo de medio.

Se observó también que a las 48 horas p.i, las células infectadas alcanzan su máxima concentración celular viable, que decrece gradualmente durante el proceso de experimentación, la disminución drástica de la DC después de las 48 horas puede deberse al hecho de que la mayoría de las células comenzaron a liberar los vectores adenovirales al medio acompañados por algunos compuestos intracelulares como las enzimas proteolíticas, que afectan a las células vecinas de la monocapa, esto en combinación con la acumulación de productos del metabolismo celular en el medio, pueden causar la disminución de la DC (Kamen & Henry, 2004).



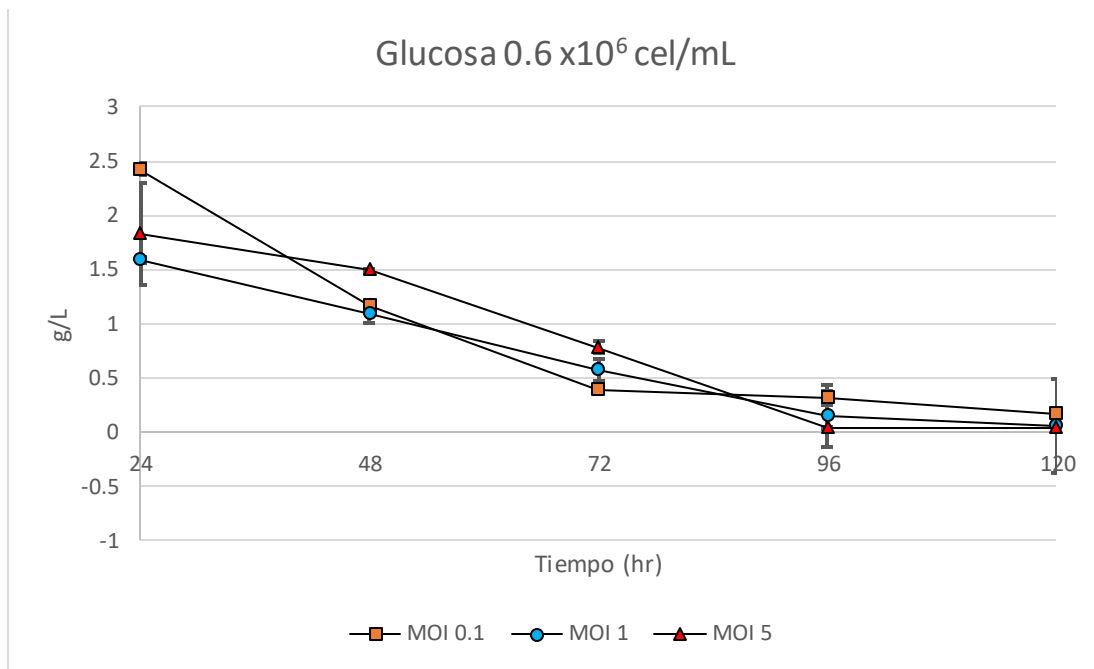
Gráfica 4. Cinética de infección a densidad 1.5 x 10⁶ cel/mL

En la gráfica se puede observar que la MOI afecta el crecimiento celular de los cultivos estáticos de HEK293, densidad 1.5 x 10⁶ cel/mL, siendo la MOI más baja usada la que permite un mayor crecimiento celular.

Las barras representan la desviación estándar de los experimentos que se realizaron por triplicado.

9.3.2 Evaluación del metabolismo celular en las cinéticas de infección.

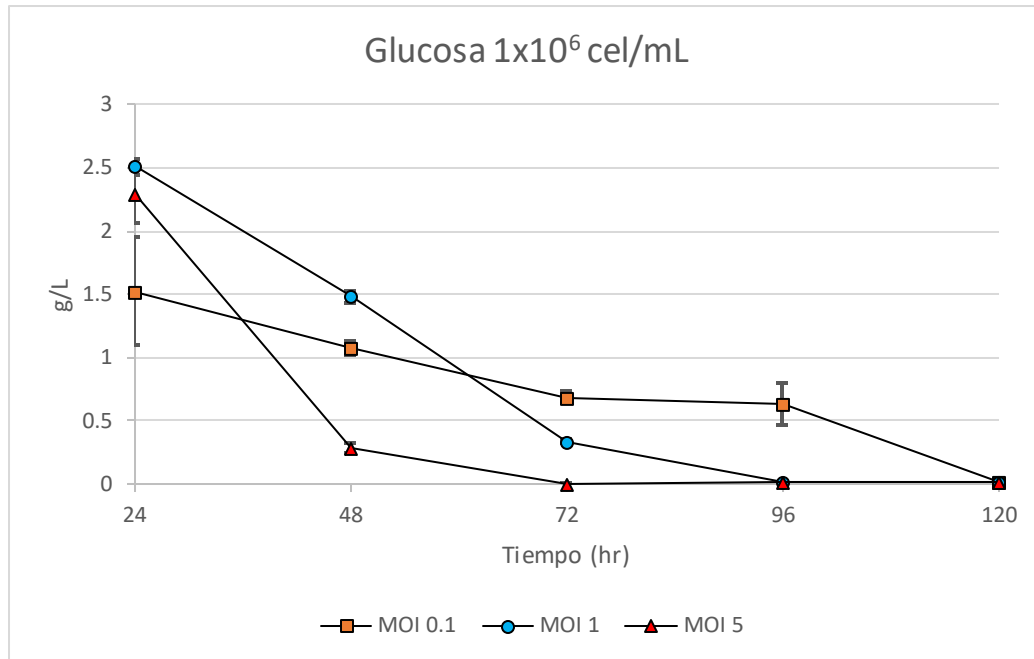
Glucosa: La glucosa está incluida en la mayoría de los medios como fuente de energía. Se metaboliza principalmente por la glucólisis para formar piruvato, que se puede convertir en lactato o acetoacetato y puede entrar en el ciclo del ácido cítrico para la síntesis de ATP mediante su oxidación hasta CO_2 y agua (Freshney, 2005).



Gráfica 5. Consumo de glucosa en la cinética de 0.6×10^6 cel/mL

En esta gráfica se puede observar el efecto de la MOI sobre el consumo de glucosa, a una densidad de 0.6×10^6 cel/ mL de HEK293 creciendo en adherencia; los sobrenadantes se recolectaron cada 24 horas, y se analizaron en el YSI 2200. Las barras indican la desviación estándar de los experimentos que se realizaron por triplicado.

En la gráfica 5 (densidad 0.6×10^6 cel/mL), se observa que la glucosa estaba a punto de agotarse al momento de la recolección de la última muestra, es decir a las 120 horas p.i., las mediciones que se obtuvieron son las siguientes: a MOI 0.1 la glucosa remanente fue de 0.161 g/L, con MOI 1 la glucosa fue de 0.062 g/L y MOI 5 la glucosa remanente fue de 0.036 g/L; datos que indican que al someter las células HEK293 a una mayor concentración viral, éstas consumen una mayor cantidad de energía para poder suplir los requerimientos de energía de la célula.

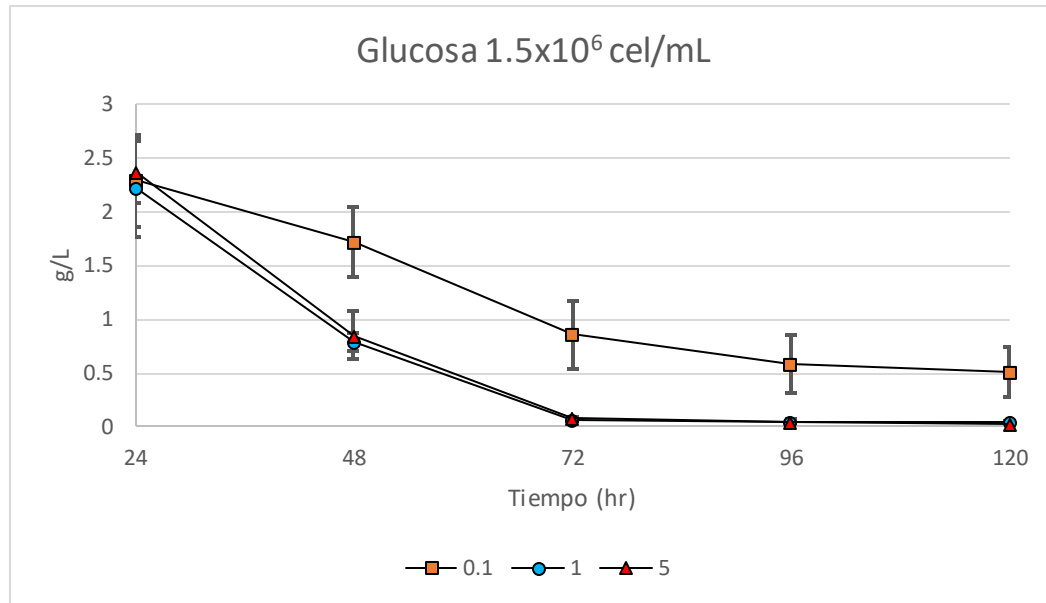


Gráfica 6. Consumo de Glucosa en la cinética de 1×10^6 cel/mL

En esta gráfica se puede observar el efecto de la MOI sobre el consumo de glucosa, a una densidad de 1×10^6 cel/ mL de HEK293 creciendo en adherencia; los sobrenadantes se recolectaron cada 24 horas, y se analizaron en el YSI 2200.

Las barras indican la desviación estándar de los experimentos que se realizaron por triplicado.

La gráfica 6 (densidad 1×10^6 cel/mL), muestra la glucosa remanente al momento de la recolección de la última muestra, es decir a las 120 horas p.i., los datos que a continuación se muestran indican que la glucosa prácticamente se encontraba agotada: a MOI 0.1 la glucosa remanente era de 0.011 g/L, con MOI 1 la glucosa era de 0.017 g/L y MOI 5 la glucosa remanente era de 0.016 g/L. Estos datos muestran una inconsistencia en comparación con la gráfica 5, donde los resultados indican que entre mayor era la MOI utilizada mayor era el consumo de glucosa, pues la producción de adenovirus impone una alta carga metabólica a la célula (Palomares & Chavez-Peña, 2010).



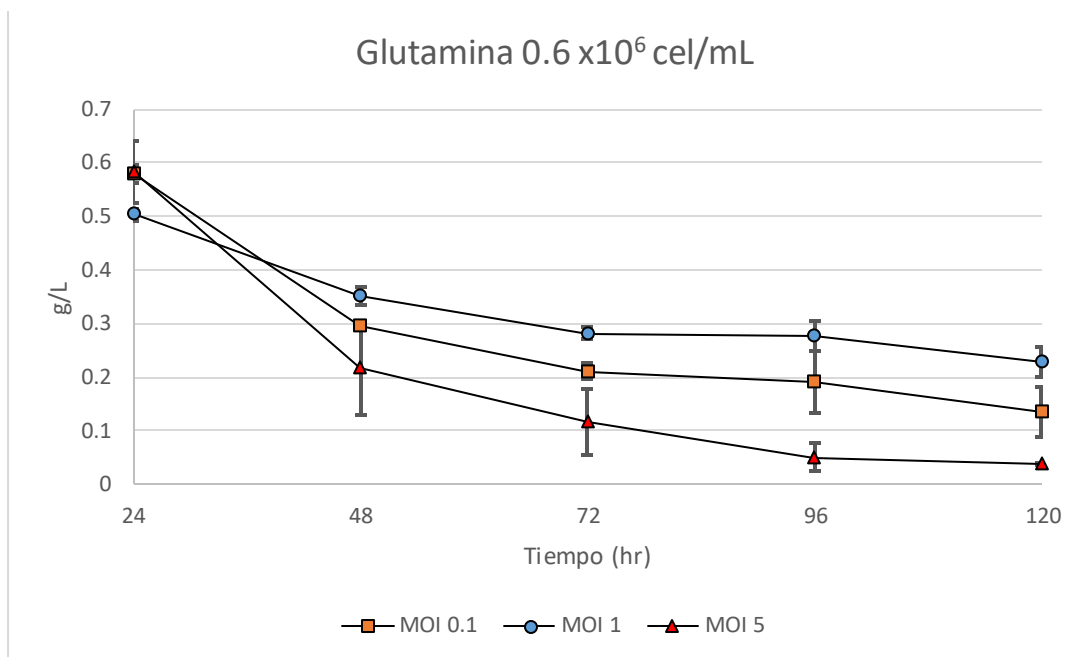
Gráfica 7. Consumo de glucosa en la cinética de 1.5 x 10⁶ cel/mL

En esta gráfica se puede observar el efecto de la MOI sobre el consumo de glucosa, a una densidad de 1.5 x 10⁶ cel/ mL de HEK293 creciendo en adherencia; los sobrenadantes se recolectaron cada 24 horas, y se analizaron en el YSI 2200. Las barras indican la desviación estándar de los experimentos que se realizaron por triplicado.

En la gráfica 7 se observan los consumos de glucosa a densidad 1.5x10⁶ cel/ML. La infección a MOI 1 obtuvo una glucosa remanente de 0.042 g/L y la MOI de 5 obtuvo 0.032 g/L, las infecciones con estas MOI son las que realizan un mayor consumo de glucosa, mientras que las infecciones con MOI 0.1 la glucosa remanente fue de 0.509 g/L de glucosa. Estos datos demuestran los efectos de la DC y MOI sobre el consumo de energía, es decir la producción de adenovirus recombinante y de la proteína recombinante *per se* imponen una alta carga metabólica a la célula, además de un mayor consumo debido a la densidad celular, lo cual se ve reflejado en el consumo de glucosa.

