



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE
DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

**“Establecimiento de las condiciones de cultivo para la expresión de la proteína E2
del subgenotipo 1b del BVDv en células CHO”**

Autor: Josué Sebastián Calderón Palacios

Directoras:

Thelvia Ramos, PhD(c).

Raquel Montesino, PhD.

Sangolquí, 8 de marzo de 2023



1. Introducción

2. Objetivos

3. Metodología

4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones y Recomendaciones



1. Introducción

2. Objetivos

3. Metodología

4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones y Recomendaciones



Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDv)

Infecciones transitorias o persistentes

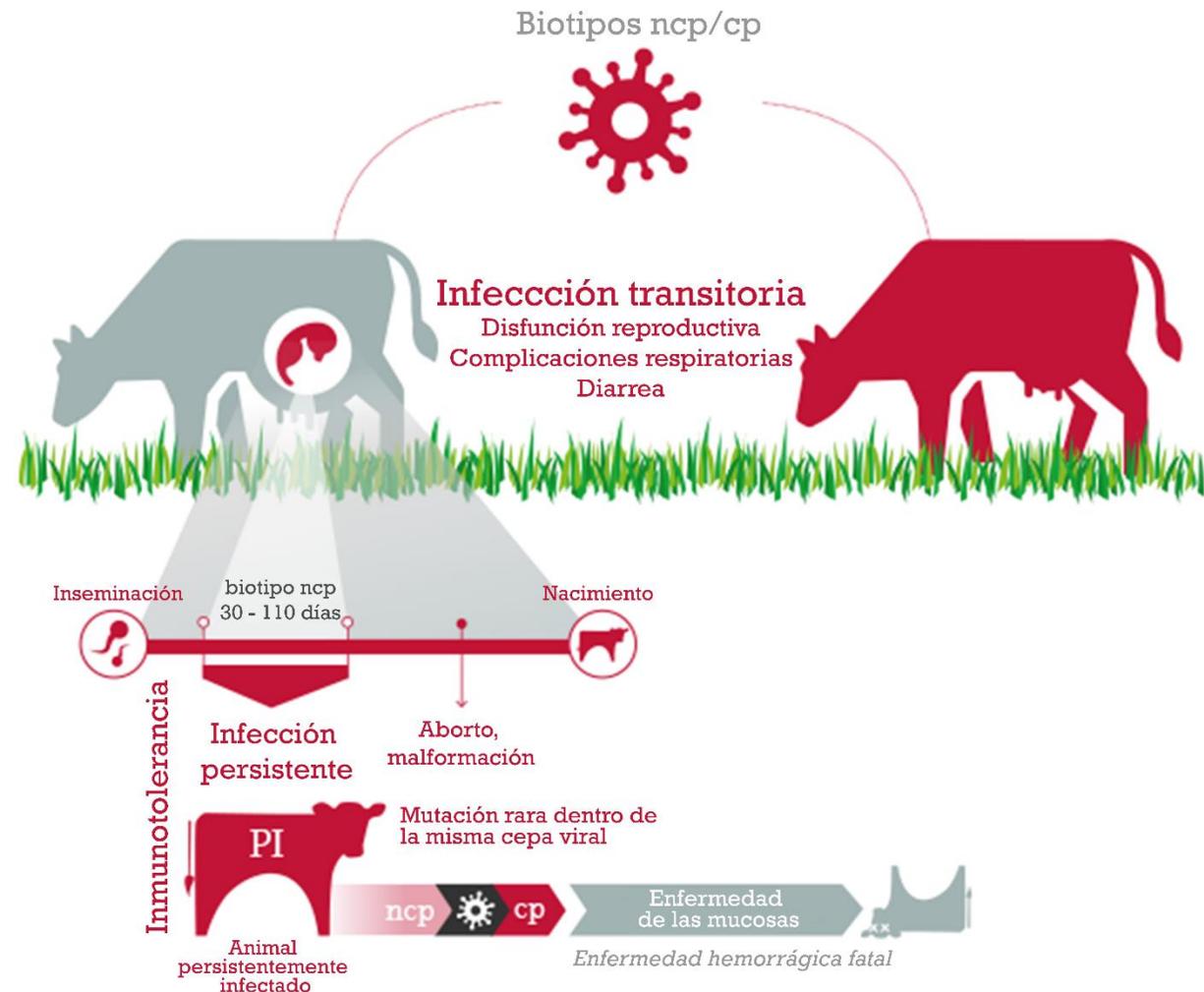
Biotipos **no citopático (ncp)** y citopático (cp)

Animales persistentemente infectados (PI)

Principal fuente de contagio

Pérdidas económicas entre \$10 y \$40 millones de USD por rebaño

Industria ganadera, láctea y cárnica



Control y medidas de prevención

Erradicación ganado PI



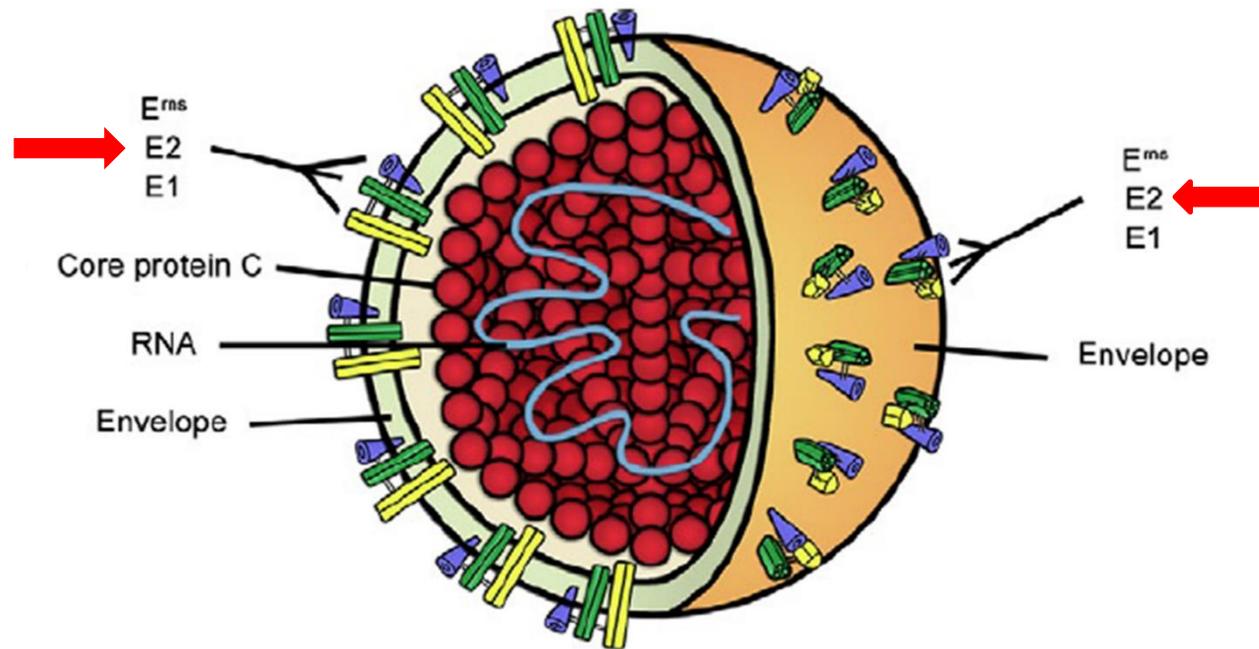
Vacunación



Virus muerto

Virus vivo
modificado

Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDv)



Virus envuelto

ARN monocatenario

Único marco de lectura abierto (ORF)

