

## OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE TRANSFECCIÓN DE CULTIVOS CELULARES EN SUSPENSIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO

**Leschiutta, Lautaro**

*Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico  
Centro Biotecnológico del Litoral (FBCB-UNL)*

Director: Fontana, Diego  
Codirector: Garay, Ernesto

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Transfección, HEK293T, proteínas recombinantes.

### INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la transfección transiente de células animales es una de las tecnologías más utilizadas en la producción de proteínas recombinantes de interés bioterapéutico. Consiste en un proceso de transferencia de genes heterólogos, que aprovecha la capacidad de expresar el ADN de forma episomal sin ser integrado al genoma, permitiendo obtener cantidades necesarias de un producto de interés en un corto período de tiempo (Fuenmayor y col., 2018). Existen múltiples factores que afectan el desempeño de la metodología y, por tanto, reducen la eficiencia de transfección alcanzada. Por su parte, la selección de la línea celular que se emplee para tal fin será crucial para garantizar eficiencias adecuadas. En este sentido, una de las líneas celulares establecidas más comúnmente utilizadas son las HEK293 (*Human Embryonic Kidney*), por sus múltiples ventajas en cuanto a su adaptabilidad a cultivos en suspensión, como por su capacidad de expresar altos niveles de proteínas recombinantes. Por otro lado, las características de los medios de cultivos y las condiciones empleadas, previo, durante y posterior a la transfección, juegan un rol fundamental en este escenario, ya que deben garantizar la sobrevivencia celular y favorecer el proceso de incorporación del material genético (Liu y col., 2008).

En nuestro laboratorio contamos con células HEK293 adaptadas a crecimiento en suspensión en medio EX-CELL 293. Este medio es libre de suero fetal bovino y de toda proteína animal, y que contiene hidrolizados vegetales. Utilizando este medio, logramos obtener cultivos con elevadas densidades celulares y altos niveles de expresión, pero no es apto para ser utilizado en ensayos de transfección. Por este motivo, nos propusimos evaluar otros medios de cultivos libres de suero y optimizar las condiciones de transfección con el objetivo de lograr un elevado porcentaje de células transfectadas y un alto nivel de expresión de proteínas recombinantes.

### OBJETIVOS

- Evaluar y comparar la eficiencia de transfección de células HEK293 adaptadas al crecimiento en suspensión (sHEK293), utilizando 3 medios libres de sueros comerciales.
- Poner a punto las condiciones experimentales que permitan optimizar la transfección transiente de células sHEK293, mediante la utilización de complejos PEI-ADN.

Título del proyecto: Estrategia biotecnológica para el desarrollo de virus-like particles quiméricas como plataforma de diseño de vacunas recombinantes.

Instrumento: PICT Joven.

Año convocatoria: 2017.

Organismo financiador: FONARSEC-ANPCyT.

Director: Diego Fontana.

## METODOLOGÍA

### Cultivo de células sHEK293

Rutinariamente, las células sHEK293 fueron cultivadas en el medio EX-CELL 293 (SAFC®), siendo las mismas subcultivadas cada 48-72 h, y manteniendo la densidad celular entre 0,6 y  $6 \times 10^6$  cél./mL. Por otro lado, durante los ensayos de transfección, las células fueron cultivadas en los medios HyCell TransFx-H (HyClone™, Cytiva) y 73810C (correspondiente a un medio de cultivo en instancias de desarrollo; imMEDIATE ADVANTAGE™, SAFC®).

### Transfección transiente

48 h previas al momento de la transfección se realizaron subcultivos en una densidad promedio de  $7 \times 10^5$  cél./mL, en los medios de cultivo a evaluar. El día de la transfección se realizó un nuevo recambio total del medio de cultivo, a través de un paso de centrifugación, dejando las células en una densidad celular de  $2 \times 10^6$  cél./mL. Como agente de transfección se utilizó polietilenimina (PEI) en una relación de 2  $\mu$ g de polímero por cada 1  $\mu$ g de ADN, junto a diversas construcciones de ADN plasmídico que codifican para proteínas reporteras fluorescentes y que permiten monitorear de forma sencilla la eficiencia de transfección (pLV-GFP y pZsCMV-Green). Los complejos PEI-ADN se administraron en un volumen correspondiente al 10% del total del volumen del cultivo.