Glutamina: Los aminoácidos son los bloques de construcción de las proteínas, y por ende son ingredientes obligatorios de todos los medios de cultivo conocidos. Son requeridos para la proliferación celular y al igual que con la glucosa, su disponibilidad determina fuertemente la máxima densidad celular alcanzable. La L-glutamina, un aminoácido esencial, es particularmente importante, pues provee nitrógeno para el NAD, el NADPH y los

nucleótidos, pero además, en líneas celulares es también una fuente de energía secundaria para el metabolismo (Arora, 2013).

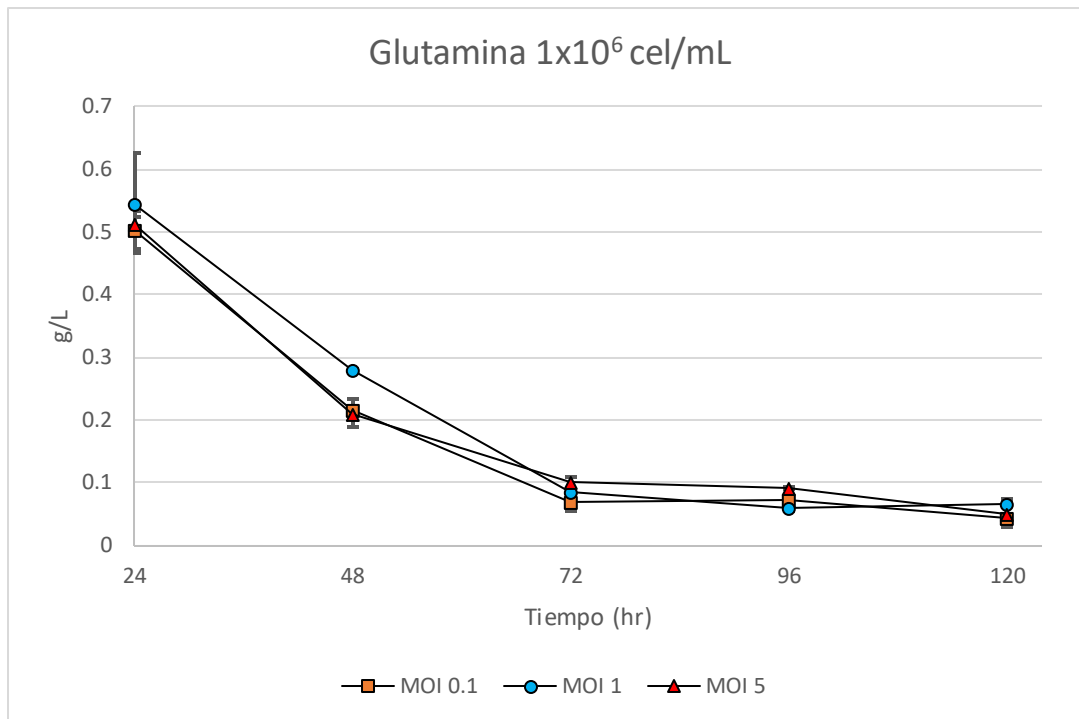


Gráfica 8. Consumo de glutamina en la cinética de 0.6×10^6 cel/mL

En esta gráfica se puede observar el efecto de la MOI sobre el consumo de glutamina, a una densidad de 0.6×10^6 cel/ mL de HEK293 creciendo en adherencia; los sobrenadantes se recolectaron cada 24 horas, y se analizaron en el YSI 2200.

Las barras indican la desviación estándar de los experimentos que se realizaron por triplicado.

La gráfica 8 muestra los consumos de glutamina en las infecciones con densidad celular 0.6×10^6 cel/mL. Las concentraciones de glutamina remanentes son las siguientes: la MOI 0.1 tuvo 0.134 g/L, la MOI de 1 tuvo 0.227 g/L y la MOI de 5 tuvo 0.038 g/L. Como se puede apreciar son las MOI de 0.1 y 5 las que hacen un mayor consumo de glutamina, estos resultados podrían deberse a que es a MOI 0.1 donde se presenta un mayor crecimiento celular (2.85×10^6 cel/mL). Por lo tanto, las células necesitaron mayor cantidad de glutamina para proliferar, ya que ésta es la que proporciona los bloques de construcción de proteínas.

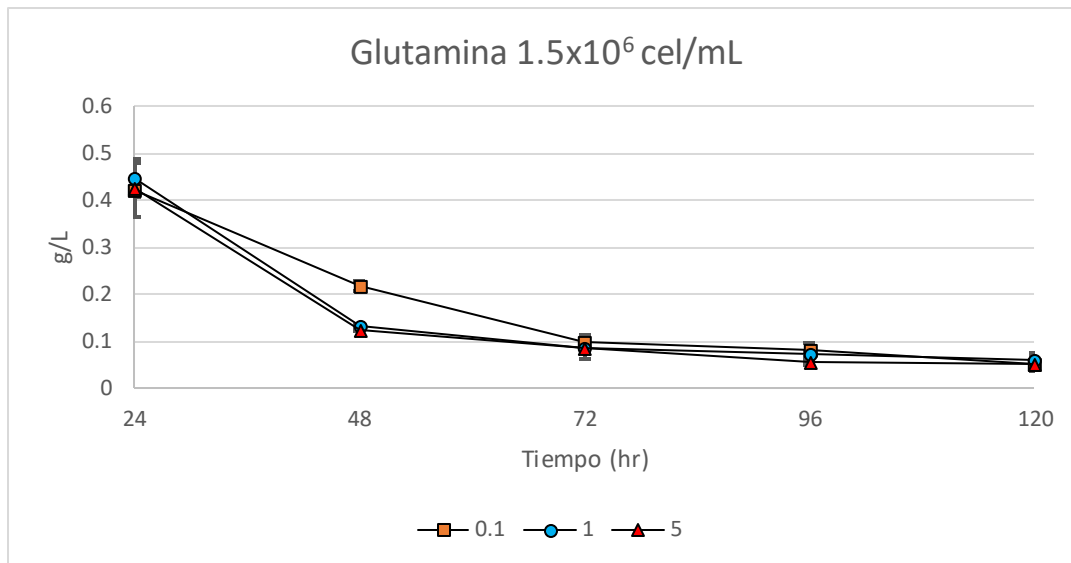


Gráfica 9. Consumo de Glutamina en la cinética de 1 x 10⁶ cel/mL

En esta gráfica se puede observar el efecto de la MOI sobre el consumo de glutamina, a una densidad de 1 x 10⁶ cel/ mL de HEK293 creciendo en adherencia; los sobrenadantes se recolectaron cada 24 horas, y se analizaron en el YSI 2200.

Las barras indican la desviación estándar de los experimentos que se realizaron por triplicado.

En la gráfica 9 se muestran los consumos de glutamina a densidad 1 x 10⁶ cel/mL. La infección a MOI 0.1 obtuvo una glutamina remanente de 0.043 g/L y la MOI de 1 obtuvo 0.067 g/L y la MOI de 5 obtuvo 0.066 g/L. Igual que en la gráfica 8, se aprecia que son las MOI de 0.1 y 5 las que hacen un mayor consumo de glutamina, estos resultados podrían deberse a que es a MOI 0.1 donde se presenta un mayor crecimiento celular (2.78 x 10⁶ cel/mL), por lo tanto, las células necesitaron mayor cantidad de glutamina para proliferar.

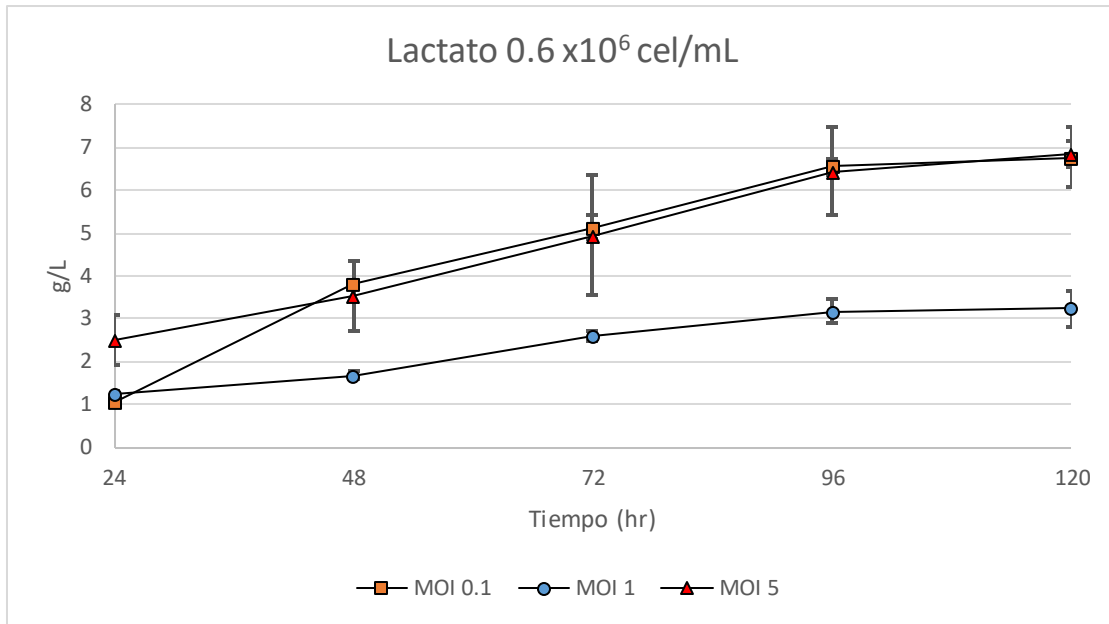


Gráfica 10. Consumo de glucosa en la cinética de 1.5×10^6 cel/mL

En esta gráfica se puede observar el efecto de la MOI sobre el consumo de glutamina, a una densidad de 1.5×10^6 cel/ mL de HEK293 creciendo en adherencia; los sobrenadantes se recolectaron cada 24 horas, y se analizaron en el YSI 2200. Las barras indican la desviación estándar de los experimentos que se realizaron por triplicado.

En la gráfica 10 se observan los consumos de glutamina a densidad 1.5×10^6 cel/mL, donde los resultados obtenidos de glutamina remanente son los siguientes: la infección a MOI 0.1 obtuvo una glutamina de 0.067 g/L, la MOI de 1 obtuvo 0.058 g/L y la MOI de 5 obtuvo 0.052 g/L. Con estos resultados se concluye que a una mayor DC y MOI resultan en un mayor consumo de glutamina.

Lactato: Una de las principales consecuencias del comportamiento metabólico de las células animales cultivadas *in vitro* es la formación exacerbada de lactato. Cuando este producto supera ciertas concentraciones críticas, inhibe el crecimiento celular y disminuyen la producción de proteína recombinante.

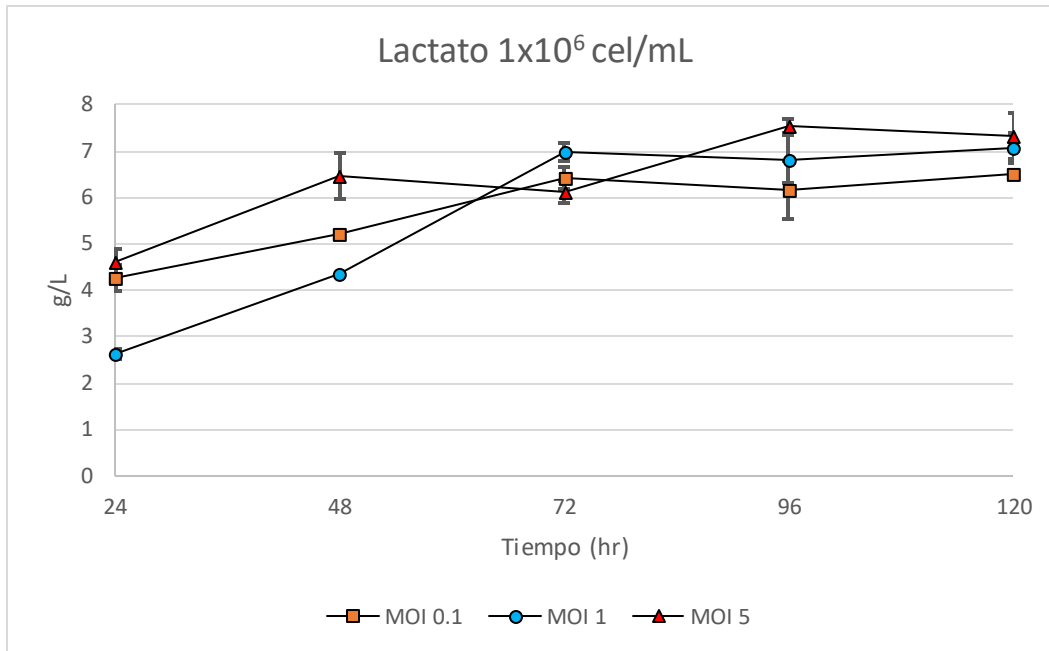


Gráfica 11. Producción de lactato en la cinética de 0.6×10^6 cel/mL

En esta gráfica se puede observar el efecto de la MOI sobre la producción de lactato, a una densidad de 0.6×10^6 cel/ mL de HEK293 creciendo en adherencia; los sobrenadantes se recolectaron cada 24 horas, y se analizaron en el YSI 2200.

Las barras indican la desviación estándar de los experimentos que se realizaron por triplicado.

