



Encuentro
de JÓVENES
INVESTIGADORES

“GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES Y CLONES CHO-K1 PRODUCTORES DE GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA RECOMBINANTE PARA USO VETERINARIO”

Cervetti, Joaquin

Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico CBL-UNL

Directora: Dra. Gugliotta, Agustina

Codirector: Dr. Prieto, Claudio

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Gonadotropina coriónica humana recombinante (rhCG), células CHO-K1, producción

INTRODUCCIÓN

En Argentina la ganadería constituye una de las actividades económicas más importantes y rentables. Si bien los vacunos lideran la producción ganadera de la región, la proteína de origen porcina representa la más consumida a nivel mundial. Particularmente en nuestro país, tanto el consumo como la exportación de carne porcina y sus derivados ha ido en aumento en los últimos años. Estos hechos ponen en evidencia la importancia de esta actividad para el desarrollo de nuestra región. Por lo tanto, resulta imperiosa la búsqueda constante de nuevas estrategias y tecnologías para incrementar la eficiencia reproductiva de las haciendas ganaderas.

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es una hormona glicoprotéica compuesta por una subunidad α y una subunidad β unidas mediante un enlace disulfuro (Cole, 2015). En la industria veterinaria, la hCG se utiliza para tratamientos de fertilidad en diferentes especies ganaderas como vacas, cerdos, ovejas, caballos y cabras entre otras (Casarini, 2016). Actualmente, la hCG disponible en la industria veterinaria se obtiene mediante purificación a partir de orina de mujeres posmenopáusicas, lo que presenta desventajas tales como la presencia de impurezas remanentes en el producto final, así como también la falta de reproducibilidad entre lotes. Por lo tanto, el desarrollo de un nuevo producto basado en rhCG utilizando tecnología de cultivo de células animales es de gran interés.

OBJETIVO

Desarrollo y caracterización de líneas celulares y clones CHO-K1 productores de rhCG, potencial bioterapéutico para la industria veterinaria.

Título del proyecto:

“Nueva Gonadotropina Coriónica humana recombinante (rhCG) para la industria veterinaria: desarrollo y caracterización del proceso de producción”

Instrumento: Beca EVC-CIN

Año convocatoria: 2021

Organismo financiador: Consejo Interuniversitario Nacional

Directora: Gugliotta, Agustina



METODOLOGÍA Y RESULTADOS

Caracterización de la línea celular recombinante y clones productores de rhCG

Originalmente se trabajó con la línea celular sCHO Td4 rhCG y los clones 3A2 y 3D6 provenientes de la misma, obtenidos durante trabajos previos en nuestro laboratorio. Se confeccionaron curvas de crecimiento a partir de cultivos en suspensión en dos medios de cultivo (Excell 302 y BHK-PM), y se realizaron determinaciones de densidad y viabilidad celular mediante tinción con azul de tripán y recuento en cámara de Neubauer. Además, se determinó la concentración de glucosa empleando el kit comercial “Glucosa Enzimática” de Sociedad de Bioquímicos y lactato utilizando el kit comercial “Lactate” de Wiener Lab. La cuantificación de rhCG presente en sobrenadantes de cultivo fue realizada mediante ensayos de ELISA sándwich. Con los datos adquiridos se calcularon los parámetros específicos de cultivo que sirvieron para comparar el desempeño de las líneas y clones celulares (tabla 1). Los resultados mostraron que la línea celular presentaba mejores características de crecimiento y producción de rhCG, siendo la mejor candidata para el cultivo en biorreactor.

Tabla 1. Parámetros específicos de cultivo - Línea sCHO Td4 rhCG y clones 3A2 y 3D6

Medio de Cultivo	Línea sCHO Td4 rhCG			Clon 3A2			Clon 3D6		
	μ Días ⁻¹	t_d Días	q_{rhCG} pg \times cél. ⁻¹ \times día ⁻¹	μ Días ⁻¹	t_d Días	q_{rhCG} pg \times cél. ⁻¹ \times día ⁻¹	μ Días ⁻¹	t_d Días	q_{rhCG} pg \times cél. ⁻¹ \times día ⁻¹
Excell 302	0,57 \pm 0,04	1,2 \pm 0,1	0,13 \pm 0,01	0,37 \pm 0,06	1,9 \pm 0,3	0,23 \pm 0,02	0,29 \pm 0,04	2,4 \pm 0,3	0,18 \pm 0,02
BHK-PM	0,42 \pm 0,03	1,7 \pm 0,1	0,25 \pm 0,01	0,26 \pm 0,02	2,7 \pm 0,2	0,20 \pm 0,03	0,27 \pm 0,03	2,6 \pm 0,3	0,24 \pm 0,03