### Evaluación de la expresión de proteínas fluorescentes mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia

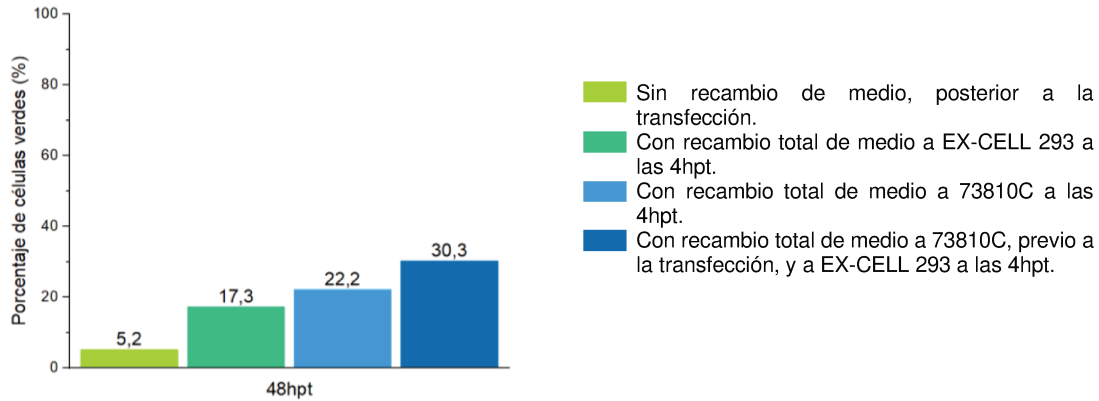
Se caracterizó el crecimiento celular, en cuanto a morfología celular, tendencia a formar agregados celulares y emisión de fluorescencia, a través de la observación comparativa entre microscopía óptica de campo claro y microscopía de fluorescencia (Eclipse Ti, Nikon). Por otra parte, se cuantificaron las poblaciones celulares que expresaron las proteínas fluorescentes, mediante citometría de flujo (GUAVA EasyCyte, Luminex) utilizando el software GUAVA ExpressPlus (Luminex).

## RESULTADOS

En un primer momento, las células sHEK293 fueron adaptadas al crecimiento en el medio 73810C, siendo subcultivadas por dilución y conservadas en agitación. Se observó un buen crecimiento, con tasas de duplicación celular equivalentes al medio EX-CELL 293, sin embargo, aparecieron con más frecuencia agregados celulares. Estos generan, principalmente, heterogeneidad al acceso de nutrientes entre las células, provocando entornos deletéreos y acelerando los fenómenos de muerte celular.

Atendiendo a estas condiciones y a la adaptación inmediata de las células sHEK293 al medio de transfección, se prosiguió a subcultivar las células solamente por dos pasajes y durante 48 horas, para luego transfectarse de forma transiente mediante el agregado de complejos PEI-ADN, en una concentración de  $1 \mu$ g ADN/ $1 \times 10^6$  células.

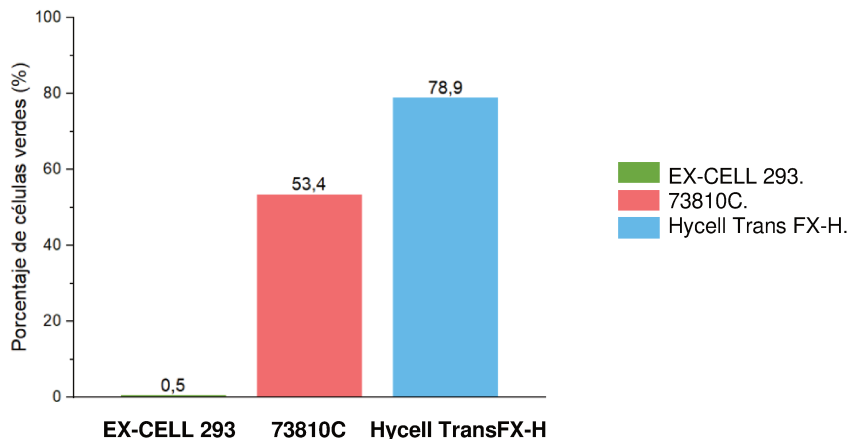
Se ensayaron varias condiciones de transfección, en las que se comparó la influencia del recambio parcial o total de los medios, tanto previo como posterior a la transfección (Figura 1).



**Figura 1. Transfección transiente de células sHEK293, utilizando el medio 73810C, para diferentes condiciones experimentales.** 4 horas post transfección (hpt) se llevaron a cabo recambios de medio, según corresponda. 48 hpt las células fueron analizadas por citometría de flujo. Se grafica el porcentaje de células GFP positivas.

Como puede observarse, fue posible transfectar células HEK293 utilizando el medio 73810C, pero el porcentaje de células positivas no alcanzó valores elevados, siendo el valor más alto de tan solo 30,3%. Sin embargo, de estos resultados se puede observar una cierta tendencia de mejoría al realizar recambios de medio, destacándose aquella que implica un recambio total del medio de transfección previo a la incorporación de los complejos PEI-ADN y, posteriormente, un recambio total del medio a EX-CELL 293 a las 4 horas post-transfección. En virtud de ello, se decidió continuar los ensayos empleando este último procedimiento e incorporando al estudio el medio de transfección Hycell TransFX-H.

