



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Instituto de Biotecnología

Diseño de un microsistema de cultivo para exponer células de eucariotes superiores a condiciones de estrés típicas de un bioproceso

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA

Q.F.B. David Hidalgo Vázquez

TUTOR PRINCIPAL

**Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera
Instituto de Biotecnología, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

**Dr. José Antonio Serrato Pérez
Instituto de Biotecnología, UNAM**

**Dr. Gabriel Corkidi Blanco
Instituto de Biotecnología, UNAM**

Cuernavaca, Morelos

Abril, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue desarrollado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera. Durante la realización de este trabajo se contó con una beca de maestría otorgada por SEP-CONACYT #####. Investigación realizada gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IT-201214 e IT-200315.

ÍNDICE

Índice de figuras	5
	5
Nomenclatura	
Resumen	7
Introducción	8
Generalidades del sistema células de insecto-baculovirus	
Cultivo de células de insecto y la TOD	
Análisis de células individuales.	
<i>Adquisición de imágenes de células vivas (Live-cell imaging)</i>	
Hipótesis y objetivos	19
Materiales y métodos	20
Cultivo de células de insecto en suspensión	
Cinéticas en placa de 96 pozos para cultivo celular	
Cinética de crecimiento en agarosa de bajo punto de fusión.	
Determinación del coeficiente de difusión de O ₂ en agarosa de bajo punto de fusión	
Cinéticas en microcámara de cultivo.	
<i>Preparación de la microcámara de cultivo</i>	
<i>Preparación de las células para cultivos en medio líquido</i>	
<i>Preparación de las células para cultivos en medio semisólido</i>	
<i>Adquisición de las imágenes</i>	
<i>Procesamiento y análisis de las imágenes</i>	

Plaqueo del baculovirus
Determinación del título viral
Sensor fluorescente de oxígeno disuelto
Ensayos en placas de 24 pozos para determinar el efecto
de la MOI

Diseño de la placa

Adquisición y análisis de imágenes

Resultados y Discusión.....	28
Conclusiones.....	65
Perspectivas.....	66
Referencias.....	66
Anexos.....	71

Índice de figuras

Ciclo replicativo de baculovirus.....	XX
Figura 1. Cinética de crecimiento en matraz de células de insecto Sf+ en medio Ex Cell 420. Xt-células totales por mL; Xv-células viables.....	XX

Nomenclatura y abreviaciones

ACI	Análisis de células individuales
AcMNPV	Virus de la poliedrosis múltiple de <i>Autographa californica</i>
bacEGFP-VP3/RFP-VP39	Baculovirus que porta los genes EGFP-VP3 y RFP-VP39
BV-CI	Sistema Baculovirus-Células de insecto
CC	Campo claro
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGFP-VP3	EGFP fusionada a la proteína VP3 de virus adenoasociado
h	hora
hpi	Horas post-infección
kpb	Kilopares de bases
MDI	Multiplicidad de infección
min	minuto
OD	Oxígeno disuelto
PPV	Partículas pseudo-virales
RICS	<i>Raster Image Correlation Spectroscopy</i>
RFP	Red fluorescent protein.
RFP-VP39	3 RFPs fusionadas a la proteína VP39 de baculovirus
Sf9	Línea celular de <i>Spodoptera frugiperda</i>
Sf+	Línea celular de <i>Spodoptera frugiperda</i>
t	Tiempo
TOD	Tensión de oxígeno disuelto
ufp	Unidades formadoras de placa

URF	Unidades relativas de fluorescencia
X_m	Células muertas
X_t	Células totales
X_v	Células vivas
V	Viabilidad
VAA	Virus adenoasociado
VP3	Proteína de la cápside de Virus adenoasociado
VP39	Proteína de cápside de Baculovirus
μ	Velocidad específica de crecimiento

Resumen

El objetivo de este trabajo fue diseñar e implementar un sistema de cultivo para caracterizar cultivos de células de eucariotes superiores en diferentes condiciones, específicamente, cultivos de células de insecto sin infectar e infectadas con un baculovirus (BV) recombinante a diferentes tensiones de oxígeno disuelto (TOD), con el cual fuera posible analizar células individuales y generar valores promedio sin perder la información asociada a la variabilidad biológica asociada a la población. Las poblaciones celulares de cualquier tipo presentan diferencias interindividuales. Estas diferencias, dependiendo de su naturaleza, pueden tener un gran impacto sobre el comportamiento y la fisiología de cada célula o bien, pueden limitarse a estar presentes sin tener una función biológica significativa. Tradicionalmente los cultivos celulares han sido caracterizados a través de mediciones que representan el valor promedio de una población, enmascarando comportamientos o fenómenos particulares de subpoblaciones celulares que pudieran resultar de interés. El sistema propuesto comprende 3 enfoques: cultivos en placas multipozo con diferentes condiciones iniciales de cultivo, cultivos en placas multipozo con medio de cultivo semisólido y *live-cell imaging*. Este último el que permitió lograr los objetivos del trabajo. Las series de imágenes digitales obtenidas a lo largo del cultivo poseen gran resolución temporal y mostraron fenómenos dinámicos y comportamientos previamente no documentados para la línea celular estudiada (Sf9), como la migración de células con fenotipo fibroblastoide. Una vez estandarizada la metodología para llevar a cabo los cultivos, se determinaron parámetros como cantidad inicial mínima de células (5.0×10^4 células/cm²), debajo de la cual las células mueren y por encima de esta, se satura el campo visual, configuración óptica (magnificación de 10x en campo claro en lugar de 40x con contraste de fases) y medio de cultivo (líquido en lugar de semisólido).

Finalmente, se estudió el comportamiento de cultivos infectados (1.0 ufp/célula) y no infectados a diferentes TOD (100%, 50% y 0%). En el cultivo no infectado a 0%, no se observó crecimiento celular, sin embargo se observó un aumento en la proporción de células migrando. Probablemente, esta sea una respuesta celular al estrés causado por limitación de oxígeno. En los cultivos infectados no se observó crecimiento, sin embargo, la cantidad de células infectadas, determinadas por la expresión de un gen reportero, disminuyó conforme la TOD, pudiéndose evidenciar otro de los efectos de la limitación por O₂ disuelto. Por último, prácticamente ninguna célula con fenotipo fibroblastoide presentó fluorescencia relacionada con la infección del baculovirus, sugiriendo que no eran susceptibles a la infección. Así el sistema mostró fenómenos que pudieran estudiarse en el futuro y puede utilizarse para otras líneas celulares de interés. Abre además la posibilidad de identificar atributos únicos de poblaciones celulares específicas que pueden ser aprovechados para aplicaciones particulares.

Introducción

Existe un gran interés en el cultivo de células de eucariotes superiores a escala industrial, ya que con ellas se producen proteínas recombinantes, anticuerpos, vacunas, metabolitos secundarios y bioinsecticidas (Lara et al., 2006). Las ventajas del uso de células eucariotes con respecto a las procariotas a nivel industrial son variadas. Entre otras, está su capacidad de secreción del producto de interés al medio de cultivo en forma activa, facilitando su purificación y disminuyendo los costos de este proceso. Además, estas células son capaces de realizar modificaciones postraduccionales, característica que no ocurre en células procariotes y que muchas veces es crucial como estándar de calidad y necesario para su actividad biológica, en el caso de fármacos biotecnológicos.