La gráfica 11 muestra la producción de lactato en las infecciones con densidad celular 0.6×10^6 cel/mL, las concentraciones máximas obtenidas de lactato son las siguientes: la MOI 0.1 tuvo 6.77 g/L, la MOI de 1 tuvo 3.23 g/L y la MOI de 5 tuvo 6.84 g/L, como se puede apreciar son las MOI de 0.1 y 5 las que producen una mayor cantidad de lactato. Estos resultados se relacionan con la viabilidad celular (gráfica 2), con el consumo de glucosa (gráfica 5) y glutamina (gráfica 8), donde se observó que es a MOI 0.1 donde se presenta un mayor crecimiento celular (2.85×10^6 cel/mL), por lo tanto, las células necesitaron mayor cantidad de glutamina para proliferar, y aunque no consumen una mayor cantidad de glucosa a comparación de las otras MOI, este metabolito estaba a punto de agotarse al momento de la recolección de la última muestra. En este caso la combinación de estos factores influyó para generar mayor cantidad de lactato en la infección con MOI 0.1 y no en MOI 1.

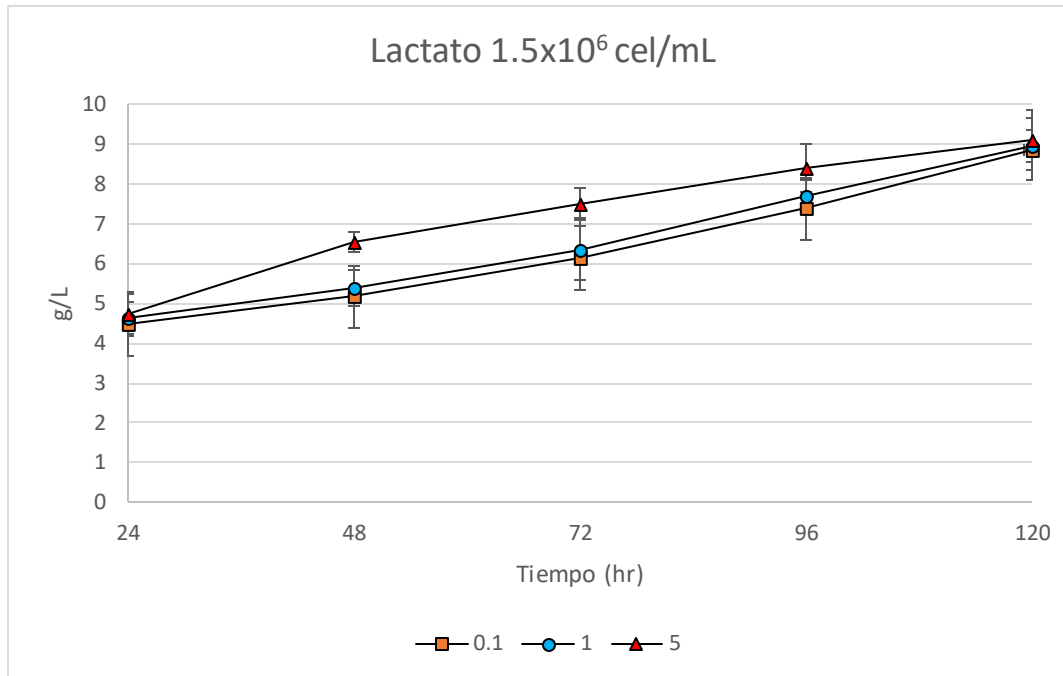


Gráfica 12. Producción de Lactato en la cinética de 1 x10⁶ cel/mL

En esta gráfica se puede observar el efecto de la MOI sobre la producción de lactato, a una densidad de 1 x10⁶ cel/ mL de HEK293 creciendo en adherencia; los sobrenadantes se recolectaron cada 24 horas, y se analizaron en el YSI 2200.

Las barras indican la desviación estándar de los experimentos que se realizaron por triplicado.

La gráfica 12 muestra las producciones de lactato en las infecciones con densidad celular 1 x10⁶ cel/mL. Las concentraciones de obtenidas de lactato fueron las siguientes: la MOI 0.1 tuvo 6.51 g/L, la MOI de 1 tuvo 7.06 g/L y la MOI de 5 tuvo 7.33 g/L. Como se puede apreciar en términos generales, a mayor MOI mayor producción de lactato, pero al observar que entre las 72 – 96 horas p.i. parece que podría haber un consumo de lactato. Patrones similares de consumo de lactato se han reportado por otros investigadores en trabajos con células BHK-21 y HEK293 utilizando medio D-MEM/F-12 (Lee, Yap, Hu, & Wong, 2003).



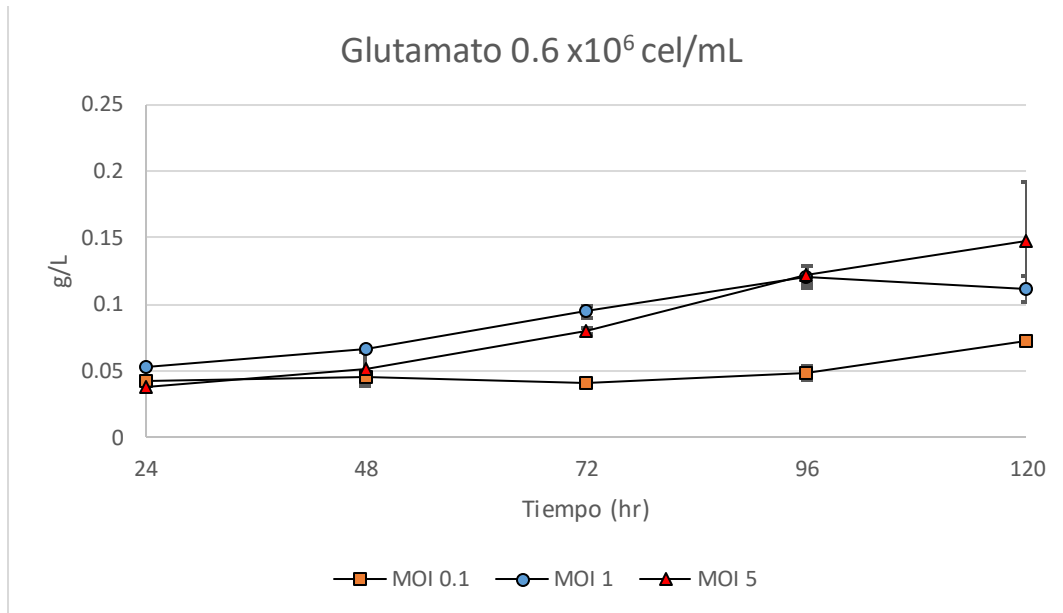
Gráfica 13. Producción de lactato en la cinética de 1.5×10^6 cel/mL

En esta gráfica se puede observar el efecto de la MOI sobre la producción de lactato, a una densidad de 1.5×10^6 cel/ mL de HEK293 creciendo en adherencia; los sobrenadantes se recolectaron cada 24 horas, y se analizaron en el YSI 2200. Las barras indican la desviación estándar de los experimentos que se realizaron por triplicado.

La gráfica 13 muestra la producción de lactato en las infecciones con densidad celular 1.5×10^6 cel/mL. Las concentraciones de lactato obtenidas fueron las siguientes: la MOI 0.1 tuvo 8.88 g/L, la MOI de 1 tuvo 8.95 g/L y la MOI de 5 tuvo 9.10 g/L. En esta gráfica se aprecia que cuando incrementa la MOI y la DC, la producción de lactato también aumenta, ya que la producción de adenovirus recombinantes y producción de IFN- γ otorga una alta carga metabólica a la célula.

Glutamato: Los esfuerzos para evitar los efectos de un aumento en la concentración de iones de amonio se han centrado básicamente en la sustitución de glutamina por otro compuesto capaz de ingresar al TCAc (Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle). La sustitución de la glutamina por el glutamato es un ejemplo de este enfoque, que presenta las siguientes ventajas: el glutamato tiene una mayor estabilidad química que la glutamina, la cual puede

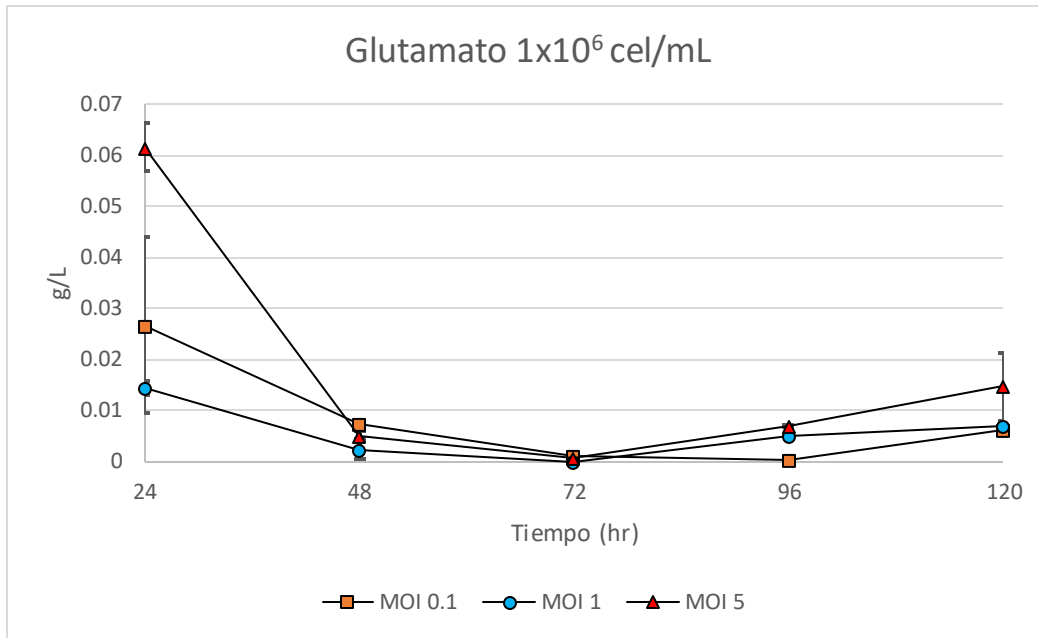
sintetizarse directamente a partir del glutamato en las células CHO porque expresa glutamina sintetasa (GS), (Altamirano, Berrios, Vergara, & Becerra, 2013) y el glutamato es menos amoniagénico porque solo tiene un grupo amina (Altamirano et al., 2013).



Gráfica 14. Producción de glutamato en la cinética de 0.6×10^6 cel/mL

En esta gráfica se puede observar el efecto de la MOI sobre la producción de glutamato, a una densidad de 0.6×10^6 cel/ mL de HEK293 creciendo en adherencia; los sobrenadantes se recolectaron cada 24 horas, y se analizaron en el YSI 2200. Las barras indican la desviación estándar de los experimentos que se realizaron por triplicado.

La gráfica 14 muestra la producción de glutamato en las infecciones con densidad celular 0.6×10^6 cel/mL. Las concentraciones máximas obtenidas fueron las siguientes: la MOI 0.1 tuvo 0.072 g/L, la MOI de 1 tuvo 0.111 g/L y la MOI de 5 tuvo 0.147 g/L, con esta gráfica se aprecia que cuando incrementa la MOI y la DC, la producción de glutamato también aumenta.

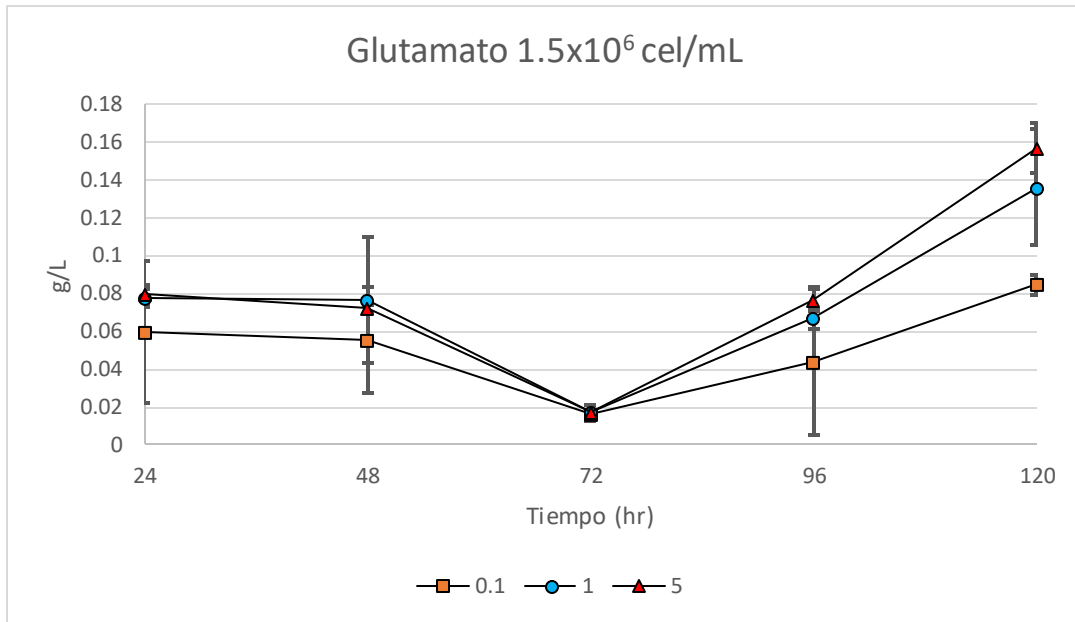


Gráfica 15. Producción de glutamato en la cinética de 1×10^6 cel/mL

En esta gráfica se puede observar el efecto de la MOI sobre la producción de glutamato, a una densidad de 1×10^6 cel/ mL de HEK293 creciendo en adherencia; los sobrenadantes se recolectaron cada 24 horas, y se analizaron en el YSI 2200. Las barras indican la desviación estándar de los experimentos que se realizaron por triplicado.