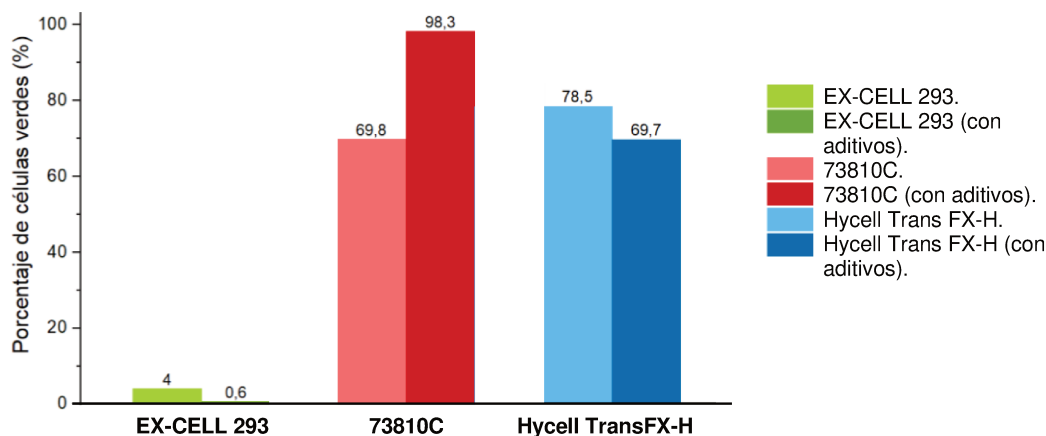
De esta oportunidad, el porcentaje de células transfectadas obtenidas fue de 53,4% para el medio 73810C y 78,9% para Hycell TransFX-H (Figura 2). Estos resultados vislumbran el potencial y la efectividad que adquieren estos medios para llevar a cabo transfecciones transientes en suspensión, notablemente superiores que el medio EX-CELL 293.



**Figura 2. Comparación de la eficiencia de transfección de células HEK293, utilizando los medios EX-CELL 293, 73810C y Hycell TransFX-H, respectivamente.** Las células fueron subcultivadas con recambio completo del mismo medio, antes de la transfección, y a las 4hpt, se pasaron a medio fresco EX-CELL 293. Los resultados fueron obtenidos a las 48hpt, mediante citometría de flujo. Se grafica el porcentaje de células GFP positivas.

En última instancia, se ensayó la incorporación de aditivos a los medios, particularmente, de cafeína y ácido valproico, dadas sus capacidades descritas de incrementar la productividad de proteínas recombinantes en cultivos celulares (Cervera y col., 2015). De esta forma, en el momento del recambio del medio a las 4hpt, los aditivos se adicionaron en concentraciones de 2,5mM y 1,68mM, respectivamente. Como puede verse en la figura 3, el agregado de

aditivos al cultivo en medio 73810C tuvo un efecto positivo, observándose un incremento notable en el porcentaje de células positivas, en comparación a la condición con ausencia de estos aditivos. Por otra parte, en el medio Hycell TransFX-H se mostró un leve descenso en el porcentaje de células verdes, lo que podría indicar que en este medio y bajo esta metodología, el agregado de estos aditivos durante una transfección transiente no tiene efectos positivos para la producción de proteínas recombinantes.



**Figura 3. Efecto de la adición de aditivos en la eficiencia de transfección.** 4 hpt se adicionó cafeína (2,5mM) y ácido valproico (1,68mM), posterior al recambio de medio a EX-CELL 293. Los resultados fueron evaluados a las 72 hpt, mediante citometría de flujo. Se grafica el porcentaje de células GFP positivas.

### CONCLUSIONES

El estudio de medios de cultivo en fases de desarrollo y comerciales brinda la posibilidad de conocer y disponer de alternativas que estimulen las prácticas actuales de investigación, profundizando el conocimiento en el cultivo de células animales y fortaleciendo su potencial para el desarrollo de tecnologías a pequeña y gran escala.

En esta instancia, la investigación llevada a cabo logró demostrar la efectividad que adquieren los medios HyCell Trans Fx-H y 73810C para la transfección de células sHEK293. Asimismo, el estudio exhaustivo de diversas variables experimentales (agregado de aditivos, distintos vectores de expresión y recambios de medio) permitió optimizar el procedimiento a seguir en este tipo metodologías, afianzando varias de las condiciones que permitirían mejorar las eficiencias de transfección.

Finalmente, se continuará trabajando para profundizar en nuevas alternativas, que involucren evaluar la aplicación de esta metodología en la expresión de proteínas de interés comercial.

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Cervera, L., Fuenmayor, J., González-Domínguez, I., Gutiérrez-Granados, S., Segura, M. M. y Gòdia, F., 2015.** Selection and optimization of transfection enhancer additives for increased virus-like particle production in HEK293 suspension cell cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(23), 9935-9949.

**Fuenmayor, J., Cervera, L., Gutiérrez-Granados, S. y Gòdia, F., 2018.** Transient gene expression optimization and expression vector comparison to improve HIV-1 VLP production in HEK293 cell lines. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(1), 165-174.

**Jäger, V., Büssow, K. y Schirrmann, T., 2015.** Transient recombinant protein expression in mammalian cells. *Animal cell culture*, 27-64.

**Liu, C., Dalby, B., Chen, W., Kilzer, J. M. y Chiou, H. C., 2008.** Transient transfection factors for high-level recombinant protein production in suspension cultured mammalian cells. *Molecular biotechnology*, 39(2), 141-153.