Una de las plataformas más versátiles y empleadas para la producción de proteínas recombinantes con diversas aplicaciones es el sistema de células de insecto-baculovirus. Este sistema se usa para producir proteínas que requieren modificaciones post-traduccionales múltiples, como son la oligomerización, fosforilación, glicosilación, acilación, formación de puentes disulfuro y procesamiento proteolítico.

Adicionalmente, en esta plataforma se han podido producir simultáneamente con calidad y en buenas cantidades, múltiples proteínas recombinantes en una sola infección viral, obteniendo así proteínas multiméricas que son funcionalmente similares a sus análogos naturales. Es por ello que este sistema se ha utilizado para construir partículas parecidas a virus (PPV), para desarrollar vacunas basadas en este tipo de estructuras y para la síntesis de nanobiomateriales (Fuxiao Liu, 2013).

Para obtener rendimientos más altos y calidad en estos productos, las células utilizadas deben cultivarse en condiciones óptimas (Gastélum, 2009). Entre las condiciones ambientales importantes en el cultivo de células, la tensión de oxígeno disuelto es un parámetro crítico. El oxígeno molecular, debido a su estructura química, difunde pobremente en medios acuosos. Esta molécula es esencial para la vida celular de organismos aerobios. Su déficit ocasiona cambios en el metabolismo y la fisiología de las células, por ejemplo, alterando la actividad de las enzimas glicolíticas, la vía de las pentosas fosfato, el ciclo de Krebs y el metabolismo de la glutamina. Consecuentemente, la producción de los productos de interés puede verse alterada, tanto cuantitativamente como cualitativamente (Hägstrom et al., 2000). La limitación de oxígeno puede aumentar cuando

incrementa la VCO de las células. Por ejemplo, la infección viral puede resultar en la duplicación de la VCO, incrementando aún más los problemas de limitación de oxígeno.

Hasta ahora, el efecto de esta y otras variables ambientales se ha evaluado a nivel poblacional. Los valores obtenidos en cada medición corresponden al promedio de la respuesta celular ante cada una de las variables del cultivo (Kerry et al., 2013). Por lo tanto, se desconoce la respuesta celular individual ante un estímulo al que fue sometida la población (Lew et al., 2011). El conocer cómo responden las células a nivel individual, es decir, la distribución de la respuesta, resultará en un mayor entendimiento del efecto de las variables ambientales sobre ellas. Tal entendimiento puede ser utilizado para diseñar células más robustas respecto a las condiciones ambientales, así como para diseñar sistemas de cultivo más adecuados. Esta información es de gran importancia para el diseño y el desarrollo de fármacos biotecnológicos, ya que tiene un impacto directo sobre los costos de fabricación y la optimización de procesos en cuanto a tiempo y escala (Kerry et al., 2013). La importancia de cuantificar respuestas celulares individuales ha sido reconocida por otros grupos de investigación. Por ejemplo, se han diseñado sistemas que permiten realizar análisis transcripcionales a células únicas, con el fin de interrogarlas de forma individual (Whitea et al., 2011), el análisis de las respuestas antígeno-específicas de células T (Varadarajan et al., 2012), análisis de proliferación de células madre hematopoyéticas en arreglos de microfluidos (Lecault et al., 2011), screening y selección de cepas de *Pichia pastoris* con producción aumentada de proteína (Panagiotou et al., 2011), entre otros.

Un sistema para evaluar la respuesta celular individual hacia variables ambientales debe cumplir con varias características. Por ejemplo, debe ser posible reproducir, a microescala, las condiciones ambientales de un cultivo celular. Esto se puede lograr mediante el uso de cámaras de cultivo con entradas controladas de gases y temperatura regulada, sin someter a las células a esfuerzos de corte altos. Tal sistema debe recrear varias condiciones fisicoquímicas, por ejemplo, las de estrés por deficiencia de oxígeno.

El uso de un microscopio simple, por ejemplo, uno de epifluorescencia es suficiente para observar respuestas celulares individuales. Actualmente existen detectores y software acoplados para el registro de imágenes que son útiles para realizar el análisis y el monitoreo de un gran número de células y con los cuales es posible medir desde parámetros simples como el tamaño y la morfología hasta observar, registrar y dar seguimiento de sucesos dinámicos con duración del orden de segundos, minutos o días (videomicroscopía), tales como la migración celular, diferenciación, infección viral, lisis y la interacción entre células.

Adicionalmente, las diferentes técnicas de iluminación para observar células vivas, las diferentes maneras de excitar fluoróforos diferencialmente y la forma en que se adquieren y procesan imágenes computacionalmente han permitido lograr una resolución espacial de escala nanométrica para estructuras y fenómenos celulares, con la ventaja de que la instrumentación requerida es cada vez más simple y accesible, siendo posible realizar el análisis de células individuales prácticamente en cualquier computadora. La mayoría de los recursos informáticos necesarios son de libre acceso y han sido desarrollados para estudiar procesos celulares específicos, haciendo su estudio accesible con resultados sumamente informativos (Hell, 2009).

Para estudiar y analizar estos eventos a nivel celular en células vivas y durante periodos largos de tiempo, se pueden utilizar fluoróforos cuyo espectro de emisión y los cambios que puedan ocurrir en las propiedades del mismo, sean dependientes y específicos para las condiciones ambientales que se desean estudiar y que la intensidad de fluorescencia sea detectable a las condiciones de trabajo. El uso de proteínas fluorescentes ofrece no solo estas características, sino que además, al ser codificadas genéticamente, se puede dirigir su expresión hacia sitios específicos de la célula donde se sepa que ocurren los eventos a analizar y se puede asociar su expresión a genes de interés (marcador genético), representando una manera no invasiva para poder observar y estudiar células vivas (Chudakov, 2010).

El conocimiento del comportamiento de las células a nivel individual ante diferentes condiciones ambientales de estrés es de gran interés, por lo que el uso de un microsistema donde se reproduzcan y controlen estas condiciones para la observación de sus efectos en células de eucariotes superiores brindará información valiosa que permitirá resolver problemas de escalamiento; contribuirá al conocimiento del metabolismo y de la dinámica celular bajo condiciones de estrés de oxígeno, y, consecuentemente ayudará en el diseño de células para fines de producción de biomoléculas con diferentes aplicaciones, como son la fabricación de medicamentos biotecnológicos, el desarrollo de vacunas a partir de PPV y la producción de nanobiomateriales.

Generalidades del sistema células de insecto-baculovirus

Los baculovirus son un diverso grupo de virus de DNA capaces de infectar a más de 600 especies de insectos, de los cuales el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) es el más caracterizado y el más ampliamente utilizado. Este

baculovirus contiene un genoma de DNA de doble cadena de alrededor de 134kpb (Chi-Yuan, 2011), tiene forma de bastón y mide alrededor de 40-50 nm de diámetro por 200-400nm de largo.