La gráfica 15 muestra la producción de glutamato en las infecciones con densidad celular 1×10^6 cel/mL. Las concentraciones máximas obtenidas son las siguientes: la MOI 0.1 tuvo 0.006 g/L, la MOI de 1 tuvo 0.0068 g/L y la MOI de 5 tuvo 0.014 g/L. En términos generales se observó que cuando incrementa la MOI, la producción de glutamato también aumenta, sin embargo, la gráfica muestra un consumo de glutamato partir de las 24 horas y hasta las 96 horas p.i., posteriormente se vuelve a producir glutamato.

La gráfica 16 muestra la producción de glutamato en las infecciones con densidad celular 1.5×10^6 cel/mL, las concentraciones máximas obtenidas fueron las siguientes: la MOI 0.1 tuvo 0.084 g/L, la MOI de 1 tuvo 0.156 g/L y la MOI de 5 tuvo 0.0178 g/L, igual que en la gráfica 15, se puede observar un consumo de glutamato a partir las 24 horas hasta las 72 horas p.i.



Gráfica 16. Producción de glutamato en la cinética de 1.5×10^6 cel/mL

En esta gráfica se puede observar el efecto de la MOI sobre la producción de glutamato, a una densidad de 1.5×10^6 cel/ mL de HEK293 creciendo en adherencia; los sobrenadantes se recolectaron cada 24 horas, y se analizaron en el YSI 2200.

Las barras indican la desviación estándar de los experimentos que se realizaron por triplicado.

9.3.2.1 Rendimiento metabólico.

Las células HEK 293 se usan comúnmente para la producción de adenovirus y vectores virales adenoasociados, y actualmente, mediante expresión estable, para la producción de algunas proteínas recombinantes (E. Dormond, Perrier, & Kamen, 2009; Saha et al., 2014). Estas células tienen un crecimiento limitado en cultivos discontinuos, como resultado de la acumulación de metabolitos tóxicos. Además, consumen cantidades de glucosa y glutamina superiores a las necesarias para satisfacer sus necesidades de energía y biosíntesis, lo que resulta en una acumulación de grandes cantidades de lactato y amonio en el medio. Esto, a su vez, tiene un efecto negativo en el crecimiento celular y, la productividad celular (Elias et al., 2003).

Se ha demostrado que el estudio del metabolismo celular es una herramienta útil para mejorar los rendimientos celulares y la formación de productos; sin embargo, esto depende de las condiciones del cultivo y de las estrategias de alimentación (Lee et al., 2003).

El cálculo de parámetros cinéticos indica la relación de consumo de nutrimentos y producción de metabolitos tóxicos por célula-h.

Se observa que, en todas las combinaciones evaluadas, los cultivos infectados con la MOI y la densidad celular más altas, mostraron un mayor consumo de glucosa y glutamina; así como una mayor producción de lactato y glutamato (tablas 12, 13 y 14). Lo que indica que el uso de altas densidades celulares y altas MOI imponen una alta carga metabólica a la célula, que se ve reflejada por una alta velocidad de consumo de nutrientes (Palomares & Chavez-Peña, 2010).

Tabla 11. Consumo y producción específicos de glucosa, glutamina, lactato y glutamato, de la cinética de infección con densidad 0.6×10^6 cel/mL.

Densidad celular	0.6×10^6 cel/mL		
MOI	0.1	1	5
q gluc (ng/cv) h-1 \pm s	-11.53 \pm 0.53	-15.91 \pm 2.51	-18.39 \pm 1.97
q lact (ng/cv) h-1 \pm s	19.42 \pm 4.77	28.41 \pm 5.86	37.26 \pm 11.11
q gln (ng/cv) h-1 \pm s	-1.28 \pm 0.28	-2.13 \pm 0.89	-2.64 \pm 0.66
q glut (ng/cv) h-1 \pm s	0.043 \pm 0.01	0.86 \pm 0.15	1.31 \pm 0.22

Tabla 12. Consumo y producción específicos de glucosa, glutamina, lactato y glutamato, de la cinética de infección con densidad 1×10^6 cel/mL.

Densidad celular	1.0×10^6 cel/mL		
MOI	0.1	1	5
q gluc (ng/cv) h-1	-13.88 ± 0.04	-25.16 ± 0.6	-30.71 ± 1.72
q lact (ng/cv) h-1	42.71 ± 8.24	57.68 ± 2.63	87.10 ± 4.87
q gln (ng/cv) h-1	-5.22 ± 0.69	-4.29 ± 0.39	-4.96 ± 4.25
q glut (ng/cv) h-1	0.16 ± 0.003	0.26 ± 0.004	0.50 ± 0.005

Tabla 13. Consumo y producción específicos de glucosa, glutamina, lactato y glutamato, de la cinética de infección con densidad 1.5×10^6 cel/mL.

Densidad celular	1.5×10^6 cel/mL		
MOI	0.1	1	5
q gluc (ng/cv) h-1	-13.89 ± 0.60	-22.05 ± 2.68	-31.29 ± 1.98
q lact (ng/cv) h-1	55.28 ± 4.77	79.50 ± 10.69	113.91 ± 21.92
q gln (ng/cv) h-1	-3.35 ± 0.41	-4.48 ± 0.55	-5.32 ± 0.34
q glut (ng/cv) h-1	3.36 ± 1.53	4.41 ± 1.98	5.14 ± 0.66

Los datos negativos indican consumo y los datos positivos indican producción del metabolito en cuestión. glu, glucosa; lact, lactato; gln, glutamina; glut, glutamato. \pm s, desviación estándar

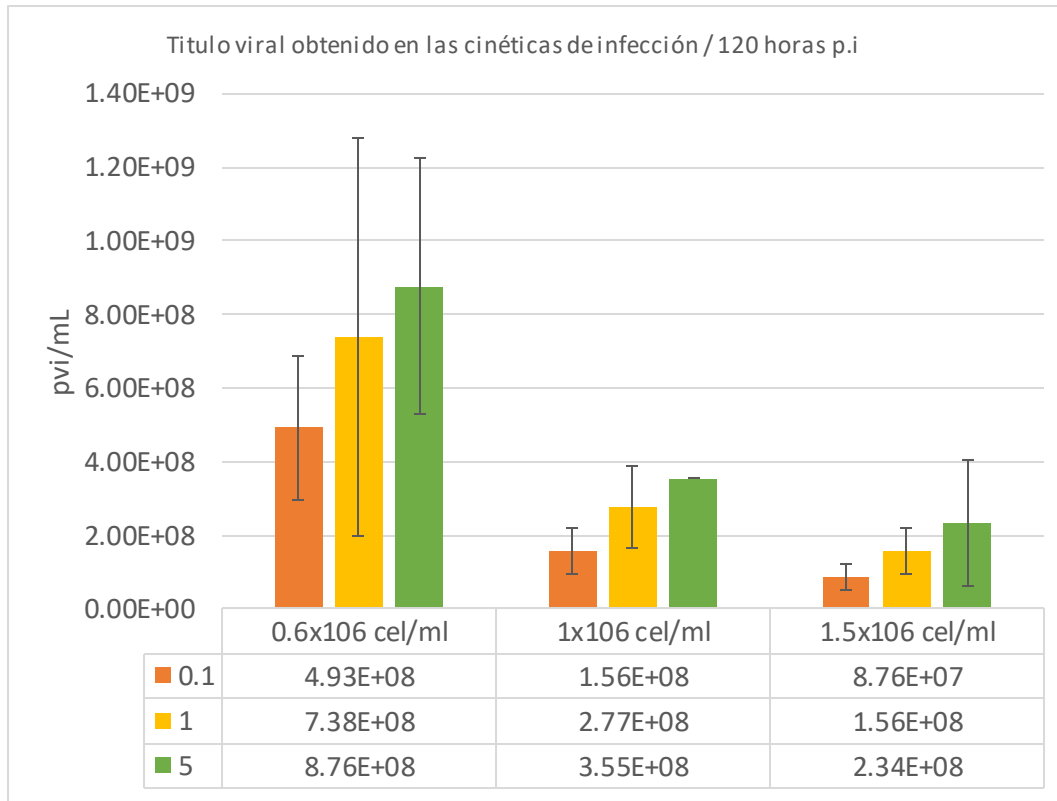
9.4 Determinación del título viral a las 120 horas p.i.

En el presente estudio, se evaluaron los efectos de la MOI y la densidad celular en la producción del vector adenoviral Ad5/IFN γ . Para ello se utilizaron diferentes combinaciones de infección, que se plantearon en la matriz experimental antes mencionada los sobrenadantes que se evaluaron fueron los de todas las combinaciones, a las 120 horas p.i.

Generalmente los tiempos de cosecha para adenovirus están en el rango de 48-72 h; sin embargo, algunos autores (Zhang et al., 1998; Lin, 1998; Irish et al., 2000) retrasan el tiempo de cosecha a 4-7 días o hasta que hay una lisis completa en los biorreactores. Ambos métodos parecen valiosos ya que las productividades volumétricas están en el mismo rango que las de 2 a 3 días (Nadeau & Kamen, 2003), sin embargo; la propagación del virus por su liberación espontánea al medio es más importante. Los adenovirus se caracterizan por una adsorción lenta a las células, por un ciclo de crecimiento relativamente largo (30 a 40 horas) y por una liberación lenta en el medio. Por lo tanto, un CPE debe aparecer después de aproximadamente 120 horas o 5 días p.i. (Wiga, Republic, With, & February, 1977).

Los títulos virales fueron determinados por la técnica de End Point Dilution y para los cálculos se utilizó el Protocol No. PT3414-1, version No. 092412, Clontech Laboratories, Inc. Adeno-X™ expression System 1 User manual, los resultados son los siguientes:

En la gráfica 17 se observan los efectos de la MOI y la DC sobre los rendimientos de producción de vectores adenovirales recombinantes; estos se analizaron en cultivos estáticos de HEK293. Se aprecia que la mayor producción de los vectores adenovirales se obtuvo al infectar 0.6×10^6 cel/mL con una MOI de 5 (8.76×10^8 pvi/mL), también se observa que en las infecciones con densidades de 1×10^6 cel/mL y 1.5×10^6 cel/mL se obtiene mayor productividad usando la MOI de 5. Sin embargo, la productividad viral descende cuando se usan altas densidades celulares, en este caso 1.5×10^6 cel/mL; estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores, como son Yamada *et al*, 2009.



Gráfica 17. Titulo viral obtenido en las cinéticas de infección a las 120 horas p.i

En esta gráfica se puede observar el efecto de la MOI y la DC sobre la producción de partículas virales infectivas (pvi) a las 120 horas post infección. Las barras indican la desviación estándar de los experimentos que se realizaron por triplicado.

9.5 Western Blot.

Para corroborar que el sistema de expresión HEK293/Ad5 secreta al medio de cultivo el IFN γ se realizó un Western blot de los sobrenadantes recolectados durante las infecciones. Esta técnica se realizó en condiciones desnaturizantes y, como se muestra en la Figura 12, se obtuvieron bandas con un peso de entre 20 – 21 KDa, tanto para los carriles correspondientes a los sobrenadantes de las cinéticas de infección (carriles 3 - 8 y 10), como para el control positivo de IFN γ (carril 2), que corresponde a un IFN γ comercial en forma de monómero que se encuentra glicosilado (Human IFN gamma Platinum ELISA,

affimetrix eBioscience), reportado con un peso de entre 21 – 24 KDa. Este resultado sugiere que el IFN- γ expresado por el sistema HEK293/Ad5-IFN γ podría estar glicosilado.

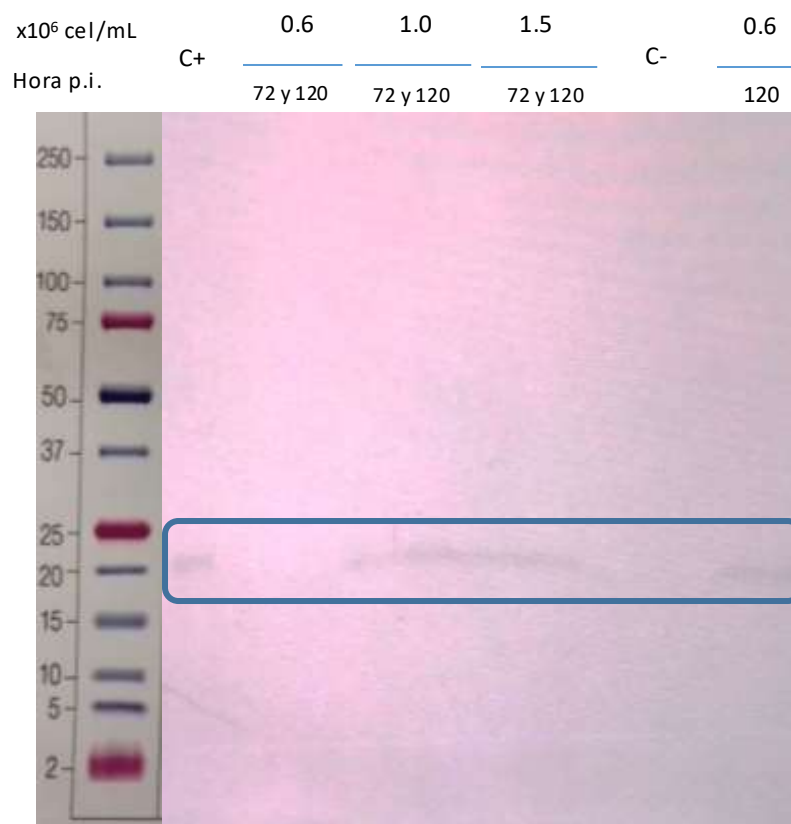


Figura 11. Western blot de los sobrenadantes obtenidos en las cinéticas de infección

- Marcador de Peso molecular (carril 1)
- Estándar de IFN γ utilizado para el ELISA (carril 2)
- 0.6 – corresponde a la densidad 0.6×10^6 cel/ml (carril 3-4 y 10)
- 1.0 – corresponde a la densidad 1.0×10^6 cel/ml (carril 5-6)
- 1.5 – corresponde a la densidad 1.5×10^6 cel/ml (carril 7-8)
- Sobrenadante de células sin infectar (carril 9)
- 72 – corresponde al sobrenadante de las 72 horas p.i.
- 120 – corresponde al sobrenadante de las 120 horas p.i.

