



CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS ESTÁTICOS Y EN SUSPENSIÓN DE CÉLULAS HEK293 UTILIZADAS EN LA PRODUCCIÓN DE VECTORES ADENOVIRALES PARA TERAPIA GENICA.

Carlos Alberto Tavira Montalván, Violeta Guadarrama Pérez, Angélica Meneses Acosta.

Facultad de Farmacia- Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. CP. 62010. angelica_meneses@uaem.mx. Tel: (52) (777) 329 7000 ext. 3366

Palabras clave: HEK293, cinéticas de crecimiento, muerte celular.

Introducción. La terapia génica postula el uso terapéutico del ADN para reemplazar genes defectuosos o para contrarrestar otros sobreexpresados en el tratamiento de enfermedades. La habilidad de los adenovirus para infectar una gran variedad de células así como la facilidad para manipular su genoma y su alta bioseguridad han hecho de ellos una herramienta extremadamente atractiva para su utilización en protocolos de terapia génica. HEK293 es la línea celular empaquetadora por excelencia de vectores adenovirales; proviene de riñón de embrión humano y ha sido transformada con la región E1 del genoma del Adenovirus Tipo 5 (Adv5)⁽¹⁾. Con la finalidad de eficientar la producción de vectores adenovirales es necesario profundizar en el conocimiento de la célula hospedera bajo diferentes condiciones de cultivo.

Por ello, en este trabajo se plantea la caracterización de cultivos de la línea celular HEK293 durante la adaptación de cultivos estáticos a suspensión para establecer un sistema de producción de vectores adenovirales en células HEK293.

Metodología. Las células HEK293 se cultivaron en frascos estáticos y en suspensión utilizando medio suplementado con SFB (5% y 10%) y medio libre de suero. Se realizaron cinéticas de crecimiento, consumo de nutrimentos y de muerte celular en cada caso. Además se determinó el ciclo celular en cada uno de los cultivos. Como control positivo de muerte celular se realizó una cinética de inducción de muerte con temperatura (42°C) y se analizaron todos los ensayos mediante citometría de flujo de acuerdo con lo reportado anteriormente⁽²⁾.

Resultados y discusión. Se observó que la velocidad específica de crecimiento (μ) y la concentración final de células HEK293 tanto en cultivos estáticos como en suspensión difiere de acuerdo al número de pase del cultivo, a la concentración de SFB y el medio utilizado, obteniéndose los mayores valores en medios libres de suero. En el análisis del consumo de nutrimentos se determinó que la glucosa no es un nutrimento limitante pero si la glutamina. En las cinéticas de muerte

analizadas por citometría de flujo se observó el arresto en la fase G1/G0 del ciclo celular y una muerte celular con características principalmente apoptóticas. En la Figura 1 se muestran los cambios de morfología presentes durante la adaptación a cultivos en suspensión donde es evidente el cambio de tamaño y de forma durante este proceso. Esta adaptación se logró después de tres-cinco pases en medio de cultivo libre de suero y suplementado con Pluronic F68.

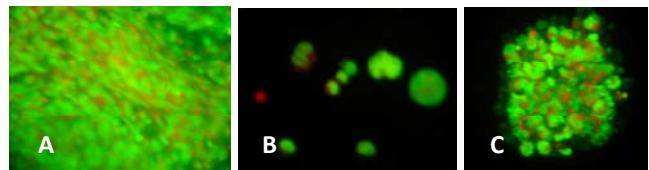


Fig. 1. HEK293 teñidas con naranja de acridina observadas en microscopio de epifluorescencia. A. HEK293 en monocapa. B. HEK293 disgregadas con morfología viable. C. Cúmulo de células HEK293 característico durante la adaptación a cultivos en suspensión.

Conclusiones. El cultivo libre de suero en suspensión fue el que brindó mejores resultados con respecto a los rendimientos celulares. La glucosa no fue un nutrimento limitante. La mayoría de los cultivos se arrestaron en la fase G1/G0 y procedió una muerte celular con características apoptóticas principalmente. Esta información profundiza en el conocimiento de la línea celular HEK293 y permite establecer algunas estrategias de mejoramiento para la producción de vectores adenovirales.

Agradecimientos. A PROMEP-SEP, a la FF-UAEM por las facilidades brindadas para el desarrollo de este proyecto.

Bibliografía.

1. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 36:59-74.
2. Meneses-Acosta A, Mendonça RZ, Merchant H, Covarrubias L, Ramírez OT. 2001. Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures. *Biotechnol Bioeng.* 72, 441 – 457.