Los baculovirus pueden encontrarse embebidos en una matriz de una proteína llamada poliedrina o como virus gemados (virus envueltos por una cubierta lipídica). En la naturaleza es típico que los baculovirus se encuentren ocluidos en esta matriz de poliedrina ya que así son protegidos del medio ambiente, mientras que en el laboratorio es común utilizar virus gemados donde la protección de la poliedrina no es necesaria y cuyo gen ha sido sustituido por otro de interés, es decir, el transgen.

El ciclo replicativo típico de baculovirus en la naturaleza está dividido en dos etapas, las cuales describen la infección inicial de las células del intestino medio de la larva del insecto y la subsecuente infección de tejidos secundarios, respectivamente (Figura 1).

Cuando una larva ingiere la matriz de poliedrina conteniendo los baculovirus (infección primaria), ésta se disuelve en el lumen del intestino medio para liberar los viriones, los cuales cruzan la membrana peritrófica y acceden a las células de las columnares. Estos virus envueltos se fusionan con las membranas de las microvellosidades, liberando las nucleocápsides al citoplasma para su entrada al núcleo. En infecciones secundarias, los virus gemados en la hemolinfa de las larvas o en el medio de cultivo, se anclan a receptores celulares no identificados y entran por endocitosis. Mientras el endosoma se acidifica, su membrana y la cubierta lipídica viral se fusionan para liberar nucleocápsides al citoplasma. Dichas nucleocápsides son transportadas al núcleo, donde interactúan con el poro nuclear. El genoma viral es entonces liberado y la etapa temprana de transcripción y expresión de genes comienza. Una vez que los productos de genes tempranos aparecen, el DNA viral es sintetizado en asociación con el recién formado estroma virogénico. La expresión tardía de genes ocurre después de la replicación del DNA y produce componentes estructurales de la nucleocápside, los cuales entonces empaquetan el recién sintetizado DNA genómico viral. Durante esta fase tardía, nucleocápsides recién formadas salen del núcleo, migran a la membrana plasmática, se asocian con una proteína de fusión a cubierta lipídica viral y salen de la célula por gemación. En contraste, durante la fase muy tardía, las nucleocápsides son retenidas en el núcleo, adquieren una cubierta derivada de éste y son embebidos por una matriz de poliedrina para formar cuerpos de oclusión. Los virus ocluidos son liberados por lisis celular mediada por virus (Fields Virology, quinta edición, 2007).

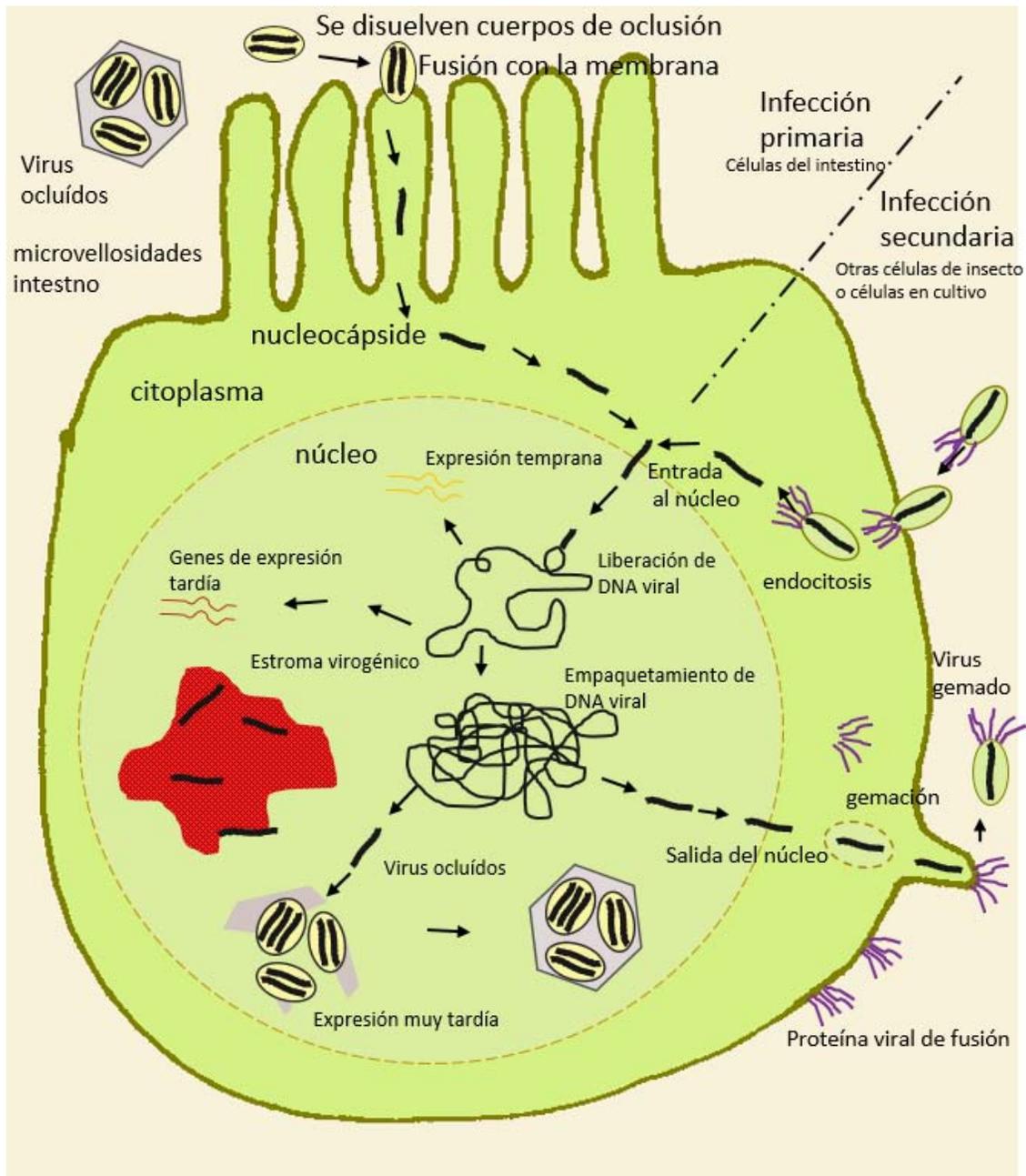


Figura 1. Ciclo replicativo de baculovirus. Fields Virology, Knipe 2013, pp 2332

Los promotores *polh* y *p10* del genoma de baculovirus poseen gran fuerza y por ende los productos de los genes que están bajo su control son sintetizados en gran cantidad por el hospedero. Como dichos productos son dispensables para la replicación de baculovirus, se han construido y utilizado a nivel laboratorio e industrial baculovirus recombinantes,

reemplazando la secuencia de los genes bajo su control por la secuencia de genes de interés.

Cultivo de células de insecto y la TOD

El sistema BV-CI ha sido ampliamente utilizado para la producción de proteínas recombinantes donde es necesaria una maquinaria eucariote de expresión. Para mantener el rendimiento máximo de proteína es necesaria una alta concentración celular con viabilidad óptima (Palomares, 1996). Para tal fin, se deben mantener las condiciones adecuadas de cultivo.