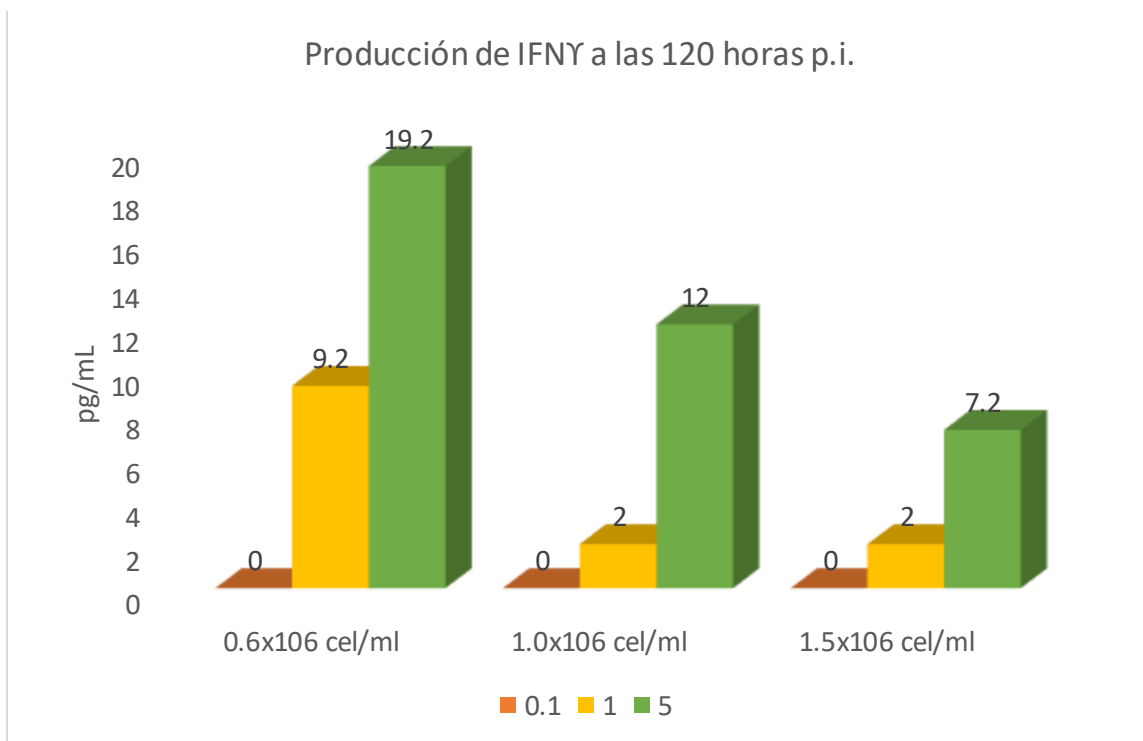
9.6 Cuantificación del IFN γ humano.

Para la detección cuantitativa del IFN γ humano expresado por el sistema HEK293/Ad5, se utilizó la técnica de ELISA (Human IFN gamma Platinum ELISA de affimetrix eBioscience). Los sobrenadantes recolectados de cada condición de infección se analizaron por duplicado (de acuerdo al protocolo), se realizó una curva del estándar de IFN γ para calcular las

concentraciones de las muestras. Durante el análisis de las muestras, sólo se pudo detectar el IFN γ a las 120 horas p.i.

En la gráfica 18, se observa que en la cinética de infección a densidad 0.6×10^6 cel/mL, la mayor producción de del IFN γ se registró cuando se infectó a MOI 5 (19.2 pg/mL), a MOI 1 se produjo 9.2 pg/mL, a MOI 0.1 no se pudo detectar la producción de IFN γ . En la cinética de infección a densidad 1×10^6 cel/mL, la mayor producción de del IFN γ se registró cuando se infectó a MOI 5 (12 pg/mL), a MOI 1 se produjo 2 pg/mL, a MOI 0.1 no se pudo detectar la producción de IFN γ . En la cinética de infección a densidad 1.5×10^6 cel/mL, la mayor producción de del IFN γ se registró cuando se infectó a MOI 5 (7.2 pg/mL), a MOI 1 se produjo 2 pg/mL, a MOI 0.1 no se pudo detectar la producción de IFN γ .

Estos resultados indican que las mayores concentraciones de IFN-Y se producen cuando se infecta a MOI 5 y a las 120 horas p.i en todas las densidades celulares.



Gráfica 18. Producción de IFN a las 120 horas p.i

Las barras naranjas corresponden a las infecciones con MOI 0.1, las barras amarillas corresponden a las infecciones con MOI 1, las barras verdes corresponden a las infecciones con MOI 5. Se puede apreciar que las mejores productividades se obtienen con la MOI 5, a mayores concentraciones celulares la productividad disminuye significativamente, el IFN-Y se pudo cuantificar hasta las 120 horas p.i.

10. Discusión de los Resultados.

Las tecnologías detrás de la producción de proteínas terapéuticas han cambiado sustancialmente desde que se aprobaron por primera vez en la década de 1980. La bacteria *Escherichia coli* había sido el sistema de expresión más utilizado para la producción de proteínas heterólogas (Babaeipour et al., 2010), sin embargo; este sistema de expresión presenta limitaciones, ya que las proteínas que se expresan en *E. coli* forman cuerpos de inclusión, que complican su purificación; los sistemas bacterianos no son capaces de realizar glicosilación, además la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*, suele estar acompañada de impurezas como endotoxinas y ácidos nucleicos que contaminan el producto (Bocci et al., 1985; Mohammadian-Mosaabadi et al., 2007; Petrov et al., 2010; Rojas et al., 2010).

Aunque la mayoría de las proteínas bioterapéuticas desarrolladas hasta la fecha se han producido utilizando las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) y mieloma murino (NS0), se han hecho cambios hacia el uso de líneas celulares humanas, como HEK 293. Una de las ventajas más importantes del uso de líneas celulares humanas para la producción de proteínas es la mayor probabilidad de que la proteína recombinante resultante sufra modificaciones postraduccionales que sean consistentes con las observadas en proteínas humanas endógenas. Aunque otras líneas celulares de mamíferos pueden producir modificaciones postraduccionales similares a las células humanas, también producen modificaciones no humanas, tales como galactosa- α 1,3-galactosa y ácido N-glicolilneuramínico, que son potencialmente inmunogénicas (Dumont et al., 2016).

Las células HEK293 se han usado ampliamente para producir proteínas de grado de investigación durante muchos años y, más recientemente, cinco agentes terapéuticos producidos en células HEK293 han sido aprobados por la FDA o la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para uso terapéutico. Estos agentes son drotrecogina alfa (XIGRIS®, Eli Lilly Corporation, Indianápolis, IN), proteína de fusión recombinante factor IX Fc (rFIXFc, Biogen, Cambridge, MA), proteína de fusión recombinante del factor VIII Fc (rFVIII Fc; Biogen, Cambridge, MA), factor VIII recombinante (human-cl rhFVIII; NUWIIQ®, Octapharma, Lachen, Suiza) y dulaglutida (TRULICITY®; Eli Lilly, Indianápolis, IN).

La producción de proteínas recombinantes en células de mamífero típicamente se realiza con el uso de líneas celulares transfectadas de manera estables; sin embargo, la generación de estas líneas consume mucho tiempo, debido al largo proceso de selección de clones, que a menudo lleva 12 meses (Wurm, 2004). Dado que el tiempo en el mercado

es un factor clave en la industria biofarmacéutica, la expresión genética transitoria (TGE) se ha convertido en una herramienta poderosa en la última década (Fliedl & Kaisermayer, 2011).

La necesidad de desarrollar nuevos productos y la presencia de un mercado local de tamaño relevante presenta una gran oportunidad de crecimiento para la industria biofarmacéutica de México. Hasta el 2015, 25 compañías biofarmacéuticas estaban operando en México, y se tiene previsto que para el 2025 se inviertan 500 millones de dólares en investigación y desarrollo, mientras que para el 2030 el 65% de los medicamentos serán de origen biológico (Fuentes & Salieri, 2016).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la densidad celular (DC) y la Multiplicidad de Infección (MOI) sobre el título de producción de la proteína de interés, para este caso Interferón gamma humano (IFN- γ) y el título del vector adenoviral producido mediante el sistema de expresión HEK 293/Adenovirus tipo 5 de primera generación (HEK 293/Ad5).

Se utilizaron 3 diferentes DC (0.6×10^6 , 1×10^6 y 1.5×10^6 cel/mL) y 3 diferentes MOI (0.1, 1 y 5). Los efectos de estas variables se ven reflejados desde las concentraciones celulares, la producción y consumo de metabolitos y sobre los títulos virales obtenidos y la producción de IFN- γ .

- Las infecciones a MOI 0.1 permitieron una mayor concentración celular viable, consumen y producen una menor cantidad de metabolitos; sin embargo, la producción de pvi fue menor; así como la producción de IFN- γ humano, la que no se pudo detectar por ELISA, esto no significa que no haya expresión de la proteína al usar esta MOI, el no haber detectado el IFN- γ podría deberse a que la concentración del IFN- γ se encuentra por debajo del límite de detección del kit de ELISA, que se encuentra en 0.99 pg/mL.
- Se observó que las diferencias en las concentraciones celulares viabilidades entre las infecciones con MOI 1 y 5 se hicieron menores, dicha limitación de crecimiento podría deberse a la limitación del espacio donde las células crecieron y/o el resultado del agotamiento de nutrientes y / o la acumulación de metabolitos inhibidores en el medio de cultivo (Nadeau & Kamen, 2003).
- La MOI más alta (5) aumentó la producción de IFN- γ y los rendimientos de pvi. Sin embargo, se observó un mayor consumo y producción de metabolitos en todos los experimentos. Debido a que la producción de virus recombinantes conlleva la

síntesis de altas cantidades de ADN viral, además de las proteínas virales. Esto impone una alta carga metabólica a la célula, la que se ve reflejada por una alta velocidad de consumo de oxígeno y de otros nutrientes (Palomares & Chavez-Peña, 2010).

- A la densidad 0.6×10^6 cel/mL se obtuvieron las mayores productividades de IFN- γ y pvi, seguida de la densidad 1×10^6 cel/mL y por último 1.5×10^6 cel/mL. Las infecciones con 1×10^6 cel/mL y 1.5×10^6 cel/mL en combinación con la MOI 0.1 y 1 disminuyen la productividad del vector adenoviral y, en consecuencia, la productividad de la proteína recombinante. Lo anterior se explica porque en el caso de las infecciones a MOI bajas (<1), solo una pequeña proporción de células se infectan inicialmente después de la adición del stock viral. Las células no infectadas se infectarán después de que las células inicialmente infectadas comiencen a liberar los virus de su progenie. Por lo tanto, para la producción eficiente de vector adenoviral por infección de baja multiplicidad, algunos estudios sugieren que se requieren tiempos de cultivo más largos para que todas las células se infecten y se complete la replicación del virus (Yamada et al., 2009).

El consumo de glucosa y glutamina y, la producción de lactato y glutamato se cuantificaron a partir de las 24 horas p.i.

- Las gráficas 5, 6 y 7 muestran el consumo de glucosa de las cinéticas de infección a densidades 0.6×10^6 , 1×10^6 y 1.5×10^6 cel/mL, respectivamente. En ellas se muestra el consumo de glucosa, la que se comenzó a cuantificar a partir de las 24 horas p.i.; lo que coincide con el inicio de la fase de crecimiento exponencial de las cinéticas de infección (gráficas 2, 3, y 4), y con el ciclo de vida del adenovirus que tarda entre 24 – 36 horas (Curiel & Douglas, 2002).

De forma similar a otras líneas celulares continuas de mamíferos, las células HEK293 tienen una glucólisis altamente activa (Nadeau et al., 2000). (Henry & Durocher, 2011; Nadeau et al., 2000). Algunos autores argumentan que el aumento de la glucólisis aeróbica se debe en parte a la sobreexpresión tanto del transporte de glucosa como de las enzimas en la vía glucolítica. Tal patrón metabólico desequilibra el metabolismo central y energético e induce la acumulación de un intermediario metabólico estratégico, el piruvato. La mayor parte del piruvato en

estas células no se utiliza para la generación de energía celular a través del ciclo TCA pero se convierte en un subproducto metabólico, el ácido láctico (Nadeau et al., 2000; Tennant, Durán, & Gottlieb, 2010).