Proteínas estructurales y no estructurales

E^{ns} , E1 y E2 son inmunogénicas

Clasificación genética

BVDv-1 → 21 subgenotipos

BVDv-2 → 4 subgenotipos

BVDv 3 → nueva

Proteína E2

Peso de 55 kDa

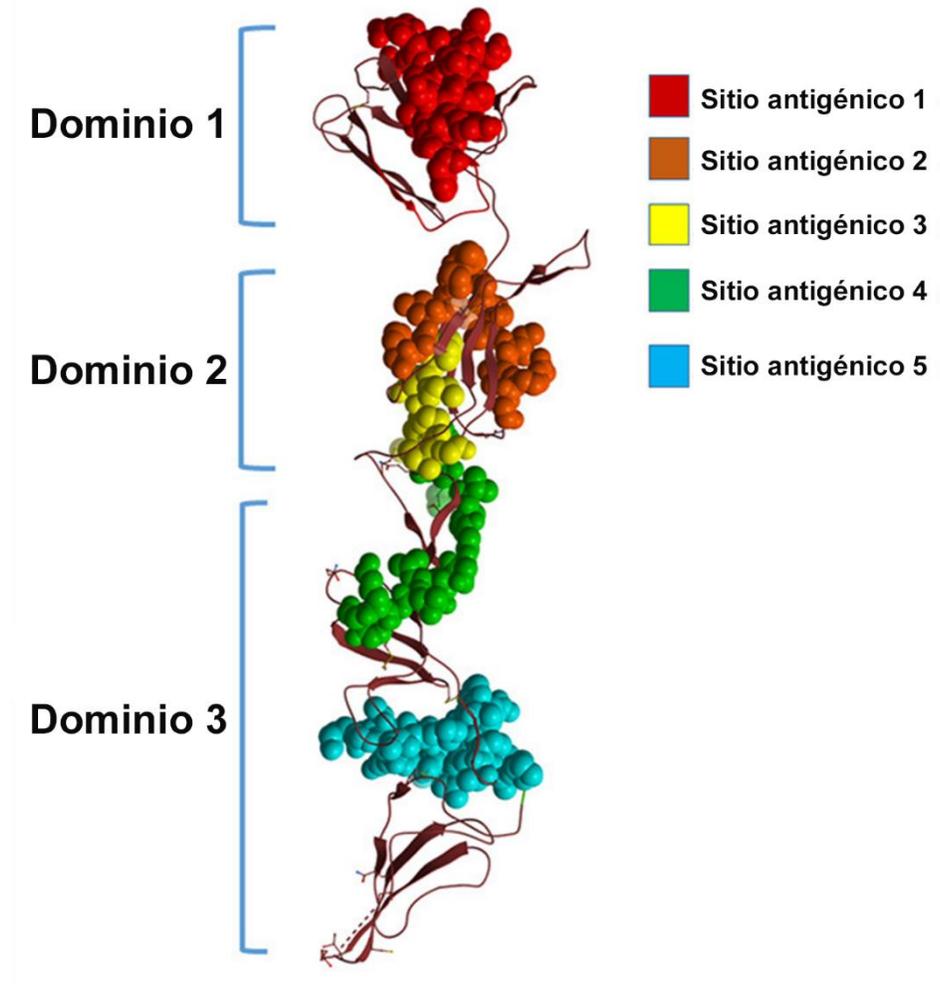
3 dominios y 5 epítomos

Entrada del virus a la células huésped

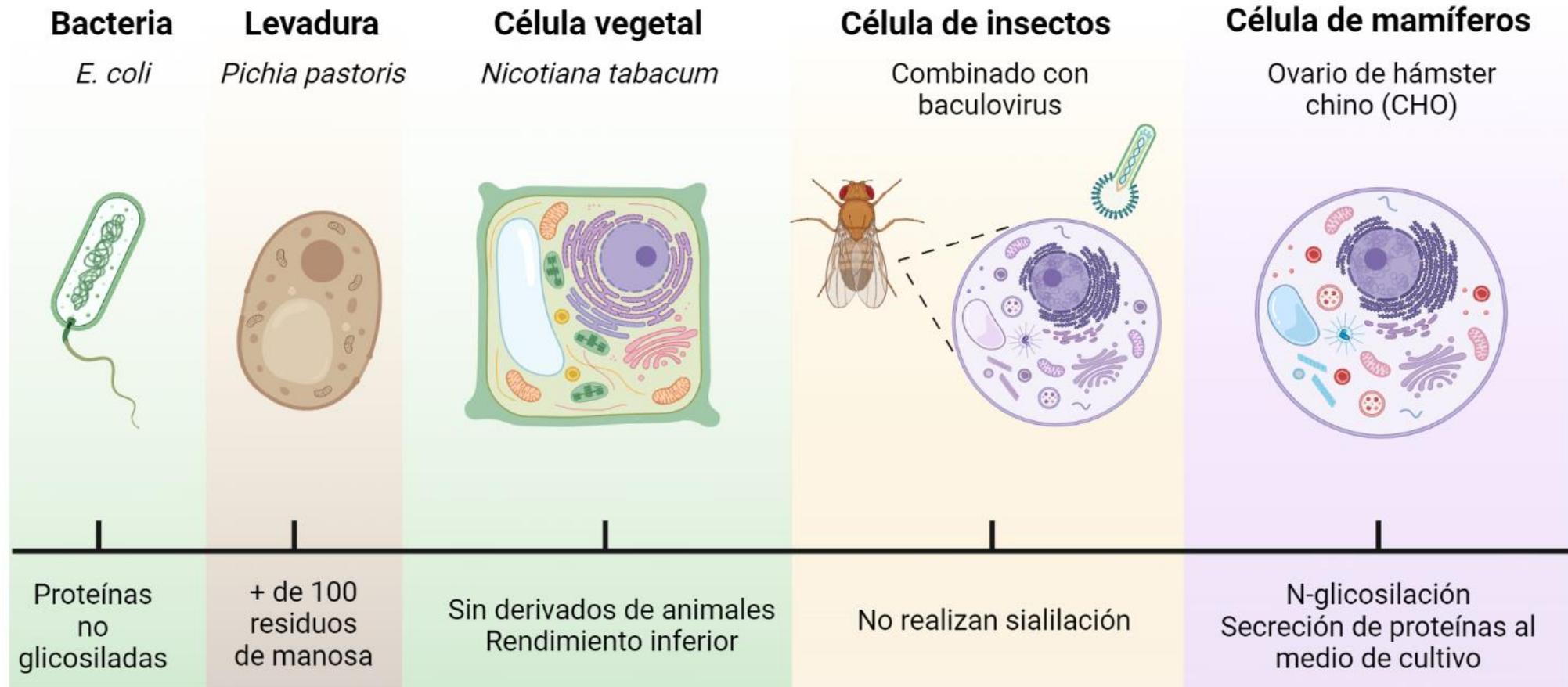
Fusión de membranas

Forma homodímeros E2-E2
y heterodímeros con E1

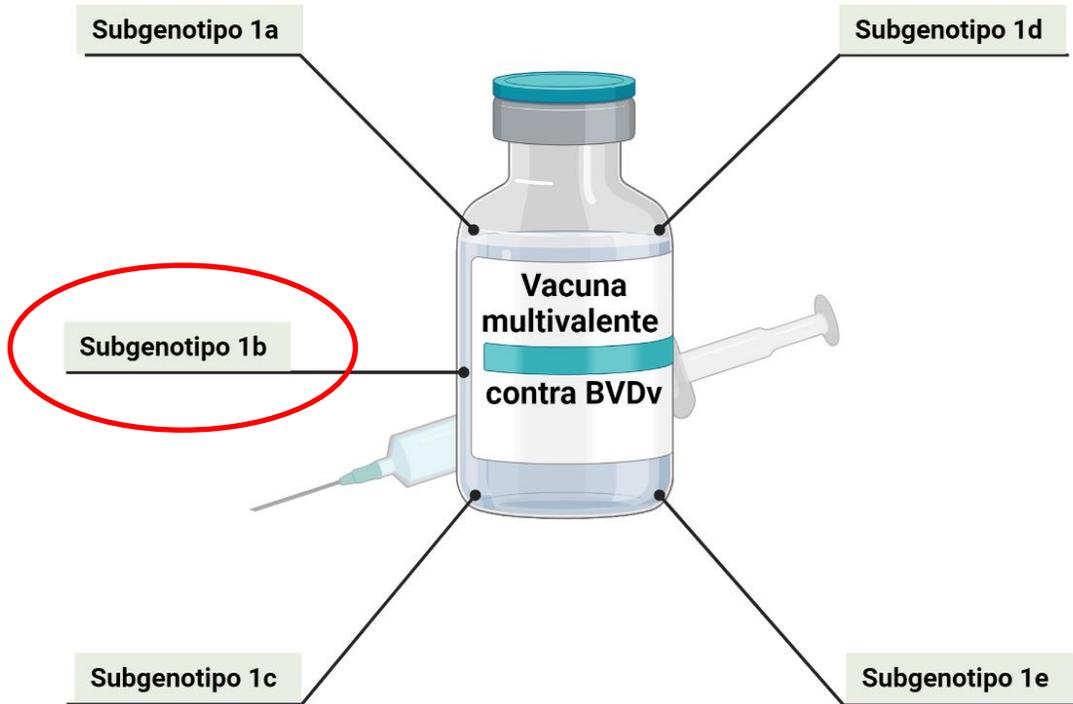
Alta capacidad de inducir anticuerpos
neutralizantes



Sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes



Vacunas de subunidades de antígenos recombinantes



Al menos 1 antígeno viral

Mayor seguridad

Amplia protección vacunal

Identificación del gen, clonaje y expresión

Sistemas heterólogos

Cultivo de células de ovario de hámster chino (CHO)

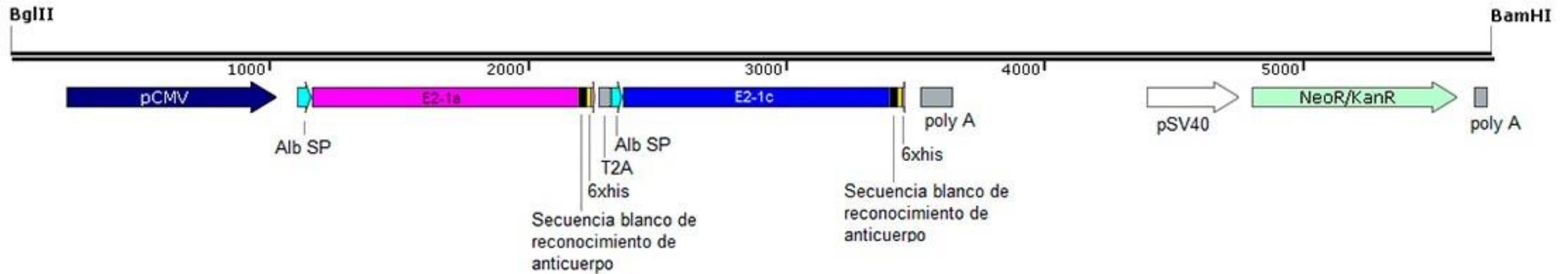


Adherencia



Suspensión

Construcción del vector plasmídico que expresa proteína E2



Promotor de citomegalovirus

Secuencias codificantes para proteína E2

Cola de histidina

Marcador de selección

Antibiótico Genética G418

1. Introducción

2. Objetivos

3. Metodología

4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones y Recomendaciones



Objetivo General

Establecer las condiciones de cultivo en suspensión para la expresión de la proteína E2 del subgenotipo 1b del BVDv en células CHO.



Objetivos Específicos

- Obtener la proteína E2 de células CHO en condiciones de cultivo adherente a partir del clon productor previamente seleccionado
- Adaptar las células CHO del clon productor de proteína E2, del subgenotipo 1b a condiciones de cultivo en suspensión
- Determinar la productividad de expresión de proteína E2 en cada sistema de cultivo de células CHO: adherente vs suspensión



Hipótesis

El rendimiento de producción de la proteína E2 obtenida de células CHO en condiciones de cultivo en suspensión es mayor en relación a la obtenida en condiciones adherentes.



1. Introducción

2. Objetivos

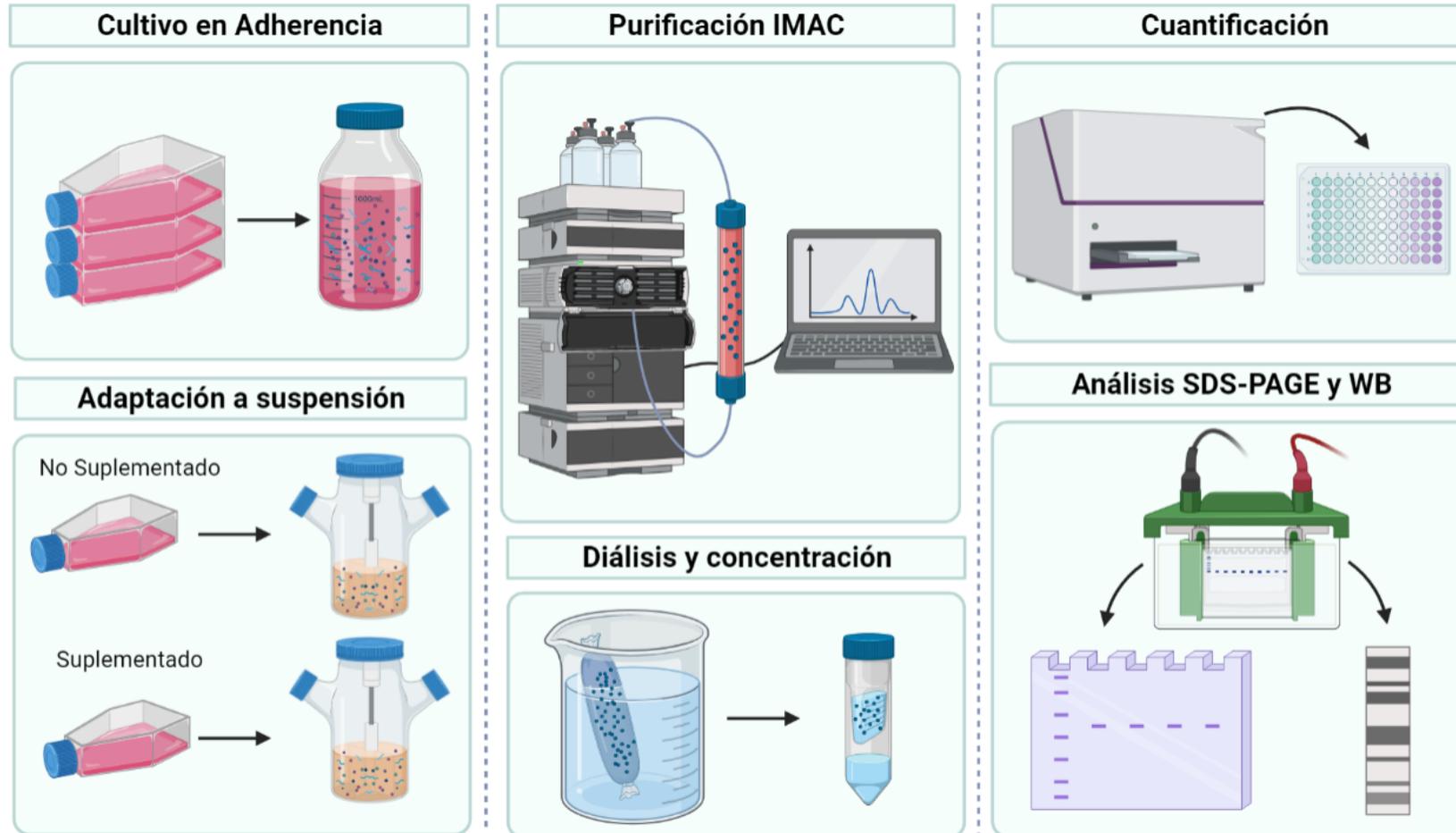
3. Metodología

4. Resultados y Discusión

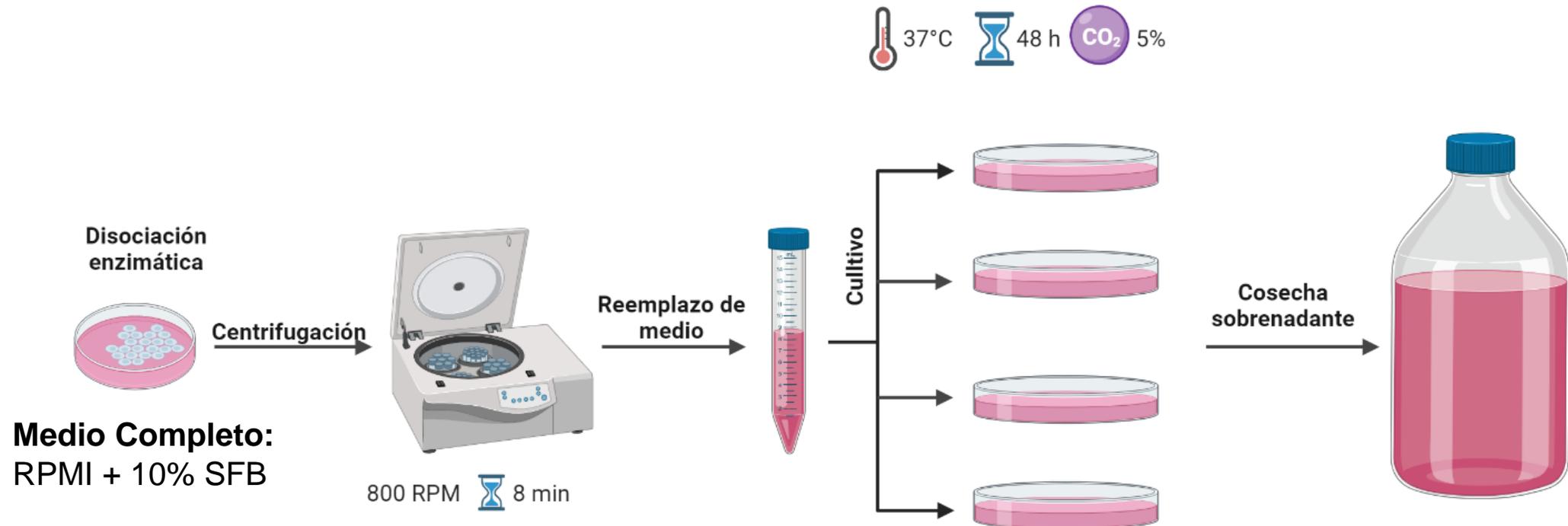
5. Conclusiones y Recomendaciones



Flujo de trabajo



Cultivo en Adherencia de células CHO 1b



Densidad celular inicial: 6×10^4 células/mL
Antibiótico penicilina/estreptomicina: 100 U/mL
Antibiótico Geneticina G418: 1200 µg/mL
L-glutamina: 2 mM

