



VELOCIDAD DE CONSUMO DE OXÍGENO COMO PARÁMETRO PARA DETERMINAR LA FRACCIÓN DE CÉLULAS INFECTADAS EN EL SISTEMA DE CÉLULAS DE INSECTO-BACULOVIRUS.

Adriana Rodríguez Navarro, Paul Mondragón, Octavio Tonatiuh Ramírez y Laura A. Palomares

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología.

Universidad Nacional Autónoma de México. Ave. Universidad 2001 Cuernavaca, 62210, Morelos, MEXICO.

Fax: (777)3138811, correo electrónico: laura@ibt.unam.mx

Palabras clave: Velocidad de consumo de oxígeno, infección viral, proteína recombinante

Introducción. La disponibilidad de herramientas de monitoreo en línea es importante en todos los procesos. En este sentido, la velocidad de consumo de oxígeno proporciona importante información en cultivos de células de insecto, como es la estimación de la concentración celular viable.^(1,2) También se ha observado que la VCO disminuye al agotarse los nutrientes (glucosa y glutamina)^(1,2) y aumenta al momento de infección.⁽²⁾

El objetivo de este trabajo es determinar la relación entre la velocidad de consumo específica (q_{O_2}) y la fracción de células infectadas en el sistema de células de insecto-baculovirus con el fin de utilizarla para monitorear el proceso y como auxiliar en la determinación de títulos virales.

Metodología. Se utilizó la línea celular High FiveTM cultivada en medio Sf-900II y un poliedrovirus nuclear de *Autographa Californica* recombinante que codifica para la proteína alcalino fosfatasa de placenta humana secretada (SEAP). La cuantificación de glucosa, lactato y glutamina se realizó en un YSI 2700. Se determinó la actividad de la enzima recombinante al seguir la ruptura de parnitrofenol fosfato con un espectrofotómetro. Se utilizó un biorreactor de 300 mL (volumen de trabajo 250 mL) a 27°C, agitado a 100 rpm y aireación superficial. El oxígeno disuelto se controló a 20% por medio de la presión parcial de oxígeno usando controladores de flujo másico de O_2 y N_2 . La VCO se determinó en línea por medio de un balance de oxígeno en la fase líquida.^(1,2) Se realizaron cultivos no infectados (control) e infectados a multiplicidades de infección (MDI) de 0.4, 1, 5 y 10ufp/cel por duplicado. Todos los cultivos se iniciaron con una concentración celular viable de 0.5×10^6 cel/mL y se infectaron a 1×10^6 cel/mL.

Resultados y discusión. En el cultivo control se observó que la VCO aumenta a la par del crecimiento exponencial, el aumento cesa al agotarse la glutamina (fase estacionaria) y disminuye proporcionalmente a la viabilidad celular al agotarse la glucosa. La velocidad específica de crecimiento (μ) y la q_{O_2} promedio en células no infectadas en crecimiento exponencial fueron de $0.031 h^{-1}$ y de $6.87 \times 10^{-10} mmol O_2 / cel h$, respectivamente. Se comprobó que la VCO aumenta al momento de la infección. El porcentaje de aumento de la VCO es mayor a bajas MDI (51%, 0.4ufp/cel) y disminuye exponencialmente conforme se aumenta la MDI (36%, 10ufp/cel). Por otra parte, la expansión celular disminuye

linealmente conforme se aumenta la MDI (41 y 22% con MDI de 0.4 y 10 respectivamente). El porcentaje de aumento de q_{O_2} durante la infección incrementa de manera logarítmica conforme aumenta la MDI, empezando con un aumento de 19% (0.4ufp/cel) y llegando a un máximo de 26% (10 ufp/cel) (Figura 1). También se observó que el tiempo en el que se alcanza la q_{O_2} máxima disminuye exponencialmente conforme se aumenta la MDI. Este retraso se debe a que a MDIs bajas (<5ufp/cel) solo una fracción de las células se infecta inicialmente, y el resto se infecta durante la infección secundaria entre las 6 y 20 h. No se observó incremento en las velocidades específicas de consumo de glucosa y glutamina después de la infección.

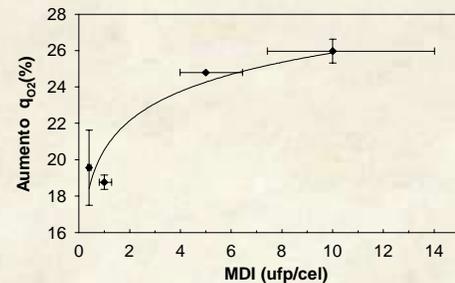


Fig 1. Aumento máximo de q_{O_2} a partir del tiempo de infección. Las barras de error en y representan el rango obtenido de dos experimentos (excepto MDI 5 ufp/cel) y en x el error del método utilizado para la titulación viral.

Conclusiones. Se comprobó que la determinación en línea de la velocidad de consumo de oxígeno es una herramienta poderosa para estimar la eficiencia de la infección y para estimar el estado en el que se encuentra la infección en un momento determinado.

Agradecimientos. Asistencia técnica V. Hernández. Apoyo económico PAPIIT-UNAM IX254404.

Bibliografía.

- Palomares, L.A., Ramírez, O.T. (1996). The effect of dissolved oxygen tension and the utility on oxygen uptake rate in insect cell culture. *Cytotechnol.* 22: 225-237.
- Palomares, L.A., López, S., Ramírez, O.T. (2004). Utilization of oxygen uptake rate to assess the role of glucose and glutamine in the metabolism of infected insect cell cultures. *Biochemical Eng. J.* 19 (1): 87-93.