- En las gráficas 8, 9 y 10, se puede apreciar que el consumo de glutamina al igual que el consumo de glucosa coincide con el inicio de la fase de crecimiento exponencial de las cinéticas de infección (gráficas 2,3, y 4) y con el ciclo de vida del vector adenoviral; ya que a medida que el proceso de infección avanzaba, las células se encontraban sometidas a un mayor estrés metabólico lo que indica que en esta fase las células utilizaron la mayor cantidad aminoácidos para bloques de construcción de las proteínas, para la proliferación celular y como fuente de energía secundaria.
- En las gráficas 11 y 12, relacionadas con la producción de lactato (0.6×10^6 y 1×10^6 cel/ mL respectivamente), también se observó su posible consumo. En la gráfica 11 a MOI 5 se observó entre las 72 – 96 horas p.i. En la gráfica 12 el posible consumo se observó con las tres MOI, a 0.1 y 1 las primeras 72 horas p.i. fueron de producción de lactato, y el intervalo de 72 – 96 horas p.i. se observó el posible consumo. Con la MOI 5 observó en el intervalo de 48 – 72 horas p.i y entre 96 -120 horas p.i. Algunos investigadores indican que la utilización de lactato está principalmente influenciada por el metabolismo oxidativo mitocondrial y las células HEK293 empleadas en el contexto de producción viral han mostrado un cambio metabólico similar desde la producción de lactato hasta el consumo de lactato (Zagari, Jordan, Stettler, Broly, & Wurm, 2013). Investigadores como (Quek et al., 2014), establecen que un mayor flujo a través de la glutamato deshidrogenasa en la dirección de consumo de glutamato tiende a correlacionarse con un mayor rendimiento de lactato, hecho que se puede relacionar con las gráficas 14,15 y 16 de glutamato.
- Las gráficas 14, 15 y 16 no solo muestran producción de glutamato, sino también su consumo. Algunos estudios demostraron la utilización del glutamato por células de insecto, los autores consideran que la utilización de este metabolito es una característica metabólica de crecimiento en estas células, y que la utilización del glutamato desempeña un papel clave en la regulación del crecimiento de las células

de insecto y que la eliminación de la glutamina del medio de cultivo dio como resultado un consumo significativo de glutamato en lugar de la producción (Chou, 2014). Esta información se puede relacionar con las gráficas de consumo de glutamina (gráficas 8,9 y 10) donde se aprecia que los niveles de glutamina prácticamente están agotados. Investigadores como (Quek et al., 2014) establecieron por medio del sistema Recon2 que la tasa de producción de glutamato fue constante, sin embargo, Recon 2 es una plataforma para simular e identificar cambios en la contribución o participación de vías metabólicas preasignadas basadas en diferentes perfiles de tasas medidas. En su trabajo establecen que, aunque el proceso de análisis de glucosa, lactato, glutamina, glutamato y otros metabolitos no se basó en pruebas, la transparencia en el proceso de reducción puede dar una sensación de confianza en los resultados del flujo. Otros investigadores como (Lee et al., 2003), realizaron análisis con cultivos de HEK293 utilizado para producir vectores adenovirales y, cuantificaron glucosa, glutamina, lactato y glutamato; sin embargo, el glutamato no fue representado en su trabajo debido a su patrón de producción y consumo extremadamente errático, lo que llevó al grupo de investigadores a no asignarle una tasa específica promedio, pues consideraron que no tenía sentido.

- La producción de IFN- γ humano se vio afectada por la densidad celular y la MOI, pues en la gráfica 18, se observó que la mejor producción de IFN- γ humano (19.2 pg/mL = 1.92×10^{-5} mg/L) se obtiene al infectar 0.6×10^6 cel/mL con una MOI de 5, es decir la densidad celular más baja y la MOI más alta utilizadas en este trabajo. En el caso del título viral se observa el mismo efecto que en la producción de IFN- γ humano, es decir; el mejor título viral se obtiene al infectar 0.6×10^6 cel/mL con una MOI de 5 (8.76×10^8 pvi), se muestra en la gráfica 17. Este patrón de resultados indica que el valor más bajo de DC que logra la mejor producción evita el uso innecesario de células y se ve reflejado en ahorro de material biológico. En la tabla 9 se observa que los rendimientos de IFN- γ obtenidos en este trabajo (19.2 pg/mL = 1.92×10^{-5} mg/L) son menores a los obtenidos por otros sistemas de expresión como bacterias, levaduras y células de insecto, sin embargo, para la producción de IFN- γ en estos sistemas se usaron diferentes métodos de cultivo, desde la utilización de matraces de 250 mL hasta el uso de biorreactores Fed-batch, las productividades

de IFN- γ en estos sistemas van desde 1×10^{-7} mg/L en células mamaria de ratón (Bagis et al., 2011), hasta 1700 mg/L en *E. coli* (Huang et al., 2013).

11. Conclusiones.

La densidad celular y multiplicidad de infección influyen de manera directa la producción de IFN- γ en el sistema productor transitorio HEK293/Ad5.

Conclusión General.

En este trabajo se identificaron las condiciones de infección que resultan en los mayores rendimientos para la producción de vectores adenovirales y de IFN- γ humano producido como transgene por las células HEK293. Se encontró que la máxima productividad de IFN- γ en la combinación de la densidad más baja utilizada (0.6×10^6 cel/mL) con la MOI más alta (5), y a las 120 horas post infección, la producción que se determinó fue de 19.2 pg/mL. Así mismo, se determinó que la mejor producción de adenovirus se obtiene al infectar 0.6×10^6 cel/mL con una MOI de 5 (8.76×10^8 pvi). En el caso del este sistema de expresión y para las condiciones de infección utilizadas se puede deducir que una alta productividad de proteína recombinante está acompañada de una alta productividad del vector adenoviral.

CONCLUSIONES PARTICULARES:

De acuerdo a los análisis de producción y consumo de metabolitos SE OBSERVA que HEK293 presenta una flexibilidad metabólica que le otorga la capacidad de ajustar su flujo metabólico dependiendo de las condiciones específicas de cultivo.

12. Perspectivas

A partir de los análisis y discusiones presentadas en esta tesis, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en dos direcciones que se enfocan en aumentar la productividad a través de la optimización del metabolismo celular, un enfoque no dirigido y un enfoque dirigido (Petiot, Cuperlovic-Culf, Shen, & Kamen, 2015).

El enfoque no dirigido, consiste en mejorar las estrategias de alimentación del cultivo mediante la adición de sustratos agotados o críticos y, finalmente, la eliminación de metabolitos tóxicos.

- Un enfoque no dirigido para este trabajo podría consistir en el desarrollo de nuevas formulaciones de medio y mejoramiento de los mismos con la adición de nuevos sustratos.
- Otra opción sería trabajar con las condiciones de infección donde se obtuvieron mejores rendimientos de virus y proteína recombinante, pero utilizando reemplazo del medio cada cierto tiempo, esto con la finalidad de evitar la acumulación de metabolitos tóxicos.
- Mejorar las fases de producción utilizando biorreactores de mayor capacidad y/o instrumentados, usando HEK293 adaptada para crecer en suspensión y/o HEK293 creciendo adheridas en microcarriers.

El enfoque dirigido intenta identificar objetivos específicos para la optimización a través de una mejor comprensión del metabolismo celular bajo diferentes condiciones de operación.

- Aunque existen estudios enfocados al análisis de la metabolómica y la flujómica de HEK293, sería una buena opción aplicar estas ómicas al estudio específico del sistema HEK293/Ad5- IFNY humano, para la mejor comprensión de su metabolismo, que se verá reflejado en el aumento de la producción viral y de proteína recombinante.

13. Referencias

- Ahmed, C. M. I., Burkhart, M. a, Mujtaba, M. G., Subramaniam, P. S., & Johnson, H. M. (2003). The role of IFN γ nuclear localization sequence in intracellular function. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 15), 3089–98. <https://doi.org/10.1242/jcs.00528>
- Al-Rubeai, M. (2015). *Animal Cell Culture. Cell engineering* (Vol. 9). <https://doi.org/10.1007/9783319103204>
- Almo, S. C., & Love, J. D. (2014). Better and faster: Improvements and optimization for mammalian recombinant protein production. *Current Opinion in Structural Biology*, 26(1), 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.03.006>
- Altamirano, C., Berrios, J., Vergara, M., & Becerra, S. (2013). Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3). <https://doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-2>
- Amarouch, M. Y., Syam, N., & Abriel, H. (2013). Biochemical, single-channel, whole-cell patch clamp, and pharmacological analyses of endogenous TRPM4 channels in HEK293 cells. *Neuroscience Letters*, 541, 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.02.011>
- Anderson, C. W., Young, M. E., & Flint, S. J. (1989). Characterization of the adenovirus 2

virion protein, *Mu. Virology*, 172(2), 506–512. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90193-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90193-1)

- Arbabi, M., Alasti, F., Sanati, M. H., Hosseini, S., Deldar, A., & Maghsoudi, N. (2003). Cloning and Expression of Human Gamma- Interferon cDNA in E . coli. *Iranian Journal of Biotechnology*, 1(2), 87–94.
- Armstrong-James, D., Teo, I. A., Shrivastava, S., Petrou, M. A., Taube, D., Dorling, A., & Shaunak, S. (2010). Exogenous interferon- γ immunotherapy for invasive fungal infections in kidney transplant patients. *American Journal of Transplantation*, 10(8), 1796–1803. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03094.x>
- Arora, M. (2013). Cell Culture Media: A Review. *Mater Meth*, (3), 175. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.175>
- Babaeipour, V., Shojaosadati, S. A., Khalilzadeh, R., Maghsoudi, N., & Farnoud, A. M. (2010). Enhancement of human γ -Interferon production in recombinant E. coli using batch cultivation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(8), 2366–2376. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8718-5>
- Bagis, H., Aktoprakligil, D., Gunes, C., Arat, S., Akkoc, T., Cetinkaya, G., ... Ivanov, I. G. (2011). Expression of biologically active human interferon gamma in the milk of transgenic mice under the control of the murine whey acidic protein gene promoter. *Biochemical Genetics*, 49(3–4), 251–257. <https://doi.org/10.1007/s10528-010-9403-7>
- Baldi, L., Hacker, D., 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. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9297-y>
- Bergelson, J. M. (1999). Receptors mediating adenovirus attachment and internalization. *Biochemical Pharmacology*, 57(9), 975–979. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00332-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00332-3)
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., & Crowell, R. L. (1997). Isolation of a Common Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275, 1320–1323.
- Bocci, V., Pacini, A., Pessina, G. P., Paulesu, L., Muscettola, M., & Lunghetti, G. (1985). Catabolic sites of human interferon-gamma. *J Gen Virol*, 66 (Pt 4), 887–891. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-4-887>

- Boer, G. ., Back, W., & Osterhaus, A. (1990). An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species. *Archives of Virology*, 115, 47–61.
- Borden, E. C., Sen, G. C., Uze, G., Silverman, R. H., Ransohoff, R. M., Foster, G. R., & Stark, G. R. (2007). Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(12), 975–990.
<https://doi.org/10.1038/nrd2422>
- Browne, S. M., & Al-Rubeai, M. (2011). Defining viability in mammalian cell cultures. *Biotechnology Letters*, 33(9), 1745–1749. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0644-2>
- Brussaard, C. P. D., Marie, D., & Bratbak, G. (2000). Flow cytometric detection of viruses. *Journal of Virological Methods*, 85(1–2), 175–182. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(99\)00167-6](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00167-6)
- Büssow, K. (2015). Stable mammalian producer cell lines for structural biology. *Current Opinion in Structural Biology*, 32(Table 1), 81–90.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.03.002>
- Chen, W., Villaflores, O., Jinn, T., Chan, M., Chang, Y., & Wu, T. (2011). Expression of Recombinant Human Interferon- γ with Antiviral Activity in the Bi-Cistronic Baculovirus-Insect/Larval System. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(7), 1342–1348. <https://doi.org/10.1271/bbb.110107>
- Chen, Lin, Y., Lee, Y., Yang, N., Chan, M., & et al. (2004). Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures. *Transgenic Research*, 13(5), 499–510. <https://doi.org/10.1007/s11248-004-2376-8>
- Chiou, H. C., Vasu, S., Liu, C. Y., Cisneros, I., Jones, M. B., & Zmuda, J. F. (2014). Chapter 4 Scalable Transient Protein Expression. *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols*, 1104, 35–55. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-733-4>
- Chou, C.-C. (2014). Identification of the pivotal role of glutamate in enhancing insect cell growth using factor analysis. *Cytotechnology*, 66(5), 853–60.
<https://doi.org/10.1007/s10616-013-9637-4>
- CONACYT. (2016). Agenda de Innovacion de Morelos, Resumen Ejecutivo. *Agenda Estatal de Innovacion*, 3, 103.