Diseño de tratamientos de adaptación de células CHO 1b a suspensión

Adaptación con reducción del 10% de medio completo

N° Pasaje	Medio Completo: Medio Ex-Cell	Tiempo de cultivo (h)	Volumen Medio Completo (mL)	Volumen Medio Ex-Cell (mL)
0	100:0	48	5	0
1	90:10	48	4,5	0,5
2	80:20	48	4	1
3	70:30	48	3,5	1,5
4	60:40	48	3	2
5	50:50	72	2,5	2,5
6	40:60	72	2	3
7	30:70	72	1,5	3,5
8	20:80	72	1	4
9	10:90	72	0,5	4,5
10	0:100	72	0	5

Tratamiento lento

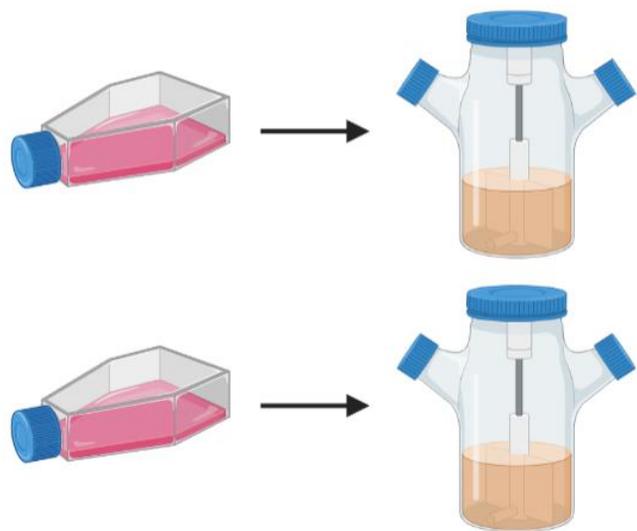
Adaptación con reducción del 20% de medio completo

N° Pasaje	Medio Completo: Medio Ex-Cell	Tiempo de cultivo (h)	Volumen Medio Completo (mL)	Volumen Medio Ex-Cell (mL)
0	100:0	48	5	0
1	80:20	48	4	1
2	60:40	48	3	2
3	40:60	48	2	3
4	20:80	48	1	4
5	0:100	48	0	5

Tratamiento rápido

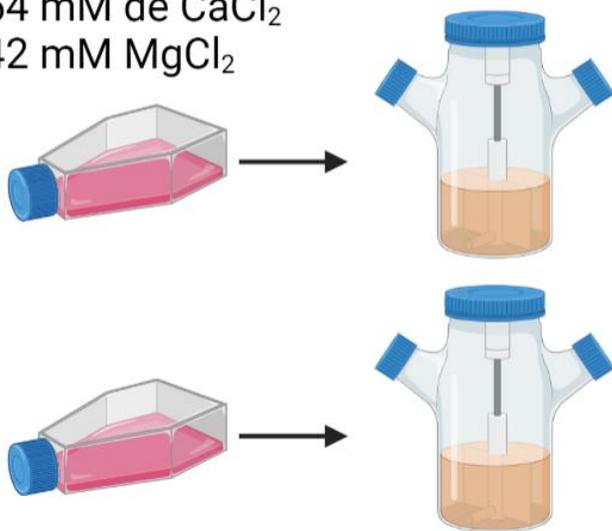
Condiciones de adaptación de células CHO 1b a suspensión

No Suplementado



Suplementado

2,54 mM de CaCl₂
1,42 mM MgCl₂



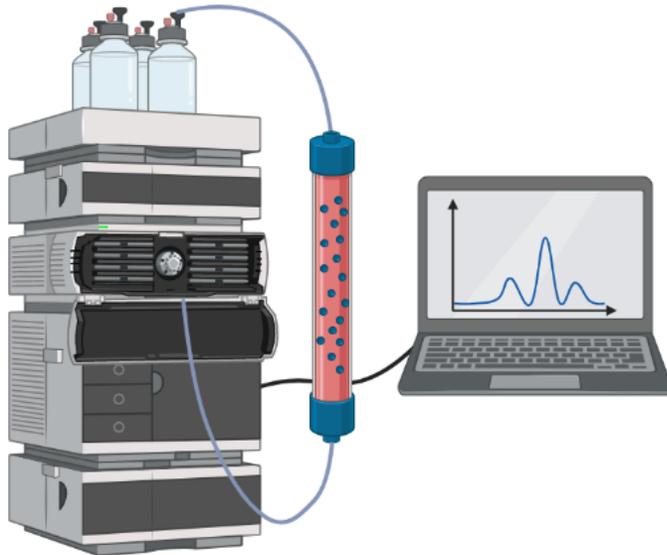
Parámetros de adaptación celular

- 1. Densidad celular > 6x10⁵ cells/mL
- 2. Viabilidad > 90%
- 3. Tiempo de duplicación < 50 h

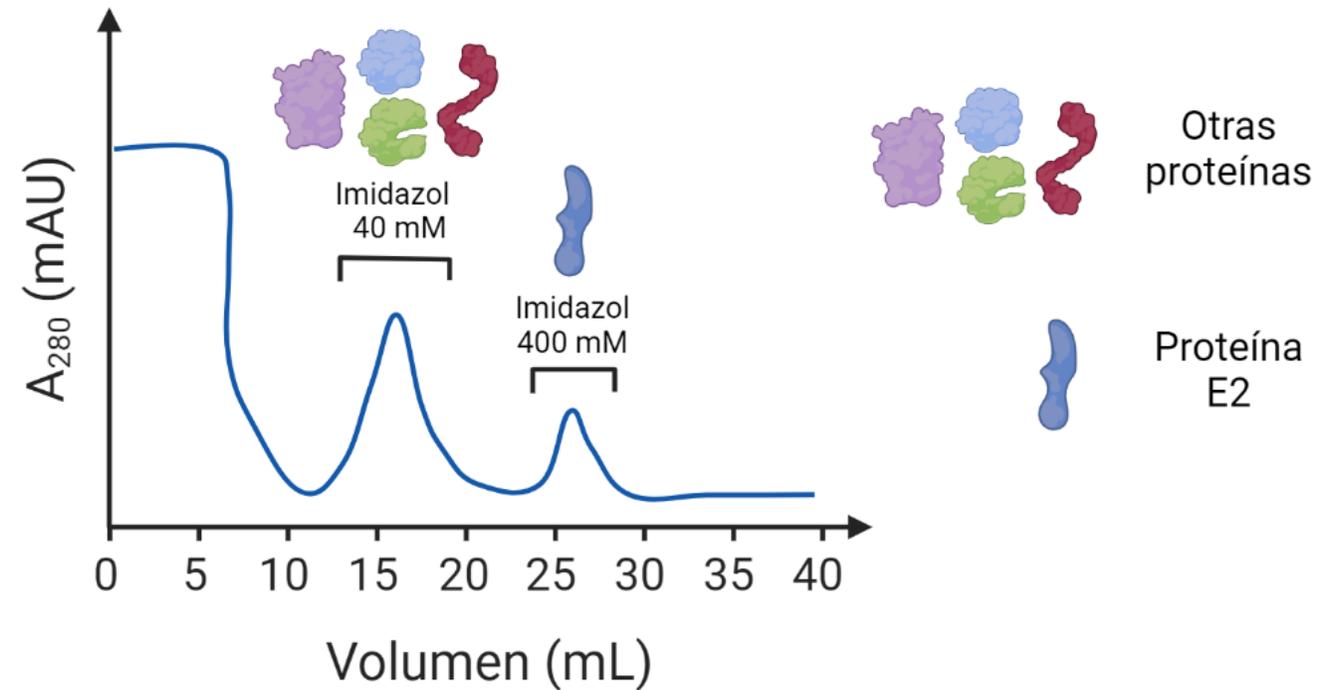
Densidad celular inicial:
Antibiótico penicilina/estreptomicina:
Antibiótico Geneticina G418:
L-glutamina:

6x10⁴ células/mL
100 U/mL
1200 µg/mL
4 mM

Purificación de la proteína



Cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC)



Buffer de Unión:

Buffer de lavado:

Buffer de elución :

Tris HCl 500 mM, NaCl 300 mM y 5mM Imidazol

Buffer de unión + 40 mM Imidazol

Buffer de unión + 400 mM Imidazol

1. Introducción

2. Objetivos

3. Metodología

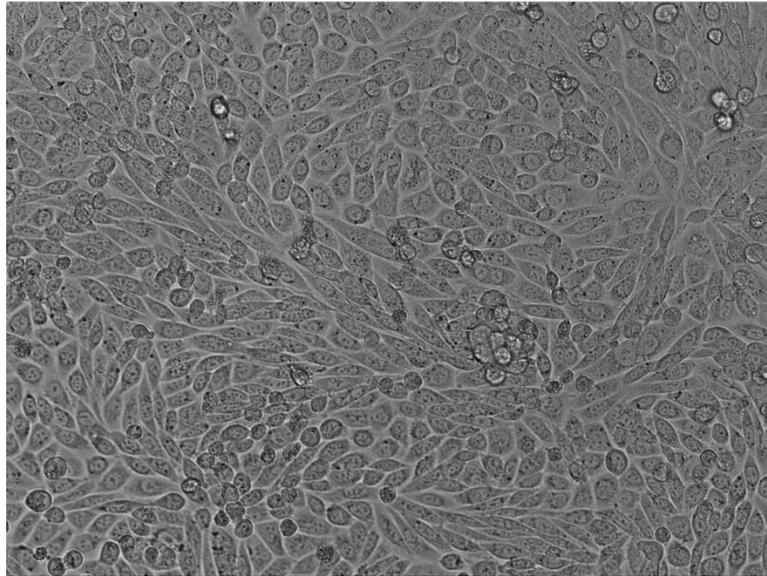
4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones y Recomendaciones

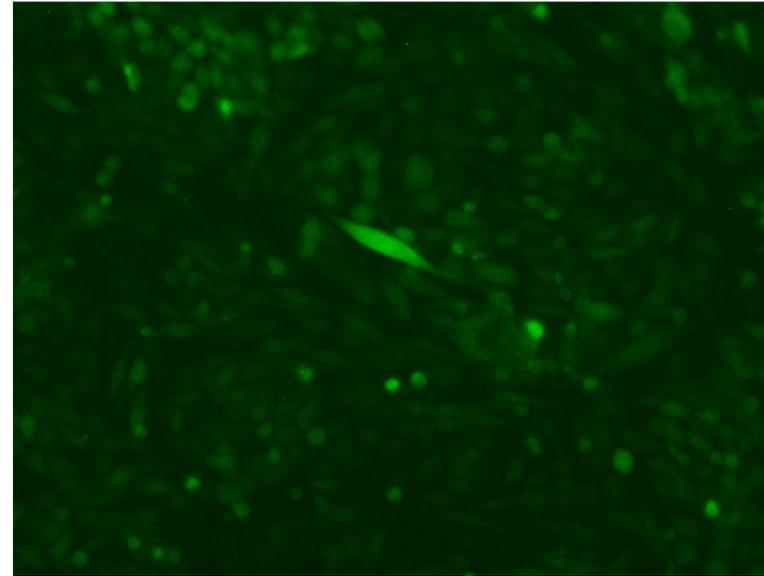


Células CHO productoras de proteína E21b en condiciones adherentes

a)

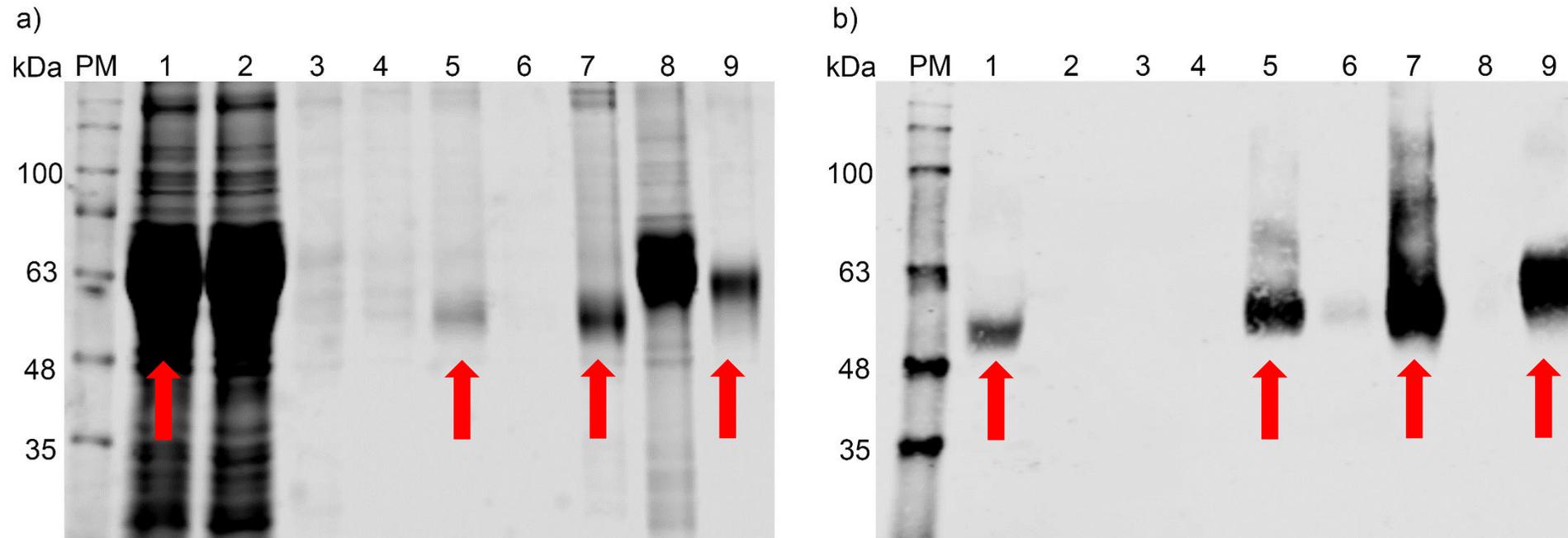


b)



Aumento 100X. a) Células CHO observadas en campo claro b) Células CHO fluorescentes excitadas a 550 nm

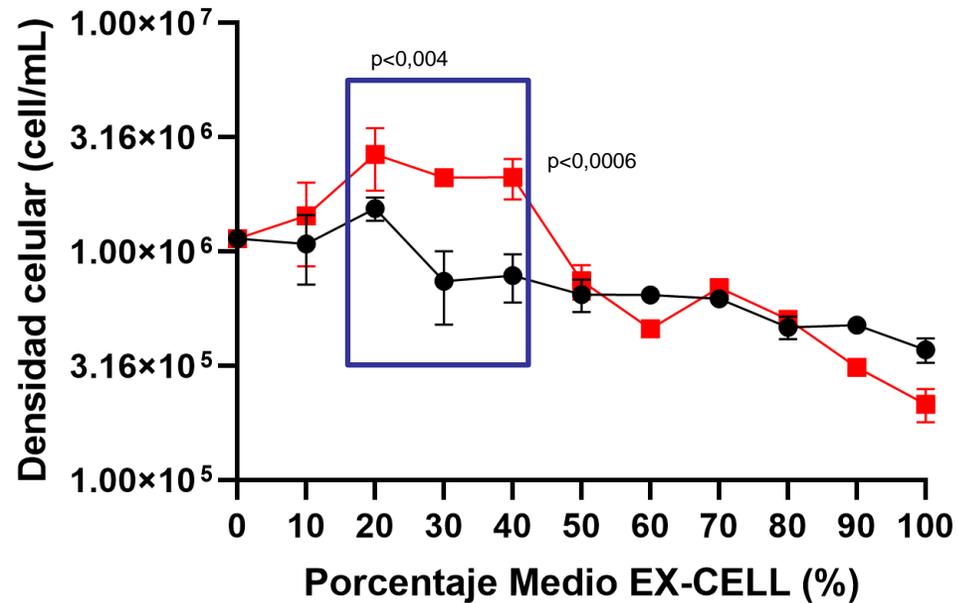
Análisis de E21b producida en condiciones adherentes