En los cultivos de células animales, la TOD se ha identificado como un parámetro crítico, ya que está estrechamente relacionado con la fisiología celular. El oxígeno molecular (O_2) es esencial en el metabolismo de las células debido a que funciona como el aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones localizada en la mitocondria (Saarinen, 2002). Existen algunos estudios donde se evalúa el efecto de una TOD continua en cultivos infectados y no infectados de células de insecto, específicamente, de la línea celular Sf9.

Palomares y Ramírez en 1996 realizaron cultivos en lote no infectados con una TOD de 0 a 30% en biorreactores. En este trabajo encontraron que los cultivos sometidos a una TOD de 5% y mayor no presentan diferencias en sus perfiles cinéticos, alcanzando prácticamente la misma concentración celular viable alrededor de las 144 h. Sin embargo, cultivos a una TOD de 2% alcanzaron una mayor concentración celular viable alrededor de las 264 h; mientras que un cultivo a una TOD 0% no presentó crecimiento, además de que la concentración celular declinó lentamente a medida que el tiempo avanzaba. Los metabolitos medidos en este estudio no ofrecieron una explicación para este tipo de comportamiento, sin embargo, la cantidad de lactato producido aumentó significativamente a cultivos con menor TOD y solo fue consumido después de que la glucosa y la fructosa se agotaron.

Reuveny et al. en 1992 evaluaron el efecto de la saturación de oxígeno y de la temperatura en la producción de proteínas recombinantes en células Sf9 infectadas con baculovirus recombinantes (MDI de 1.0 a 3.0 ufp/célula). En ese trabajo se observó que la velocidad de consumo de oxígeno aumentó durante la infección viral hasta casi el doble, además, la cantidad de lactato producido en un cultivo a una TOD de 15% aumentó con respecto a un

cultivo a 50%. La cantidad de proteína recombinante producida fue solo del 70% de la producida en exceso de oxígeno en cultivos en matraces agitados.

Por otro lado, Gotoh et al. en 2002 reportaron un incremento significativo en la producción de proteína recombinante en cultivos infectados de células de insecto (Sf9) a bajas MDI (0.1 ufp/célula) bajo condiciones de baja TOD. En este trabajo, encontraron que la mayor cantidad de proteína recombinante (beta galactosidasa) producida fue a una TOD de 5%. En cuanto al crecimiento celular, los cultivos infectados a TOD 15% y 45% presentaron casi la misma concentración celular, sin embargo, el cultivo a una TOD de 5% tuvo alrededor de 0.6 veces mayor concentración celular. En cuanto a la producción de lactato, no se observó un aumento durante los primeros 4 días post-infección, indicando que las células no estaban limitadas de oxígeno incluso a una TOD de 5%, sin embargo, después de este día, la concentración de lactato se incrementó en el cultivo a 5%.

La información obtenida en este tipo de trabajos típicamente se refiere a datos que corresponden a un promedio de la población a estudiar. Hay reportes donde se menciona que la heterogeneidad celular puede jugar un importante papel en el desempeño celular en un bioproceso (Fritsch, 2012), por lo que estudios donde se evalúe la distribución de una respuesta son de interés ya que pudieran ofrecer datos que pueden quedar ocultos al solamente promediar en las mediciones realizadas.

Análisis de células individuales

El análisis de células individuales se ha reconocido en los últimos años como la tecnología clave para elucidar funciones celulares que no son accesibles mediante mediciones que corresponden a poblaciones completas (Fritsch, 2012).

Los ensayos donde se promedia el comportamiento de una población son útiles en biología, permitiendo la identificación de componentes o interacciones dentro de redes metabólicas o de señalización complejas. Dichas mediciones pueden capturar el estado de una población y cómo éste cambia debido a ciertas perturbaciones, es decir, reflejan el mecanismo biológico dominante operando en las células de una población. Esta información puede resultar simplista, sin embargo, capturar toda la variación intercelular también puede ser innecesario. Para realizar modelos de comportamientos celulares individuales es necesario identificar cuáles diferencias son importantes y cuáles pueden ignorarse (Altschuler, 2010). Por ejemplo, se sabe que los genes constitutivos pueden

presentar cierta variación en sus niveles de expresión pero son comúnmente utilizados como referencia en ensayos, asumiendo que esta pequeña variación no es de importancia.

Sin embargo, pueden existir subpoblaciones pequeñas pero importantes que pueden esconderse detrás del promedio del comportamiento general. Por ejemplo, la variabilidad en células hematopoyéticas, la reactivación rápida de ciertas subpoblaciones durante lesiones, tienen un rol crucial en el restablecimiento de la homeostasis (Wilson et al., 2008). En cáncer, hay subpoblaciones celulares que contribuyen de manera diferente a la progresión de la enfermedad o a la respuesta a una intervención terapéutica. Esta heterogeneidad hace complicado elaborar modelos clínicos, particularmente aquellos basados en mediciones que promedian el comportamiento poblacional para guiar el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad (Campbell y Polyak, 2007).

Existen varios dispositivos para el estudio de células individuales (Fritsch, 2012). Probablemente el más utilizado sea el citómetro de flujo, en el cual una población es analizada prácticamente célula por célula para extraer información, la cual está limitada por el tipo y la calidad de los marcadores utilizados. Existen también estudios donde se hacen relieves sobre superficies para generar micropozos donde idealmente pueda contenerse a una sola célula y así poder estudiarlas dependiendo de los marcadores que se les coloquen (Love, 2013). También se han elaborado dispositivos de microfluidos donde puede manipularse una célula para exponerla a diferentes agentes químicos o fármacos y evaluar su respuesta. Cada metodología es particularmente útil dependiendo del ensayo que se pueda realizar y del tipo de información que se quiera obtener. Las mayores diferencias entre cada metodología y dispositivo son su invasividad, es decir, si las células deben ser sacadas de donde se estén cultivando para realizarles el ensayo, su resolución temporal, que es la capacidad de seguir a la misma célula o población a lo largo del tiempo y la capacidad de analizar un número determinado de células.

De los equipos más comúnmente empleados para analizar células individuales de manera rutinaria y sencilla, están los microscopios ópticos. Actualmente, un microscopio común de laboratorio cuenta con los aditamentos necesarios para adquirir imágenes de manera sencilla, ya sean de fluorescencia o de luz visible. Además, existen dispositivos para poder estudiar células de manera no invasiva mediante el uso de cámaras de cultivo, con las cuales es posible observar células por periodos prolongados de tiempo y así estudiar comportamientos celulares en poblaciones de diferentes tipos de células. Esto, aunado a la

gama de marcadores fluorescentes genéticamente codificados, permite un estudio más detallado, profundo y no invasivo de ciertos fenómenos celulares (Hell, 2009).

Adquisición de imágenes de células vivas

La adquisición de imágenes de células vivas es una técnica que ha ganado popularidad en los últimos años (Landecker, 2009). El interés en este tipo de metodologías radica en que ofrece una visión fundamental de funciones celulares y de tejidos, especialmente debido a los avances que ha habido en la tecnología de fluoróforos sintéticos y proteínas fluorescentes.