- Croset, A., Delafosse, L., Gaudry, J.-P., Arod, C., Glez, L., Losberger, C., ... Antonsson, B. (2012). Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 161(3), 336–348.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.038>
- Curiel, D., & Douglas, J. (2002). *Adenoviral Vectors for Gene Therapy*.
- Dalton, A. C., & Barton, W. A. (2014). Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Science*, 23(5), 517–525.
<https://doi.org/10.1002/pro.2439>
- Davoudi, N., Hemmati, A., Khodayari, Z., Adeli, A., Hemayatkar, M., & et al. (2011). Cloning and expression of human IFN- γ in *Leishmania tarentolae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1893–1899. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0648-4>
- Demain, A., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297–306.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
- Derouazi, M., Girard, P., Tilborgh, V., Iglesias, K., Muller, N., Bertschinger, M., & Wurm, F. M. (2004). Serum-Free Large-Scale Transient Transfection of CHO Cells, (Phase I). <https://doi.org/10.1002/bit.20161>
- Dormond, E., Jacob, D., Tom, R., Bernier, A., Perret, S., St-laurent, G., ... Kamen, A. (2008). Development of a suspension serum-free helper-dependent adenovirus production system and assessment of co-infection conditions, 148, 106–114.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.10.017>
- Dormond, E., Perrier, M., & Kamen, A. (2009). From the first to the third generation adenoviral vector: What parameters are governing the production yield? *Biotechnology Advances*, 27(2), 133–144.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.003>
- Dumont, J., Ewart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. (2016). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 1110–1122.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266>
- Durocher, Y., Perret, S., & Kamen, A. (2002). High-level and high-throughput recombinant

- protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Research*, 30(2), E9. <https://doi.org/10.1093/nar/30.2.e9>
- Eglen, R., & Reisine, T. (2011). Primary Cells and Stem Cells in Drug Discovery: Emerging Tools for High-Throughput Screening. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 9(2), 108–124. <https://doi.org/10.1089/adt.2010.0305>
- Elias, C. B., Carpentier, E., Durocher, Y., Bisson, L., Wagner, R., & Kamen, A. (2003). Improving glucose and gluamiue metabolism of human HEK 293 and Trchoplusia ni insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. *Biotechnology Progress*;19 (1): 90-97 Jan-Feb 2003, 19, 90–97. Retrieved from <http://www.thomsoninnovation.com/tip-innovation/recordView.do?datasource=WOK&category=LIT&selRecord=1&totalRecords=1&databaselds=WOS&idType=uid/recordid&recordKeys=000180973100013/128335856%5Cnhttp://www.thomsoninnovation.com/tip-innovation/>
- Ellis, E. L., & Delbrück, M. (1939). the Growth of Bacteriophage. *The Journal of General Physiology*, 22(3), 365–84. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.3.365>
- Evans, H., & Schulemann, W. (1914). The action of vital stains beloninf to the benzidine group. *Science*, XXXIX(1004), 443–454.
- Ferreira, T. B., Ferreira, A. L., Carrondo, M. J. T., & Alves, P. M. (2005). Effect of refeed strategies and non-ammoniagenic medium on adenovirus production at high cell densities. *Journal of Biotechnology*, 119(3), 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.03.009>
- Ferris, M. M., Stepp, P. C., Ranno, K. A., Mahmoud, W., Ibbitson, E., Jarvis, J., ... Rowlen, K. L. (2011). Evaluation of the Virus Counter® for rapid baculovirus quantitation. *Journal of Virological Methods*, 171(1), 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.jviomet.2010.10.010>
- Fliedl, L., & Kaisermayer, C. (2011). Transient gene expression in HEK293 and vero cells immobilised on microcarriers. *Journal of Biotechnology*, 153(1–2), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.02.007>
- Flint Jane S. (2001). Adenoviruses. *Life Sciences*, 1–8.
- Freshney, R. I. (2005). *Culture of Animal Cells*. <https://doi.org/10.1002/9780471747598>

- Fuentes, S., & Salieri, G. (2016). INNOVACIÓN BIOFARMACÉUTICA EN MÉXICO: ¿SABRÁ EL PAÍS APROVECHAR SU POTENCIAL? *Fundacion Idea*, 1–7.
- Galbraith, D. J., Tait, A. S., Racher, A. J., Birch, J. R., & James, D. C. (2006). Control of Culture Environment for Improved Polyethylenimine-Mediated Transient Production of Recombinant Monoclonal Antibodies by CHO Cells, 1.
- Garnier, A., Côté, J., Nadeau, I., Kamen, A., & Massie, B. (1994). Scale-up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells. *Cytotechnology*, 15(1–3), 145–155. <https://doi.org/10.1007/BF00762389>
- Geigert, J. (2013). The challenge of CMC regulatory compliance for biopharmaceuticals and other biologics, second edition. *The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals and Other Biologics, Second Edition*, (2), 1–338. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6916-2>
- Giberson, A. N., Davidson, A. R., & Parks, R. J. (2012). Chromatin structure of adenovirus DNA throughout infection. *Nucleic Acids Research*, 40(6), 2369–2376. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1076>
- Glover, D. J., Lipps, H. J., & Jans, D. A. (2005). Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nature Reviews Genetics*, 6(4), 299–310. <https://doi.org/10.1038/nrg1577>
- Graham, F. L., & Prevec, L. (1991). Manipulation of adenovirus vectors. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 7, 109–28. <https://doi.org/10.1385/0-89603-178-0:109>
- Graham, F., & Smiley, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal General Virology*, 36(2977), 59–74.
- Gray, P., & Goeddel, D. (1982). Structure of the human immune interferon gene. *Nature*, 298, 859–863.
- Gray, P. W., Leung, D. W., Pennica, D., Yelverton, E., Najarian, R., Simonsen, C. C., ... Goeddel, D. V. (1982). Expression of human immune interferon cDNA in E. coli and monkey cells. *Nature*, 295(5849), 503–508. <https://doi.org/10.1038/295503a0>
- Greber, U. F., Suomalainen, M., Stidwill, R. P., Boucke, K., Ebersold, M. W., & Helenius, A. (1997). The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO*

Journal, 16(19), 5998–6007. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.19.5998>

Greber, U. F., Webster, P., Weber, J., & Helenius, A. (1996). The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *The EMBO Journal*, 15(8), 1766–1777.

Hearing, P., Samulski, R. J., Wishart, W. L., & Shenk, T. (1987). Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *Journal of Virology*, 61(8), 2555–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3599182%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC255695>

Heider, S., & Metzner, C. (2014). Quantitative real-time single particle analysis of virions. *Virology*, 462–463(1), 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.06.005>

Henry, O., & Durocher, Y. (2011). Enhanced glycoprotein production in HEK-293 cells expressing pyruvate carboxylase. *Metabolic Engineering*, 13(5), 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.05.004>

Henry, O., Perrier, M., & Kamen, A. (2005). Metabolic flux analysis of HEK-293 cells in perfusion cultures for the production of adenoviral vectors. *Metabolic Engineering*, 7(5–6), 467–476. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2005.08.002>

Hong, S. S., Karayan, L., Tournier, J., Curiel, D. T., & Boulanger, P. A. (1997). Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I $\alpha 2$ domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO Journal*, 16(9), 2294–2306. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2294>

Hu, J., Han, J., Li, H., Zhang, X., Liu, L. L., Chen, F., & Zeng, B. (2018). Human Embryonic Kidney 293 Cells: A Vehicle for Biopharmaceutical Manufacturing, Structural Biology, and Electrophysiology. *Cells Tissues Organs*, 205(1), 1–8. <https://doi.org/10.1159/000485501>

Hu, Y., & Bentley, W. (2001). Effect of MOI ratio on the composition and yield of chimeric infectious bursal disease virus-like particles by baculovirus co-infection: Deterministic predictions and experimental results. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(1), 104–119. <https://doi.org/10.1002/bit.1170>

Huang, S. K., Jin, J. Y., Guan, Y. X., Yao, Z., Cao, K., & Yao, S. J. (2013). Refolding of recombinant human interferon gamma inclusion bodies in vitro assisted by colloidal thermo-sensitive poly(N-isopropylacrylamide) brushes grafted onto the surface of

- uniform polystyrene cores. *Biochemical Engineering Journal*, 74, 20–26.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.02.015>
- Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1957). Virus Interference. I. The Interferon. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 147(927), 258–267.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1957.0048>
- Jenkins, N., & Curling, E. M. A. (1994). Glycosylation of recombinant proteins : Problems and prospects. *Environmental Microbiology*, 16(1993), 354–364.
- Jensen, E. C. (2012). The basics of Western blotting. *Anatomical Record*, 295(3), 369–71.
<https://doi.org/10.1002/ar.22424>
- Kamen, A., & Henry, O. (2004). Development and optimization of an adenovirus production process. *Journal of Gene Medicine*, 6(SUPPL. 1), 184–192.
<https://doi.org/10.1002/jgm.503>
- Kaufman, W. L., Kocman, I., Agrawal, V., Rahn, H. P., Besser, D., & Gossen, M. (2008). Homogeneity and persistence of transgene expression by omitting antibiotic selection in cell line isolation. *Nucleic Acids Research*, 36(17).
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn508>
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: The present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173–3178.
<https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
- Konstantinov, K. B. (1996). Monitoring and control of the physiological state of cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 52(2), 271–89.
<https://doi.org/10.1002/bit.260520203>
- Kovesdi, I., & Hedley, S. J. (2010). Adenoviral Producer Cells. *Viruses*, 2(8), 1681–1703.
<https://doi.org/10.3390/v2081681>
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283–293.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.007>
- Lagutin, O. V., Dobrovolsky, V. N., Vinogradova, T. V., Kyndiakov, B. N., Khodarovich, Y. M., Jenkins, N., ... Larionov, O. A. (1999). Efficient human IFN- γ expression in the mammary gland of transgenic mice. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 19(2). <https://doi.org/10.1089/107999099314289>

- Lee, Y. Y., Yap, M. G. S., Hu, W. S., & Wong, K. T. K. (2003). Low-glutamine fed-batch cultures of 293-HEK serum-free suspension cells for adenovirus production. *Biotechnology Progress*, 19(2), 501–509. <https://doi.org/10.1021/bp025638o>
- Li, E., Stupack, D., Bokoch, G. M., & Nemerow, G. R. (1998). Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases. *Journal of Virology*, 72(11), 8806–12. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=110297&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Li, E., Stupack, D., Klemke, R., Cheresch, D. A., & Nemerow, G. R. (1998). Adenovirus endocytosis via alpha(v) integrins requires phosphoinositide-3-OH kinase. *Journal of Virology*, 72(3), 2055–2061.
- Lybecker, K. M. (2016). The Biologics Revolution in the Production of Drugs. *Fraser Institute*, (July). Retrieved from <https://www.fraserinstitute.org/sites/default/files/biologics-revolution-in-the-production-of-drugs.pdf>
- Mancia, F., Patel, S. D., Rajala, M. W., Scherer, P. E., Nemes, A., Schieren, I., ... Shapiro, L. (2004). Optimization of protein production in mammalian cells with a coexpressed fluorescent marker. *Structure*, 12(8), 1355–1360. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.06.012>
- Matthews, D. A., & Russell, W. C. (1995). Adenovirus protein-protein interactions: Molecular parameters governing the binding of protein VI to hexon and the activation of the adenovirus 23K protease. *Journal of General Virology*, 76(8), 1959–1969. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-8-1959>
- McClain, D. (2010). *Increasing IFN-γ Productivity in CHO Cells through CDK Inhibition. Chemical Engineering*. Cornell University, Ithaca, NY.
- Mesnager, R., Bernay, B., & Séralini, G. E. (2013). Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*, 314(2–3), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.006>
- Miller, C. H. T., Maher, S. G., Young, H. A., & et al. (2009). Clinical use of interferon-γ. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1182, 69–79. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05069.x>

- Mohammadian-Mosaabadi, J., Naderi-Manesh, H., Maghsoudi, N., Nassiri-Khalili, M. A., Masoumian, M. R., & Malek-Sabet, N. (2007). Improving purification of recombinant human interferon γ expressed in *Escherichia coli*; effect of removal of impurity on the process yield. *Protein Expression and Purification*, *51*(2), 147–156.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.07.002>
- Muruve, D. a. (2004). The innate immune response to adenovirus vectors. *Human Gene Therapy*, *15*(12), 1157–1166. <https://doi.org/10.1089/hum.2004.15.1157>
- Nadeau, I., & Kamen, A. (2003). Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotechnology Advances*, *20*(7–8), 475–489. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00030-7](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00030-7)
- Nadeau, I., Sabatie, J., Koehl, M., Perrier, M., Kamen, A., & Al, E. (2000). Human 293 cell metabolism in low glutamine supplied culture: Interpretation of metabolic changes through metabolic flux analysis. *Metabolic Engineering*, *2*(4), 277–292.
<https://doi.org/10.1006/mben.2000.0152>
- Naylor, S. L., Sakaguchi, A. Y., Shows, T. B., Law, M. L., Goeddel, D. V., & Gray, P. W. (1983). Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *The Journal of Experimental Medicine*, *157*(3), 1020–7. <https://doi.org/10.1084/jem.157..1020>
- Noguera, A., & Fermin, G. (2013). Plataformas de expresión en plantas de péptidos humanos terapéuticos: expresión transitoria y estable. (In plant expression platforms of therapeutic human peptides: transient and stable expression). *Avances En Biomedicina*, *2*(3), 17.
- Novelli, G. (2000). Review Transfer and Expression of Foreign Genes in Mammalian Cells, *331*(August).
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K., & Luckow, V. A. (1994). Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual. *Oxford University Press, New York U.a.* Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=de&lr=&id=IP8VFRX8zHMC&pgis=1>
- Ohnesorge, F. M., Hörber, J. K. H., Häberle, W., Czerny, C. P., Smith, D. P. E., & Binnig, G. (1997). AFM review study on pox viruses and living cells. *Biophysical Journal*, *73*(4), 2183–2194. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78250-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78250-X)
- Palomares, L., & Chavez-Peña, C. (2010). EFECTO DE LA DENSIDAD CELULAR Y LA MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BACULOVIRUS

RECOMBINANTES EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE INSECTO, 13(2), 65–72.

Palomares, L., Estrada-Mondaca, S., & Ramirez, O. (2006). Principles and applications of the insect cell- baculovirus expression vector system. In *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies* (pp. 627–692).