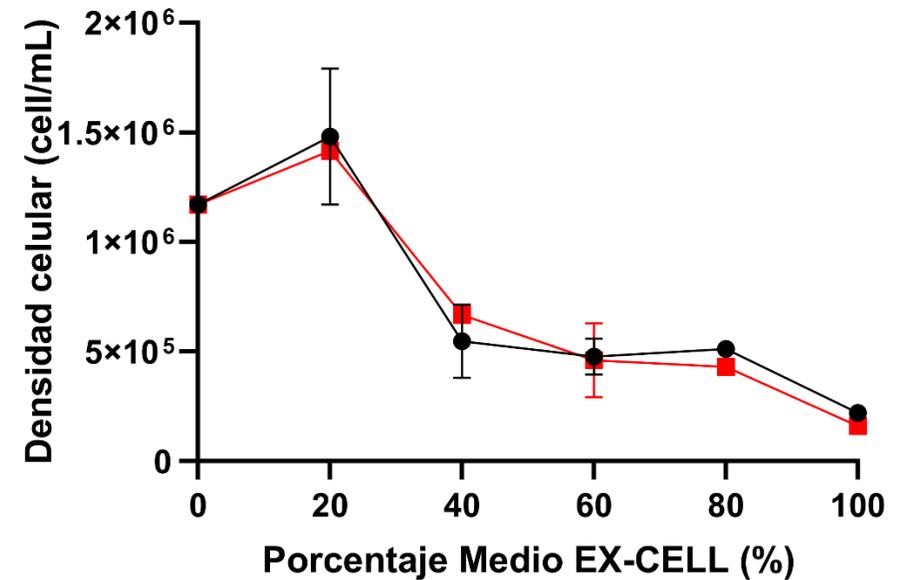
a) SDS-PAGE 12,5% y 1,5 mm. b) Western blot, Ac. Primario: Ac. monoclonal anti-histidina de ratón; Ac. Secundario: Ac. anti-ratón de cabra conjugado a Alexa Fluor® 790. Carriles: PM; Marcador de peso molecular; 1, muestra inicial; 2, muestra no retenida; 3, muestra de lavado (25 mM imidazol); 4, muestra de lavado (40 mM imidazol); 5, muestra de elución (400 Mm imidazol); 6, muestra pass; 7, concentrado de la proteína (3 µg); 8, Control negativo; 9; Control positivo.

Adaptación de células CHO 1b a suspensión

Análisis de densidad celular, tratamiento lento



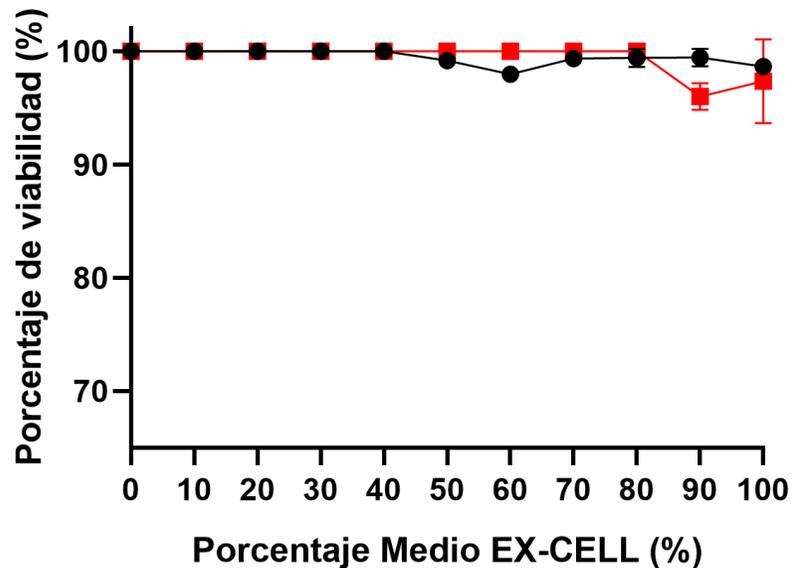
Análisis de densidad celular, tratamiento rápido