Los primeros aparatos de microcinematografía estuvieron comercialmente disponibles desde 1914 en Europa. Los estudios de lapso de tiempo (time-lapse) se han utilizado para estudiar el comportamiento celular *in vitro* desde entonces (Lewis, 1932). Este tipo de prácticas tuvieron mayor auge al inventarse la microscopía de contraste de fases, en donde fue posible observar con mayor detalle fenómenos intracelulares que involucraban organelos. Sin embargo, una gran crítica a los estudios de visualización de dinámica celular era la inexactitud que presentaba debido a su naturaleza cualitativa. Peter Medawar, premio Nobel de medicina en 1960, mencionó que la belleza de las células filmadas había distraído y abrumado a los científicos, distrayéndolos de la oportunidad de resolver y contestar preguntas importantes por medio de métodos citológicos. En esa época, la histología ofrecía mucha más información en biología debido a la gran cantidad de colorantes y al desarrollo de métodos para teñir selectivamente estructuras subcelulares y microorganismos importantes para la salud y la tecnología. En contraste, a pesar de que los métodos citológicos se llegaron a convertir en un estándar para obtener información celular, hubo argumentos señalando que una representación estática de una estructura o proceso biológico que fundamentalmente es dinámico era inadecuada y engañosa, como es el caso de la estructura de la cromatina en los diferentes estadios del proceso mitótico (Landecker, 2009).

Actualmente existen detectores y software acoplados a microscopios ópticos en laboratorios que se ocupan para el registro de imágenes que son útiles para realizar el análisis y el monitoreo de un gran número de células y con los cuales es posible medir desde parámetros simples tales como el tamaño y la morfología hasta observar, registrar y dar seguimiento a sucesos dinámicos con duración del orden de segundos, minutos o días

(videomicroscopía), como pueden ser la migración celular, diferenciación, infección viral, lisis y la interacción entre células (MicroscopyU, Nikon). Los sistemas de cámaras digitales incorporan un detector CCD (acoplado a carga) y son actualmente los más comunes para la adquisición de imágenes en la microscopía moderna. Hasta hace algunos años, las cámaras de película fotográfica eran usadas para obtener imágenes de microscopía. Este método tradicional dependía de la sensibilidad a la luz de películas con plata, involucraba almacenamiento temporal de la película fotográfica y la imagen solo era visible después de su procesamiento químico. Ahora, las cámaras digitales mediante su detector CCD, el cual es una película de Silicio dividida geométricamente en segmentos regulares en un arreglo de miles a millones de regiones sensibles a la luz que capturan y almacenan la información de la imagen en forma de carga eléctrica localizada que varía con la intensidad de luz incidente), ofrecen una señal asociada con cada elemento de la imagen (pixel), de manera que es posible almacenar y visualizar las imágenes de manera virtualmente instantánea.

Adicionalmente, las diferentes técnicas de iluminación para observar células vivas, las diferentes maneras de excitar fluoróforos diferencialmente y la forma en que se adquieren y procesan imágenes computacionalmente han permitido lograr una resolución espacial de escala nanométrica para estructuras y fenómenos celulares, con la ventaja de que la instrumentación requerida es cada vez más simple y accesible, siendo posible realizar dicho análisis prácticamente en cualquier computadora actual. La mayoría de los recursos informáticos necesarios son de libre acceso y han sido desarrollados para estudiar procesos celulares específicos, haciendo su estudio accesible con resultados sumamente informativos (Hell, 2009).

Debido a estos avances, la adquisición de imágenes de células vivas se ha convertido en un requisito analítico en muchos laboratorios de biología celular, así como una metodología practicada en una amplia gama de campos de estudio, como neurobiología, biología del desarrollo, farmacología y otras de interés biomédico. De las dificultades técnicas más significativas para estudiar células vivas, está el hecho de mantenerlas en un estado saludable mientras se encuentran bajo el microscopio. Un sistema de análisis de células vivas típicamente consta de un microscopio invertido, los componentes ópticos adecuados, las diferentes fuentes de luz (fluorescencia, lámparas de luz visible, etc), una cámara de cultivo que mantenga las condiciones fisiológicas favorables (temperatura, composición de gases, esterilidad, humedad, etc), dispositivos que eviten el desenfoque de la muestra, obturadores para controlar la iluminación de la muestra, el software de adquisición de

imágenes y el software de control de todos los aditamentos relacionados (MicroscopyU, Nikon).

Comercialmente existe una variedad de componentes auxiliares para llevar cabo esta tarea, sin embargo, debe resaltarse el hecho de que armar un microscopio totalmente automático y optimizado para adquisición multidimensional de imágenes es aún una tarea difícil y compleja que involucra conocimientos desde biología hasta programación, óptica y electrónica. Aun así, se han hecho trabajos importantes para estudiar células vivas por periodos largos de tiempo. Por ejemplo, Shroeder en 2011 estudió células madre de mamífero rastreándolas a lo largo del tiempo para determinar su destino celular, Snijder en 2009 reportó que el contexto celular determina la variabilidad intercelular en endocitosis y en la infección por virus. Sin embargo, hasta donde sabemos, no ha habido trabajos explorando la dinámica y el comportamiento de células de insecto, específicamente de la línea Sf9, mediante adquisición de células vivas, ya sea no infectadas o infectadas por baculovirus.

En este trabajo caracterizamos cultivos estáticos de células de insecto en diferentes condiciones ambientales, como son medio líquido y semisólido, cultivos con diferente cantidad inicial de células y cultivos infectados y no infectados a diferente TOD mediante análisis de imágenes y análisis de células individuales utilizando microscopía y sensores fluorescentes.

Hipótesis

Es posible estudiar y caracterizar el comportamiento de cultivos celulares así como de células individuales en diferentes condiciones ambientales con gran resolución temporal utilizando microbiorreactores y sensores fluorescentes.

Objetivo General

Diseñar un micro sistema de cultivo estático para observar células de eucariotes superiores en diversas situaciones de cultivo.

Objetivos particulares

1. Diseñar un sistema de cultivo que permita analizar células individuales o cultivos con baja densidad celular sometidas a estrés.
2. Evaluar el efecto de la multiplicidad de infección sobre la expresión de genes reporteros en células de insecto utilizando un baculovirus recombinante y el sistema de cultivo diseñado.
3. Estudiar los cambios fisiológicos y morfológicos causados por estrés por limitación de oxígeno disuelto en células de eucariotes superiores utilizando microscopía y sensores fluorescentes.
4. Analizar la respuesta de una célula o de poblaciones pequeñas de células hacia condiciones de estrés por O₂ disuelto similares a las de un bioproceso de escala industrial.

Materiales y Métodos

En todos los experimentos, excepto donde se especifique, se trabajó con la línea celular Sf+ (*Spodoptera frugiperda*, Protein Sciences Corporation) y sólo se utilizaron pases celulares con viabilidad mayor al 95%.

•Cultivo de células de insecto en suspensión.