Papovich, J. S. (1997). NAFTA's Provisions Regarding Intellectual Property--Are They Working as Intended--A U.S. Perspective. *Canada-United States Law Journal*, 253(January), 8. Retrieved from <http://scholarlycommons.law.case.edu/cuslj/vol23/iss/32>

Pereira, H. G. (1962). The Cytopathic Effect of Animal Viruses. *Advances in Virus Research*, 8(C), 245–285. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60687-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60687-9)

Petiot, E., Cuperlovic-Culf, M., Shen, C. F., & Kamen, A. (2015). Influence of HEK293 metabolism on the production of viral vectors and vaccine. *Vaccine*, 33(44), 5974–5981. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.097>

Petrov, S., Nacheva, G., & Ivanov, I. (2010). Purification and refolding of recombinant human interferon-gamma in urea-ammonium chloride solution. *Protein Expression and Purification*, 73(1), 70–73. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.03.026>

Pfeifer, A., & Verma, I. M. (2001). GENE THERAPY: Promises and Problems. *Genomics*, 2, 177–211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.050304.091637>

Pham, P. L., Kamen, A., & Durocher, Y. (2006). Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. *Molecular Biotechnology*, 34(2), 225–237. <https://doi.org/10.1385/MB:34:2:225>

Posma, J., & Flores, B. (2015). *Mexico Health Review*. (M. Kendall, Ed.). Naucalpan Estado de Mexico. Retrieved from https://issuu.com/mexicobusinesspublishing/docs/mhr_2015_magzter

Prabhu, A. A., Veeranki, V. D., & Dsilva, S. J. (2016). Improving the production of human interferon gamma (hIFN- γ) in *Pichia pastoris* cell factory: An approach of cell level. *Process Biochemistry*, 51(6), 709–718. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.02.007>

Preuss, A. K., Connor, J. A., & Vogel, H. (2000). Transient transfection induces different intracellular calcium signaling in CHO K1 versus HEK 293 cells, 139–145.

- Pugatch. (2017). *Ascending to the peak of biopharmaceutical innovation*. Pugatch consilium. Retrieved from http://www.pugatch-consilium.com/reports/BCI_2017_Report.pdf
- Quek, L. E., Dietmair, S., Hanscho, M., Martínez, V. S., Borth, N., & Nielsen, L. K. (2014). Reducing Recon 2 for steady-state flux analysis of HEK cell culture. *Journal of Biotechnology*, *184*, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.021>
- Rao, L., Perez, D., & White, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *Journal of Cell Biology*, *135*(6), 1441–1455. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.6.1441>
- Razaghi, A., Owens, L., & Heimann, K. (2016). Review of the recombinant human interferon gamma as an immunotherapeutic: Impacts of production platforms and glycosylation. *Journal of Biotechnology*, *240*, 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.022>
- Razaghi, A., Tan, E., Lua, L. H. L., Owens, L., Karthikeyan, O. P., & Heimann, K. (2016). Is *Pichia pastoris* a realistic platform for industrial production of recombinant human interferon gamma? *Biologicals*, *45*, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.09.015>
- Reed, L., & Muench, H. (1958). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Journal of Hygiene*, *27*(3), 493–497.
- Rekosh, D. M. K., Russell, W. C., Bellet, A. J. D., & Robinson, A. J. (1977). Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell*, *11*(2), 283–295. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90045-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90045-9)
- Restelli, V., & Butler, M. (2002). The Effect of Cell Culture Parameters on Protein Glycosylation. In M. Al-Rubeai (Ed.), *Cell Engineering* (pp. 61–92). Netherlands: Kluwer Academic.
- Rinderknecht, E., O'Connor, B. H., & Rodriguez, H. (1984). Natural human interferon-gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation. *The Journal of Biological Chemistry*, *259*(11), 6790–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6427223>
- Rojas, J. A., Pedraza, M., Ordoñez, L. G., Estrada, N. U., Barba de la Rosa, A. P., & De León-Rodríguez, A. (2010). Replicative and integrative plasmids for production of

- human interferon gamma in *Bacillus subtilis*. *Plasmid*, 64(3), 170–176.
<https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2010.07.003>
- Roldão, A., Oliveira, R., Carrondo, M. J. T., & Alves, P. M. (2009). Error assessment in recombinant baculovirus titration: Evaluation of different methods. *Journal of Virological Methods*, 159(1), 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.03.007>
- Román, R., Miret, J., Scalia, F., Casablancas, 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 α 2 signal peptide. *Journal of Biotechnology*, 239, 57–60. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.005>
- Russell, W. C. (2007). Update on adenovirus and its vectors General properties of adenoviruses. *Journal of General Virology*, 2(2000), 1–48.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.17217-0>
- Saha, B., Wong, C. M., & Parks, R. J. (2014). The adenovirus genome contributes to the structural stability of the virion. *Viruses*, 6(9), 3563–3583.
<https://doi.org/10.3390/v6093563>
- Samuel, C. E. (2001). Antiviral Actions of Interferons.pdf, 14(4), 778–809.
<https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.778>
- Sareneva, T., Cantell, K., Pyhälä, L., Pirhonen, J., & Julkunen, I. (1993). Effect of Carbohydrates on the Pharmacokinetics of Human Interferon- γ . *Journal of Interferon Research*, 13(4), 267–9. <https://doi.org/10.1089/jir.1993.13.267>
- Sareneva, T., Mørtz, E., Tölö, H., Roepstorff, P., & Julkunen, I. (1996). Biosynthesis and N-glycosylation of human interferon-gamma. Asn25 and Asn97 differ markedly in how efficiently they are glycosylated and in their oligosaccharide composition. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 242(2), 191–200. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8973632>
- Sareneva, T., Pirhonen, J., Cantell, K., & Julkunen, I. (1995). N-glycosylation of human interferon-gamma: glycans at Asn-25 are critical for protease resistance. *The Biochemical Journal*, 308 (Pt 1(JUNE 1995), 9–14. <https://doi.org/10.1042/bj3080009>
- Schmidt, F. R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(4), 363–372.
<https://doi.org/10.1007/s00253-004-1656-9>

- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, *75*(2), 163–89. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>
- Seth, P., Willingham, M. C., & Pastan, I. (1984). Adenovirus-dependent release of ⁵¹Cr from KB cells at an acidic pH. *Journal of Biological Chemistry*, *259*(23), 14350–14353.
- Silva, C. L. (2012). México retoma un liderazgo regulatorio sobre medicamentos biotecnológicos y biocomparables. *Gaceta Medica de Mexico*, *148*(1), 83–90.
- Sodoyer, R. (2004). Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. *BioDrugs : Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*. <https://doi.org/10.2165/00063030-200418010-00005>
- Stewart, P. L., Fuller, S. D., & Burnett, R. M. (1993). Difference imaging of Adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *The EMBO Journal*, *12*(7), 2589–2599.
- Swiech, K., Picanço-Castro, V., & Covas, D. T. (2012). Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expression and Purification*, *84*(1), 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.04.023>
- Swiech, K., Picanço-Castro, V., & Covas, D. T. (2017). Production of recombinant coagulation factors: Are humans the best host cells? *Bioengineered*, *8*(5), 462–470. <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1279767>
- Tavira, C. (2014). *CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS DE CÉLULAS HEK293 ESTÁTICOS, EN SUSPENSIÓN Y EN MEDIO LIBRE DE SUERO PARA PRODUCCION DE ADENOVIRUS*. Universidad Autonoma del Estado de Morelos.
- Tennant, D. A., Durán, R. V., & Gottlieb, E. (2010). Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, *10*(4), 267–277. <https://doi.org/10.1038/nrc2817>
- Thakor, R. T., Anaya, N., Zhang, Y., Vilanilam, C., Siah, K. W., Wong, C. H., & Lo, A. W. (2017). Just how good an investment is the biopharmaceutical sector? *Nature Biotechnology*, *35*(12), 1149–1157. <https://doi.org/10.1038/nbt.4023>
- Tollefson, A. E., Ryerse, J. S., Scaria, A., Hermiston, T. W., & Wold, W. S. (1996). The E3-

11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology*, 220(1), 152–162. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0295>

Tollefson, A. E., Scaria, A., Hermiston, T. W., Ryerse, J. S., Wold, L. J., & Wold, W. S. (1996). The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *Journal of Virology*, 70(4), 2296–306. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8642656>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC190071>

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>

Virocyt, I. (2013). White Paper : an Overview of Virus Quantification Techniques, 1–5.

Walker, J. M. (2013). *Mammalian Cell Viability, Methods and Protocol. Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Walsh, G. (1995). Chapter 12 The EMEA and regulatory control of (bio) pharmaceuticals within the European Union, 289–290.

Walsh, G. (2002). Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: An issue of nomenclature. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(2), 135–138. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00222-6](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00222-6)

Walsh, G. (2007). *Pharmaceutical biotechnology - concepts and applications. Human Genomics* (Vol. 4). <https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-3-218>

Wang, D., Ren, H., Xu, J., Sun, P., Fang, X., & Ai, E. (2014). Expression, purification and characterization of human interferon- γ in *Pichia pastoris*. *Molecular Medicine Reports*, 9(2), 715–719. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1812>

Weber, J. (1976). Genetic analysis of adenovirus type 2 III. Temperature sensitivity of processing viral proteins. *Journal of Virology*, 17(2), 462–71. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=515438&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

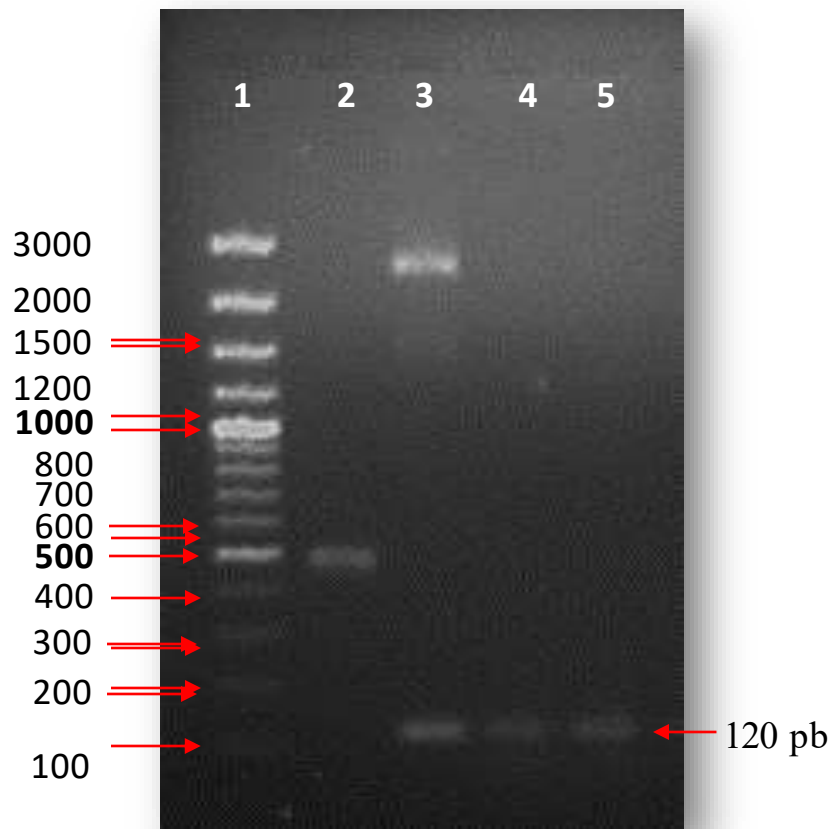
- Webster, A., Russell, S., Talbot, P., Russel, W. C., & Kemp, G. D. (1989). Characterization of the adenovirus proteinase: Substrate specificity. *Journal of General Virology*, 70(12), 3225–3234. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-12-3225>
- Wiga, B. R., Republic, F., With, G., & February, F. A. (1977). Archives of Virology The Kinetics of Adenovirus IMeetion and Spread in Cell Cultures Infeeted With Low Multiplicity 1. *Archives of Virology*, 187, 177–187.
- Woods, N. B., Muessig, A., Schmidt, M., Flygare, J., Olsson, K., Salmon, P., ... Karlsson, S. (2003). Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: Risk of insertional mutagenesis. *Blood*, 101(4), 1284–1289. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2238>
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1393–1398. <https://doi.org/10.1038/nbt1026>
- Yamada, K., Morishita, N., Katsuda, T., Kubo, S., Gotoh, A., & Yamaji, H. (2009). Adenovirus vector production using low-multiplicity infection of 293 cells. *Cytotechnology*, 59(3), 153–160. <https://doi.org/10.1007/s10616-009-9208-x>
- Young, H., & Hardy, K. (1995). Role of interferon- γ in immune cell regulation. *Journal of Leukocyte Biology*, 58(4), 373.
- Zagari, F., Jordan, M., Stettler, M., Broly, H., & Wurm, F. M. (2013). Lactate metabolism shift in CHO cell culture: The role of mitochondrial oxidative activity. *New Biotechnology*, 30(2), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.05.021>
- Zemella, A., Thoring, L., Hoffmeister, C., & Kubick, S. (2015). Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems. *ChemBioChem*, 16(17), 2420–2431. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500340>

14. Anexos

14.1 RT-PCR del gen de IFN- γ en células HEK 293

En el 2017, Sánchez Pacheco para su tesis de Licenciatura realizó un análisis del ARNm para IFN- γ en cultivos de HEK293 a 72 y 96h post-transducción, en la figura de abajo se

observa que los carriles 4 y 5 muestran la amplificación de los transcritos de IFN- γ en 120 pb.



Análisis del ARNm para IFN- γ en cultivos a 72 y 96h post-transducción. Los carriles 1, 2 y 3 muestran: el MPM (O'GeneRuler 100pb DNA Ladder Plus), ctrl (+) de RT-PCR (gen GAPDH en 496 pb) y ctrl (+) del gen IFN- γ (pVAX/IFN- γ) respectivamente. Los carriles 4 y 5 muestran la amplificación de los transcritos de IFN- γ en 120 pb a 72 y 96h post-transducción respectivamente; demostrando que el transgen fue transferido a las células HEK-293 de manera eficiente.