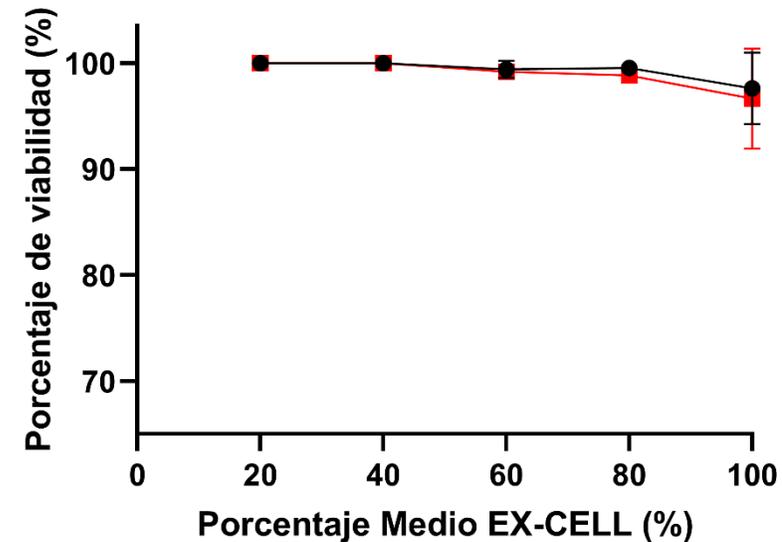
- No Suplementado
- Suplementado

Adaptación de células CHO 1b a suspensión

Análisis de viabilidad, tratamiento lento



Análisis de viabilidad, tratamiento rápido

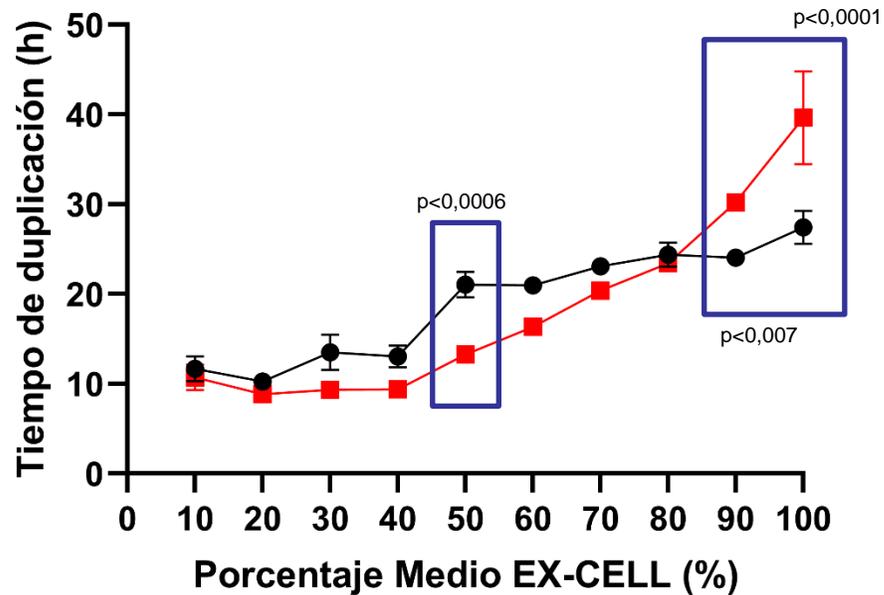


- No Suplementado
- Suplementado

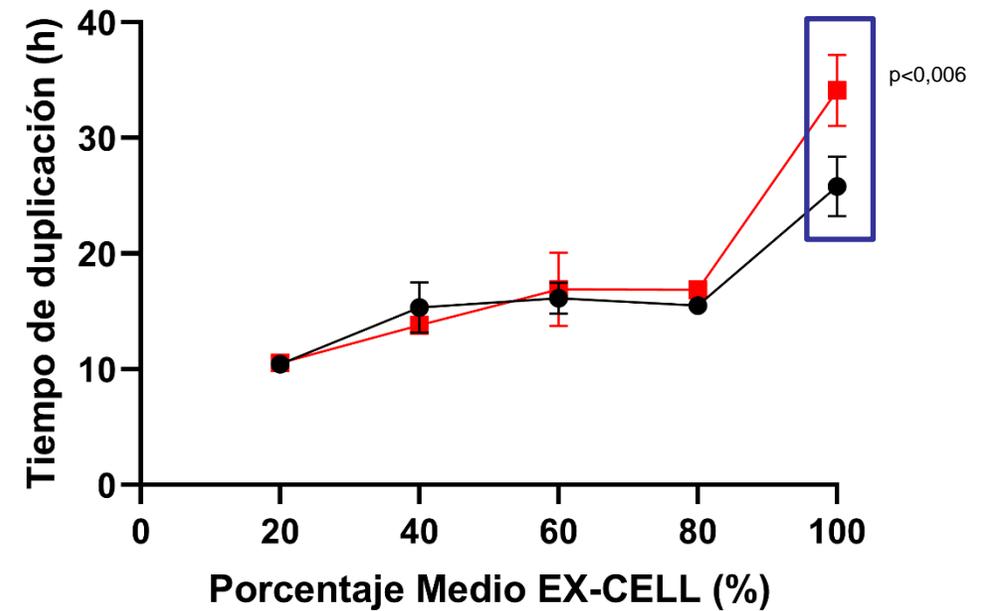


Adaptación de células CHO 1b a suspensión

Análisis de tiempo de duplicación, tratamiento lento

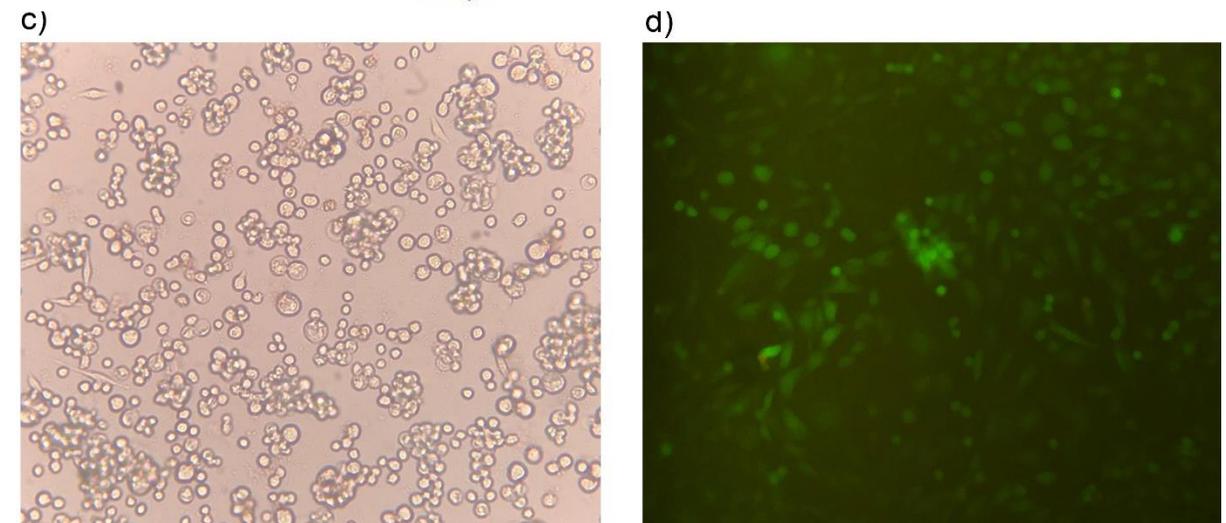
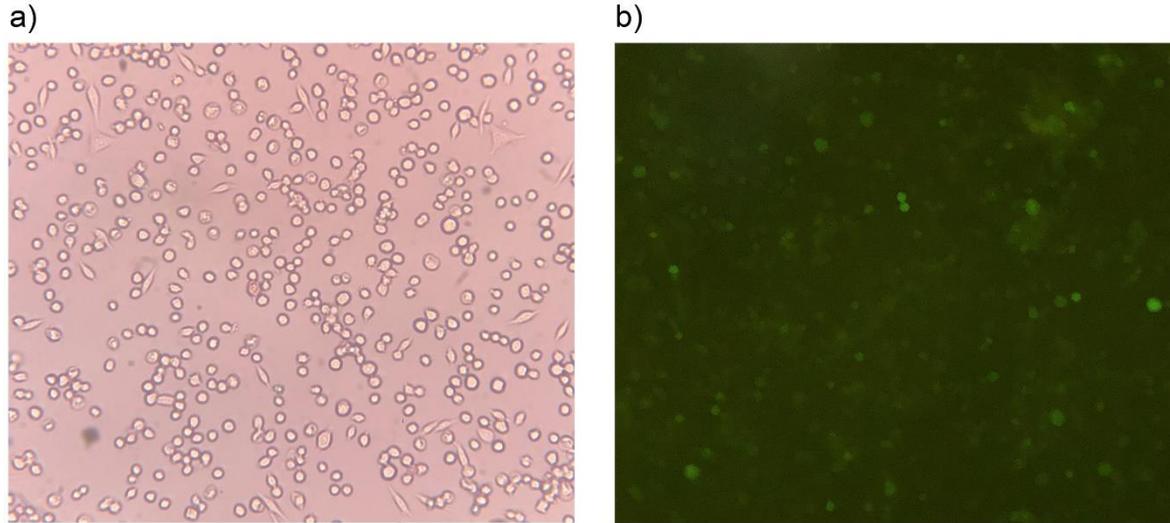
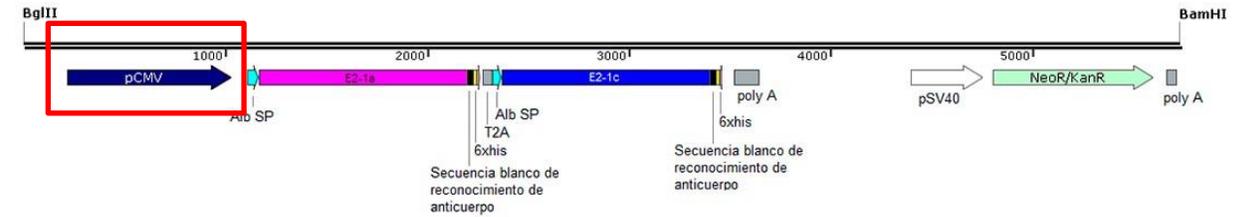


Análisis de tiempo de duplicación, tratamiento rápido



- No Suplementado
- Suplementado

Células CHO 1b adaptadas a suspensión

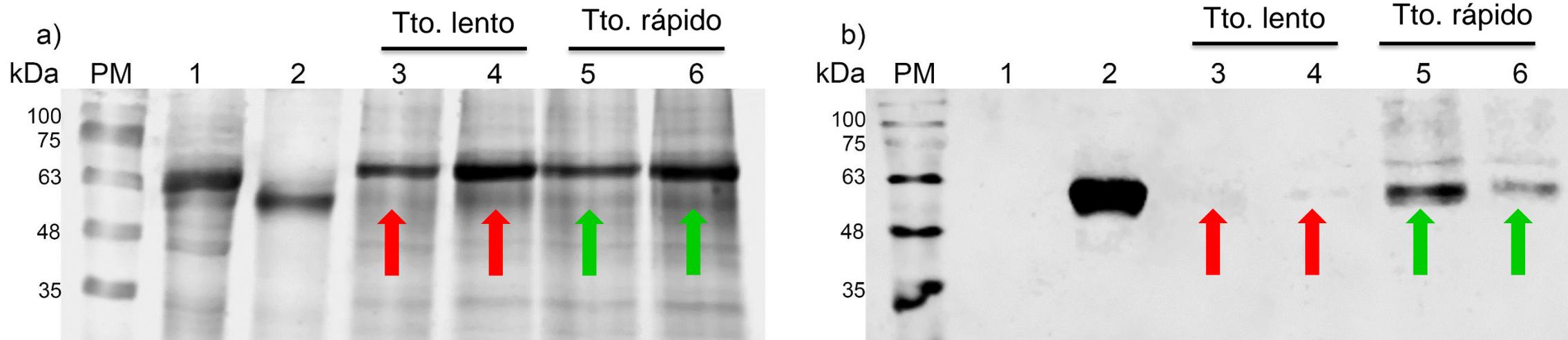


a y c) Células CHO en suspensión observadas en campo claro. b y d) Células CHO en suspensión, fluorescentes excitadas a 550 nm

Reducción del 10% de medio completo

Reducción del 20% de medio completo

Análisis de E21b producida en suspensión



a) SDS-PAGE, 12,5% y 1,5 mm. b) Western blot, Ac. Primario: Ac. monoclonal anti-histidina de ratón; Ac. Secundario: Ac. anti-ratón de cabra conjugado a Alexa Fluor® 790. Carriles: PM, Marcador de peso molecular; 1, Control negativo; 2 Control positivo; 3, tratamiento lento no suplementado; 4, tratamiento lento suplementado; 5, tratamiento rápido no suplementado; 6, tratamiento rápido suplementado.