Partiendo de un matraz erlenmeyer de 250 mL con 30 mL de medio PSFM (Protein Sciences Corporation) con una concentración celular de 0.5×10^6 células/mL incubado a 27 °C a 110 rpm, se tomaron 700 µL de muestra cada 24 h durante 158 h. A cada muestra se le determinó la concentración celular mediante dos técnicas. La primera en el equipo Coulter multisizer 3 (Beckman Coulter) con una dilución 1:100 y de acuerdo a las instrucciones del manual. La segunda, con la técnica de azul de tripano con una dilución 1:10 usando una cámara de Neubauer, donde además se determinó la viabilidad celular.

•Cinéticas en placa de 96 pozos para cultivo celular.

Se realizaron cinéticas de crecimiento en placas para cultivo celular de 96 pozos (Costar, Corning Inc.) tanto en agitación como estáticas. De un matraz con células cultivadas en suspensión en medio PSFM (Protein Sciences Corporation), se tomó una muestra de 1 mL, se cuantificó la concentración celular con el equipo Coulter Multisizer 3 (Beckman Coulter) y se midió la viabilidad celular con la técnica de azul de tripano, utilizando una cámara de Neubauer. Se eligieron 5 volúmenes para trabajar, de 50 a 300 µL. Para cada volumen, se probaron 5 diferentes cantidades iniciales de células, de 25,000 a 164,000 por pozo en el caso de los cultivos estáticos y de 0.5 a 3.28×10^6 células/mL, en el caso de cultivos agitados.

En el caso de las cinéticas estáticas, después de colocar las células en la placa, se las dejó incubando 1 hora antes de tomar la primera lectura. Para las cinéticas en agitación, la lectura se tomó inmediatamente. Las cajas se incubaron a 27 °C con un paño húmedo dentro de una bolsa de plástico para evitar la evaporación, a 110 rpm (sólo para las cinéticas en agitación). La condensación que se generó en las tapas de las placas se removió con un algodón estéril antes de cada lectura.

Para seguir el comportamiento de las cinéticas de crecimiento, se registró la absorbancia a 630 nm de cada pozo cada 12 horas durante 216 horas, para ello se utilizó el lector de microplacas FluostarOmega (BMG Labtech). Los datos obtenidos por triplicado se graficaron con sus respectivas desviaciones estándar. Además, se graficaron las

absorbancias máximas para cada condición tanto en las cinéticas estáticas como en agitación.

•Cinética de crecimiento en agarosa de bajo punto de fusión

Se realizó una cinética de crecimiento en agarosa de bajo punto de fusión (Promega) en placas de 24 pozos para cultivo celular (Costar, Corning Inc.). Primero, se identificó la cantidad de células inicial por pozo adecuada para la cinética. Para ello, se determinó la cantidad inicial a la cual la intensidad de fluorescencia del rojo neutro no se observara saturada. Para este ensayo, las células se cuantificaron y se les midió la viabilidad como se mencionó anteriormente. Después, se incubaron por una hora las cantidades de 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 1.0 x10⁶ células por pozo, cada una por cuadruplicado, dejando una columna vacía como control negativo. Después de esa hora, se succionó el medio de cultivo de todos los pozos, dejando a las células adheridas al fondo de los mismos, e inmediatamente se les colocó 500 µL de la agarosa de bajo punto de fusión, inicialmente al 3%, preparada con medio PSFM 2x en una relación 1:1 para obtener una concentración final de agarosa de 1.5% y de medio PSFM 1x.

Una vez que la agarosa de bajo punto de fusión gelificó, se colocó una capa de 2.5mL de agarosa regular ultrapura (Invitrogen) al 0.6% con rojo neutro (Sigma Chemical Co.) al 0.1%, previamente disuelto en NaCl al 0.85% y filtrado por 0.22µm. Posteriormente la placa fue escaneada en el equipo Typhoon TRIO (GE Healthcare Life Sciences) con los filtros para registrar la emisión del rojo neutro a 550 nm (filtro 520 BP 40) y a 650 nm (filtro 610 BP).

Conociendo la cantidad adecuada de células por pozo para iniciar la cinética (0.1x10⁶), en una caja de 24 pozos se siguió el mismo procedimiento mencionado para colocar las células con la agarosa de bajo punto de fusión. Los 24 pozos se repartieron en grupos de 3 para tener lecturas por triplicado y registrar la emisión a ambas longitudes de onda cada día durante 6 días. Sólo a los pozos que les correspondía la lectura se les agregó agarosa regular con rojo neutro.

Las imágenes fueron adquiridas con el software del sistema Typhoon y posteriormente se analizaron con el programa ImageJ (NIH). Se realizaron gráficas de intensidad de la emisión del rojo neutro en función del tiempo y a cada imagen se le ajustó el contraste con respecto a la señal obtenida en los pozos de los controles.

•Determinación del coeficiente de difusión de O₂ en agarosa de bajo punto de fusión

Se colocó un electrodo de O₂ polarizado (Mettler Toledo) calibrado a 100% con O₂ burbujeado en agua por 24h en el fondo de un tubo de vidrio de 21mm de diámetro interno abierto por ambos lados. El extremo donde se colocó el electrodo se tapó con agarosa de bajo punto de fusión dejando 2.4 cm de grosor. Una vez que se estabilizó la señal, se inyectó O₂ al tubo y se registró TOD cada min durante 80.9 h. Alrededor de las 24 horas, se alcanzó un valor máximo y constante para la TOD; en ese momento se cortó el flujo de oxígeno hacia el tubo.

•Cinéticas en microcámara de cultivo

Preparación de la microcámara de cultivo

Se utilizó una microcámara de cultivo (Tokai Hit Incubation System, Tokai Hit Co. LTD) para realizar los cultivos. La microcámara, que consta de 3 partes con control de temperatura independiente (cabeza, baño de agua y base), se colocó sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon TE 3000). Se utilizaron los objetivos de 10x para campo claro y fluorescencia y el de 40x para contraste de fases.

Para los cultivos en medio líquido, la temperatura de las 3 partes fue la misma (27°C), mientras que para los cultivos en medio semisólido se mantuvo en 29°C, con el fin de aumentar la humedad del sistema y evitar el encogimiento de la agarosa de bajo punto de fusión.

Para mantener la TOD deseada, se utilizó una torre controladora de flujo másico (New Brunswick) para enviar una mezcla de gases (aire, nitrógeno o ambos) hacia la microcámara de cultivo a través de una manguera conectada a la entrada de gases de la misma.

Preparación de las células para cultivos en medio líquido

Después de determinar la concentración y viabilidad celulares como se menciona arriba, en una caja petri de 35mm de diámetro, bajo condiciones estériles, se colocaron cuidadosamente 0.5×10^6 células totales. Cuando fue necesario, se colocó medio PSFM nuevo atemperado hasta tener de 1.5 a 2mL, previo a colocar las células en la caja petri. Posteriormente se colocó la caja dentro de la microcámara de cultivo, que ya debía estar montada sobre la platina del microscopio.

Preparación de las células para cultivos en medio semisólido

Después de determinar la concentración y viabilidad celulares como se menciona arriba, en una caja petri de 35mm de diámetro, bajo condiciones estériles, se colocaron cuidadosamente 0.5×10^6 células totales. Cuando fue necesario, se colocó medio PSFM nuevo atemperado hasta tener de 1.5 a 2mL, previo a colocar las células en la caja Petri.