Producción de rhCG en biorreactor de 1L y seguimiento de variables de cultivo

La línea sCHO Td4 rhCG fue cultivada en biorreactor tanque agitado operado en modo perfusión. A diario se llevó a cabo la recolección de muestras de sobrenadantes de cultivo y el monitoreo de la densidad celular, viabilidad, temperatura, concentración de oxígeno, concentración de lactato y concentración de glucosa (figura 1). Posteriormente se determinó la concentración de rhCG y se calculó la productividad específica. Los resultados mostraron un descenso de la productividad de rhCG en el tiempo. En función de estos resultados se tomó la decisión de dar inicio a la generación de nuevas líneas celulares.

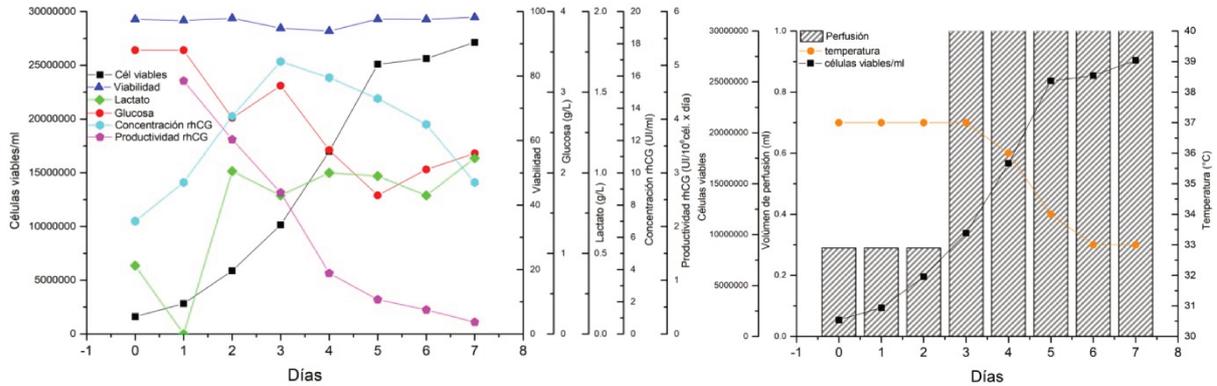


Figura 1: Monitoreo de variables de cultivo en biorreactor para la línea sCHO Td4 rhCG

Generación de nuevas líneas celulares recombinantes productoras de rhCG

Se llevó a cabo la generación de nuevas líneas celulares recombinantes productoras de rhCG empleando dos metodologías diferentes, a los fines de ser comparadas: transducción con vectores lentivirales y transfección mediada por lípidos catiónicos. Es importante aclarar que para el primer caso fue necesario ensamblar partículas lentivirales codificantes para las subunidades α y β de rhCG, empleando células empaquetadoras HEK293T/17 que fueron co-transfectadas (empleando Lipofectamine 3000) con los vectores estructurales y de transferencia correspondientes. Los lentivirus generados fueron empleados en la transducción de células sCHO. Ambas metodologías permitieron llevar a cabo exitosamente la generación de líneas celulares, siendo la línea denominada sCHO Tf8 $\alpha+\beta$ rhCG, generada por transfección, la que evidenció la mejor productividad específica (Figura 2).

Clonado de la línea celular sCHO Tf8 $\alpha+\beta$ rhCG

Para el clonado de la línea celular sCHO Tf8 $\alpha+\beta$ rhCG se utilizó la metodología de dilución límite. El crecimiento de los clones fue monitoreado mediante microscopía óptica. Se identificaron clones individuales que fueron evaluados en cuanto a su capacidad de producir rhCG, seleccionándose los clones 2H5, 1D5, 2H10 y 3A10 debido a que mostraron la mayor productividad de rhCG (figura 2).