Expresión de E21b en el cultivo en suspensión

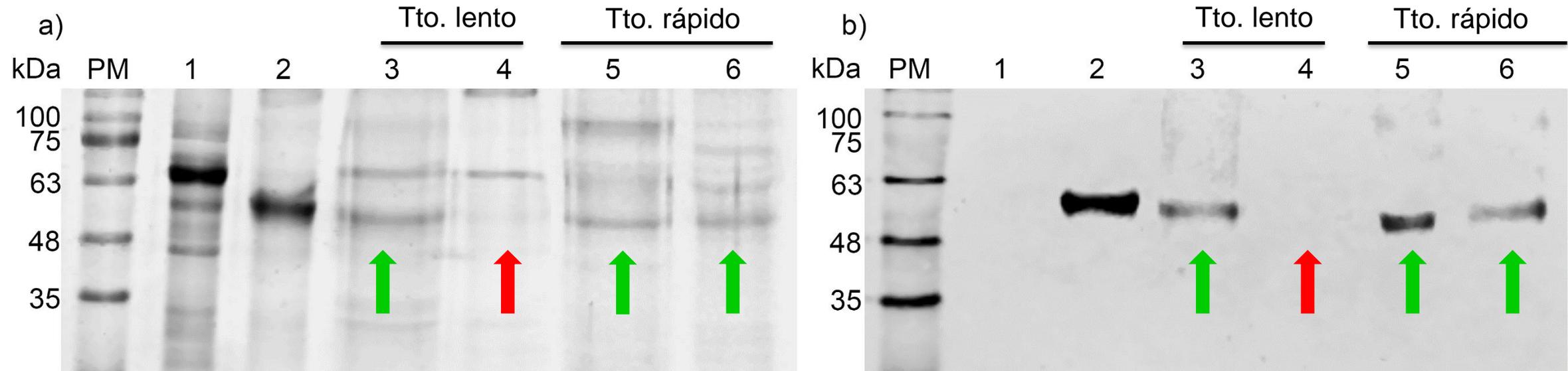
Análisis de pureza y expresión de proteína E21b en el cultivo

Tratamiento	Condición	Volumen inicial (mL)	Volumen concentrado (mL)	Concentración proteínas totales (µg/mL)	Pureza (%)	Concentración E21b concentrado (µg/mL)	Concentración E21b en el cultivo (µg/mL)
Cultivo adherente	Cultivo adherente	900	2,5	690	62,62	432,08	1,22
Reducción del 10% de medio completo	No suplementado	590	2,2	184,54	36,65	67,63	0,25
	Suplementado	450	3	15,54	28,68	4,46	0,03
Reducción del 20% de medio completo	No suplementado	450	4,1	572,88	14,89	85,3	0,78
	Suplementado	500	1,5	398,21	27,26	108,55	0,33

Suspensión < **Pureza** < Adherencia

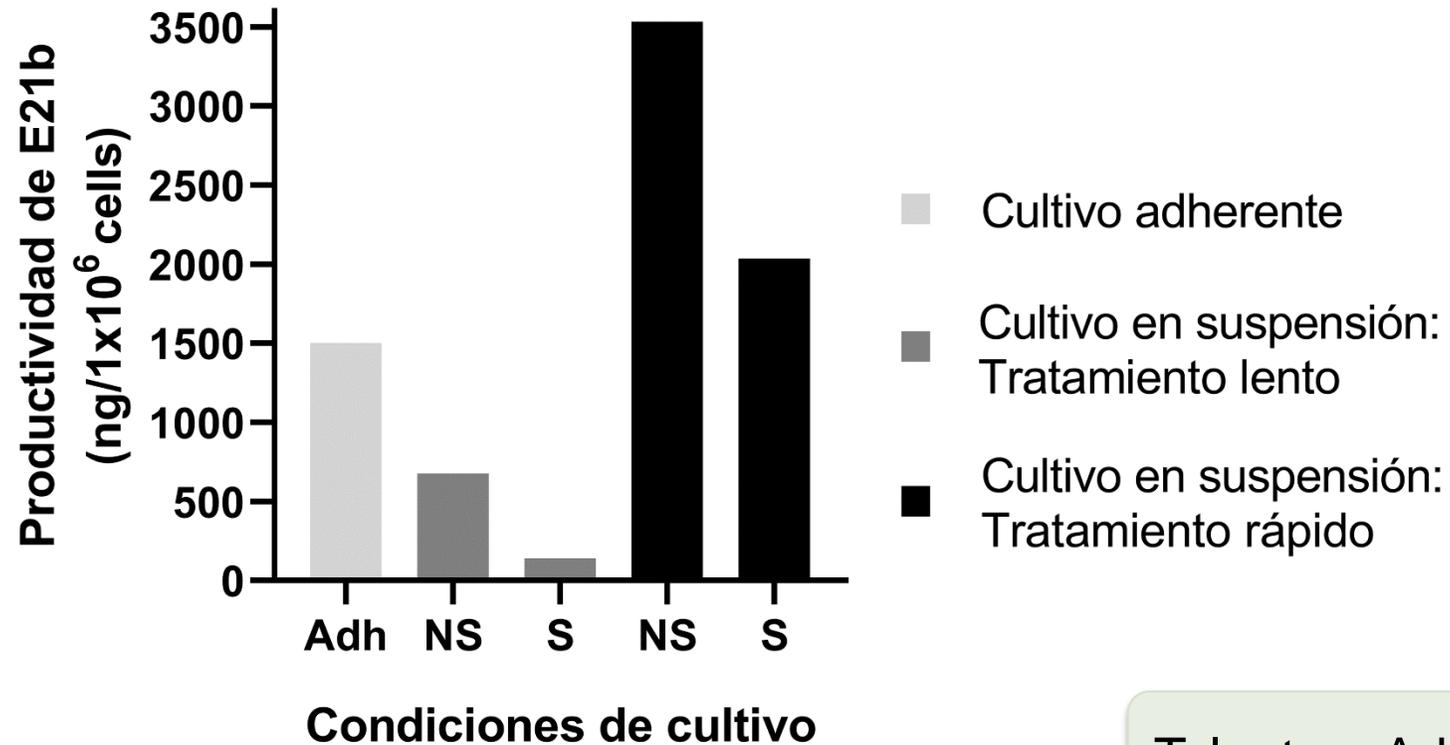
Tto. lento < **E21b en cultivo** < Tto. rápido

Análisis de E21b concentrada, producida en suspensión



a) SDS-PAGE. b) Western Blot. Carriles: PM, Marcador de peso molecular; 1, Control negativo; 2 Control positivo; 3, tratamiento lento no suplementado; 4, tratamiento lento suplementado; 5, tratamiento rápido no suplementado; 6, tratamiento rápido suplementado

Productividad específica de E21b en suspensión



Adh: Cultivo en adherencia; NS: Condición No Suplementada;

S: Condición Suplementada

T. lento < Adherencia < T. rápido

1. Introducción

2. Objetivos

3. Metodología

4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones y Recomendaciones



- El suplemento de iones Ca^{+2} y Mg^{+2} **incrementa parcialmente la densidad celular y disminuye el tiempo de duplicación** durante la adaptación del cultivo a suspensión únicamente en el **tratamiento lento**.
- El **uso de suplemento** en el medio de cultivo libre de suero no **repercute significativamente** en la **expresión de la proteína E21b** producida en células CHO adaptadas a condiciones en suspensión.



- La **productividad específica** de expresión de **proteína E21b** es **mayor** en células adaptadas a **suspensión** con un **tratamiento rápido** en relación al cultivo en **adherencia** y al **tratamiento de adaptación lento**.



- Evaluar concentraciones de **CO₂ superiores a 5%** por la influencia directa en la expresión de proteínas recombinantes producidas por células CHO cultivadas en condiciones en suspensión.
- El esquema de purificación por cromatografía de afinidad a iones metálicos (**IMAC**) puede ser optimizado utilizando **mayores concentraciones de imidazol en el buffer de unión y en la muestra**, en conjunto con **más pasos de elución** que permitan eliminar la mayor cantidad de contaminantes.
- A partir de las células adaptadas a suspensión se recomienda **aumentar el volumen de cultivo** para corroborar la productividad específica de la proteína E21b.





Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos
Universidad de Concepción, Chile

Thelvia Ramos, PhD(c).

Directora

Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Ecuador

Raquel Montesino, PhD.

Directora

Universidad de Concepción, Chile

Verónica Avello, PhD.

Universidad de Concepción, Chile

Familia

Amigas y Amigos