Luego, se colocó la caja cuidadosamente en una incubadora a 27°C durante una hora, sin agitación para que sedimentaran las células. Después de este tiempo, en condiciones estériles, se succionó el medio líquido e inmediatamente se agregaron de 1.5 a 2mL de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% (preparada como se menciona arriba).

Posteriormente se colocó la caja dentro de la microcámara de cultivo, que ya debía estar montada sobre la platina del microscopio.

Adquisición de las imágenes

Se utilizó un detector CCD (Qi1MC, Nikon) controlado con el software Nikon NIS Elements AR. La adquisición se realizó de manera automática cada 20 a 30 minutos durante el tiempo necesario para cada cultivo (desde 50 hasta más de 100 horas). Cada archivo original se guardó en la PC de trabajo y posteriormente se exportó a una unidad de memoria externa para su posterior análisis y procesamiento.

Procesamiento y análisis de las imágenes

Para el análisis de las imágenes, se utilizó el software ImageJ.

Para obtener los datos de número de células, tamaño, %área e intensidad (en el caso de las imágenes de fluorescencia de los cultivos infectados), las series de imágenes se segmentaron utilizando diferentes métodos. En general, siempre se utilizó un filtro de Prewitt, umbralización y posteriormente, operaciones binarias. Dado que cada serie de imágenes presentó características particulares, se probaron diferentes métodos de segmentación para cada una.

Para realizar un análisis de partículas (células), se utilizó el plug-in del mismo nombre. Este análisis arrojó una serie de datos que posteriormente fueron exportados a Excel (Microsoft Excel, Redmond, Washington: Microsoft, 2013). Después, se construyeron las gráficas con cada serie de datos como función del tiempo.

Para obtener los datos de tiempo de duplicación y velocidad específica de crecimiento para células individuales, se observó el número de cuadros que tardó una célula en dividirse.

Como se conoce el tiempo transcurrido entre cada cuadro, se obtiene el tiempo de duplicación (t_d) simplemente dividiendo el número de cuadros entre el tiempo transcurrido entre ellos.

Luego, se utilizó la siguiente fórmula para obtener la velocidad específica de crecimiento.

$$\mu = \ln 2 / t_d$$

Esta ecuación, en donde μ es la velocidad específica de crecimiento, describe el crecimiento exponencial de células que al reproducirse se dividen en 2 células hijas.

Para las características cualitativas de los cultivos, cada serie de imágenes fue observada detenidamente para conocer aquellos eventos celulares típicos de cultivos en condiciones óptimas de crecimiento y así después poderlos comparar con los eventos observados en condiciones ambientales adversas.

•**Plaqueo del baculovirus bacGFPVP2**

Se realizó el plaqueo de bacGFPVP2, un baculovirus recombinante que hace que la célula hospedera exprese la proteína GFP fusionada con la proteína VP2 de cápside de rotavirus (bacGFPVP2). Para ello se sembraron células Sf9 con viabilidad mayor al 95% en placas de 6 pozos a una concentración de 1.5×10^6 células por pozo en un volumen de 2 mL de medio de Grace's (GIBCO, USA) sin suero fetal bovino (SFB). Las cajas se incubaron durante 1 hora a 27°C sin agitación para permitir que las células se adhirieran. Posteriormente, se prepararon diluciones seriadas (10^{-2} a 10^{-6}) del stock viral de bacGFPVP2 en medio Grace's sin SFB. Se retiró el medio de cultivo de las placas con una pipeta y a cada pozo se le adicionaron 800 μ L de las diluciones virales, teniendo un pozo sólo con 800 μ L de medio como control negativo. Las cajas se incubaron a 27°C por 4 horas con agitación leve. Al término del periodo de incubación, se removió el líquido de cada pozo y se añadieron 2 mL de medio de plaqueo (6 mL de medio de Grace 2X, 3 mL de una disolución de agarosa de bajo punto de fusión al 4%, 1.2 mL de SFB, 1.8 mL de agua destilada estéril) a una temperatura de aproximadamente 35°C. Se dejó solidificar el medio y se incubaron las placas a 27°C sin agitación en un ambiente húmedo durante 120 horas. Al término de este periodo de incubación, se adicionaron 2 mL por pozo de la solución para teñir (6 mL de medio de Grace 2X, 150 μ L de una solución de rojo neutro 5 mg/mL, 6 mL de una solución de agarosa al 1.5%). Se dejó solidificar la agarosa y se incubaron las cajas a 27°C durante toda la noche. Se identificaron las placas virales por la formación de halos incoloros contra el fondo rojo. Dichos halos indican que las células de esa zona están

mueras, posiblemente a causa de la infección por el baculovirus, por lo que son incapaces de retener el rojo neutro. Las placas se colectaron retirándolas de la caja mediante succión usando una punta de 200 µL estéril. Los botones de agarosa se resuspendieron en 500 µL de medio de Grace con 0.5% de SFB. Las placas virales seleccionadas se sometieron a un primer ciclo de amplificación, con la finalidad de incrementar el número de baculovirus e identificar cuál de las placas aisladas producía una mayor cantidad de proteína recombinante. Se sembraron células Sf9 con viabilidad mayor al 95% en cajas de 6 pozos a una concentración de 1×10^6 células/ pozo en un volumen de 2 mL de medio SF900-II, las cajas se incubaron durante 1 hora a 27 °C.

Se eliminó el medio de cultivo de cada pozo y se infectó con un 1 mL de una dilución 1:10 (en medio Sf900-II) de una placa viral seleccionada, se incubó 1 hora a 27°C con agitación, moderada. Sin retirar el líquido, se adicionó 1mL de medio Sf900-II a cada pozo y se incubó a 27°C durante 120 horas. Después de la incubación, se colectó el líquido y se centrifugó a 1000 rpm, se separaron el sobrenadante y las células. El sobrenadante se utilizó para la posterior amplificación del stock viral.

•Determinación del título viral

En cajas de 96 pozos (2 cajas por muestra a titular) se sembraron 5×10^3 células/pozo en 50 µL de medio SF900-II. Se prepararon diluciones seriadas (10^0 a 10^{-10}) del stock viral a titular y se agregaron 10 µL/ pozo usando 16 pozos por dilución y 16 pozos como control negativo a los que se les adicionó sólo medio de cultivo. Las cajas se incubaron a 27°C con un paño húmedo durante 6 días. Al término del periodo de incubación, se agregaron 10 µL/pozo de una disolución (5 mg/mL) de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tatrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA). Las cajas se incubaron en obscuridad durante 2 h a temperatura ambiente con agitación orbital y se centrifugaron a 2000 rpm. Los cristales de formazan formados, que son producto de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial sobre el MTT, fueron solubilizados usando 50 µL/pozo de dimetil sulfóxido (DMSO). Se midió la absorbancia a 570 nm usando un lector de microplacas (modelo 550; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; USA). Los datos de absorbancia y dilución viral se ajustaron a un modelo sigmoide logístico de cuatro parámetros, usando el programa Sigmaplot.