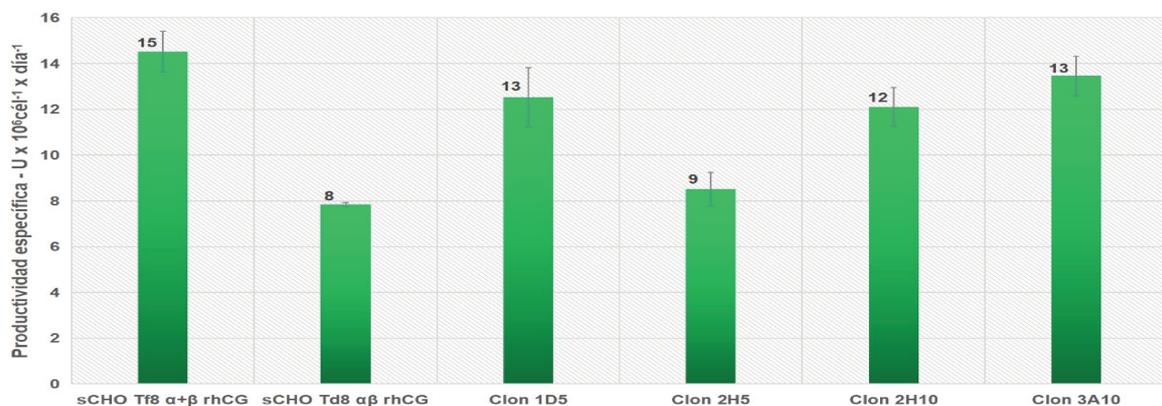


Figura 2. Productividad específica de rhCG para las líneas celulares y clones

Caracterización de clones provenientes de la línea sCHO Tf8 $\alpha\beta$ rhCG

Se confeccionaron curvas de crecimiento a partir del cultivo de los clones en condiciones de adherencia. Los datos obtenidos permitieron calcular los parámetros específicos de cultivo. En la tabla 2 se observa que los clones 1D5 y 2H10 evidenciaron las mejores velocidades específicas de producción de rhCG con características similares entre sí en cuanto a la velocidad de crecimiento.

Tabla 2. Velocidad específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (t_d), y velocidad específica de producción de rhCG (q_{rhCG}) para clones sCHO Tf rhCG

Parámetros Específicos de Cultivo					
	Clon 2H5	Clon 1D5	Clon 2H10	Clon 3A10	Unidades
μ	0,52 \pm 0,03	0,6 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	Días ⁻¹
t_d	1,1 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	Días
q_{rhCG}	0,40 \pm 0,02	0,5 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,28 \pm 0,04	pg \times cél. ⁻¹ \times día ⁻¹

Desarrollo de suero policlonal y evaluación de ensayos de *western blot*

Se llevó a cabo un plan de inmunización en conejo consistente en la administración de tres dosis del producto recombinante comercial Ovidrel como agente antigénico. Finalizada la inmunización se recuperó el suero policlonal anti-rhCG el cual se empleó en ensayos de SDS-PAGE seguido de *western blot*. La detección de las subunidades alfa y beta de rhCG, así como también del heterodímero, fue posible tanto en la muestra pura utilizada como inmunógeno, como así también en sobrenadantes de cultivo.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se llevó a cabo la caracterización de líneas celulares y clones recombinantes productores de rhCG. Para ello se construyeron curvas de crecimiento, viabilidad, producción de lactato, consumo de glucosa y producción de rhCG. La línea celular fue la candidata para el cultivo en biorreactor debido a que exhibió mejores características de crecimiento y producción respecto de los clones. Sin embargo, su cultivo en biorreactor arrojó resultados inesperados, observándose una marcada caída en la producción y productividad específica de rhCG.

Los resultados alentaron la generación de nuevas líneas y clones celulares productores de rhCG, empleando las metodologías de transfección y transducción. A partir de la línea celular generada mediante transfección, seleccionada por presentar la mayor productividad específica, se obtuvieron clones celulares candidatos para continuar trabajando.

BIBLIOGRAFÍA

- Casarini, L.; Brigante, G.**, 2016. Clinical Applications of Gonadotropins in the Female: Assisted Reproduction and Beyond. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 143:85-119.
- Cole, L.A.; Butler, S.A.**, 2015. Human chorionic gonadotropin (hCG) Structure, synthesis, and secretion of hCG and hyperglycosylated hCG. Elsevier.33-44