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{X}{X_0} \right)^b} \quad \text{Ecuación 1.}$$

En esta ecuación, Y representa la absorbancia, X , la dilución del stock viral, Y_0 , la absorbancia mínima (que corresponde a la viabilidad mínima detectada), a es la absorbancia máxima, b es la pendiente de la curva y X_0 es la dilución a la cual la respuesta fue del 50%. Introduciendo el valor de X_0 en la ecuación 2, se calculó la dosis letal media del stock viral (TCLD₅₀/mL).

El valor de X_0 se sustituye en la ecuación 2 con valor negativo y se obtiene el inverso del logaritmo y se divide entre el volumen de virus empleado en cada dilución (0.01 mL) para obtener el valor de TCLD₅₀/mL. Este valor se sustituye en la ecuación 3 para obtener TCID₅₀/mL. Finalmente para obtener el valor de *ufp/mL* se sustituye TCID₅₀/mL en la ecuación 4.

$$\text{Ecuación 2: } \text{TCLD}_{50}/\text{mL} = 1/((10^{-X_0})/0.01 \text{ mL})$$

$$\text{Ecuación 3: } \log\text{TCID}_{50}/\text{mL} = 0.912 (\log \text{TCLD}_{50}/\text{mL}) + 1.674$$

$$\text{Ecuación 4: } \text{ufp}/\text{mL} = \text{TCID}_{50}/\text{mL} \times 0.69$$

El valor de 0.69 resulta considerando la distribución de Poisson, donde la p de cultivos que permanecen sin infectar en una dosis dada es $e^{-\mu}$, donde μ es la concentración media de partículas infecciosas en esa dosis. La TCID₅₀ es la dosis a la cual el 50% de las cultivos está infectado, tenemos, $p= 0.5$. Así, $0.5= e^{-\mu}$, lo cual implica que μ es la concentración media de unidades infecciosas en esa dosis, = 0.69.

•Sensor fluorescente de oxígeno disuelto

Se utilizó un sensor de oxígeno disuelto Fibox 3 (PreSens) con parches fluorescentes (Senso Spots, PreSens) para la medición de la TOD. La calibración y operación del sensor se realizó de acuerdo a las instrucciones del manual, midiendo cada 10 minutos hasta el final del cultivo.

•Ensayos en placas de 24 pozos para determinar el efecto de la MOI

Diseño de la placa

Primero, en una placa para cultivo celular de 24 pozos (Costar) se colocaron 0.8×10^5 células/mL. Posteriormente se infectaron las células con un baculovirus recombinante a las multiplicidades de 0.1, 0.5, 1, 2 y 5 ufp/mL. Cada columna de 4 pozos fue usada como una condición (multiplicidad) por cuadruplicado.

El baculovirus recombinante utilizado fue construido en el laboratorio y contiene dos genes recombinantes que codifican para dos proteínas de fusión. Uno de los genes corresponde a tres RFPs fusionadas con la proteína de cápside más abundante, VP39, y se encuentra regulada bajo el promotor de VP39, que corresponde a la fase tardía de la infección. El otro gen recombinante corresponde a EGFP fusionada con el gen VP3, que corresponde a una proteína de cápside de virus adenoasociado. Dicho gen se encuentra regulado bajo el promotor de poliedrina, un promotor de fase muy tardía de la infección.

Se utilizaron células no infectadas como control negativo. En cada pozo se utilizó el medio sin suero PSFM (Protein Sciences Corporation) para un total de 0.6 mL/pozo y las placas fueron incubadas a 27°C por 120h, tomando muestras cada 24h.

Adquisición y análisis de imágenes

Se adquirieron imágenes de campo claro y de epifluorescencia de cada pozo cada 24h usando un microscopio invertido (Nikon TE 3000) acoplado a un detector CCD (Qi1MC, Nikon) controlado con el software Nikon NIS Elements AR. Después, usando el software ImageJ (U. S. National Institutes of Health, <http://imagej.nih.gov/ij/>), se contaron manualmente células con diferentes características de interés.

De las imágenes en campo claro, se obtuvo el número de células vivas, muertas y con fenotipo fibroblastoide para posteriormente calcular la viabilidad y el porcentaje de células migrando. De las imágenes de epifluorescencia se contaron el número de células fluoresciendo solo en el canal verde (EGFP-VP3), solo el rojo (RFP-VP39) y en ambos.

Finalmente, sobrelapando las imágenes de cada uno de los 3 canales se contó el número de células vivas expresando las proteínas recombinantes de fusión.

Resultados y Discusión

•Se determinaron parámetros como la velocidad específica de crecimiento de las células Sf+ y la duración de la fase exponencial de crecimiento.

La concentración celular determinada con el equipo Coulter multisizer y con la cámara de Neubauer se muestran en la figura 1, además de la viabilidad obtenida con la técnica de azul de tripano.

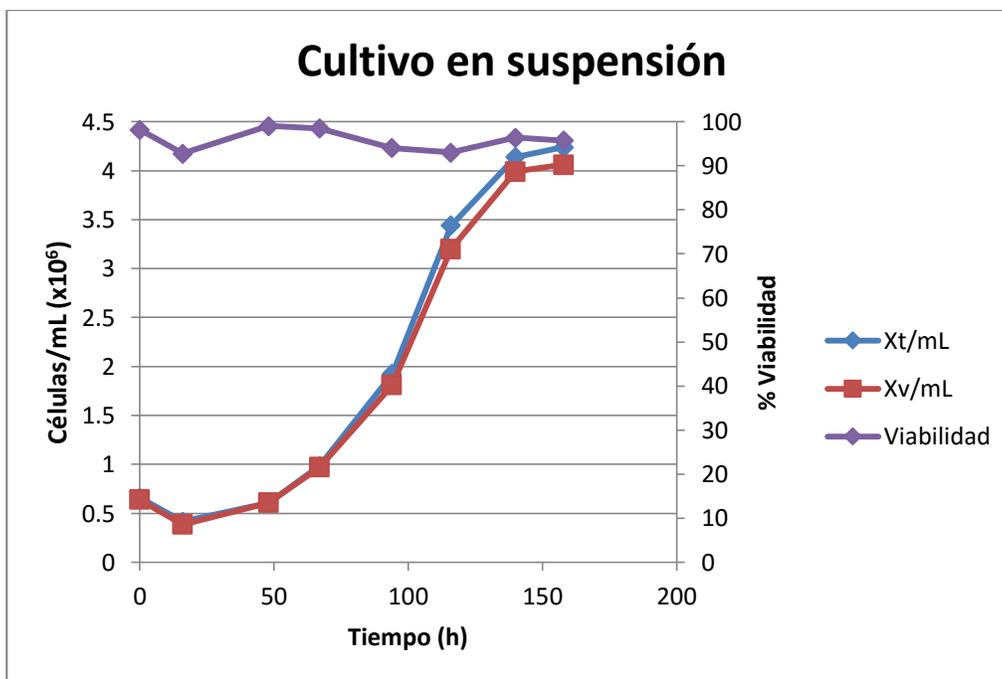


Figura 1. Cinética de crecimiento en matraz de células de insecto Sf+ en medio Ex Cell 420. Xt-células totales por mL; Xv-células viables.

Se observó una curva de crecimiento típica para cultivos celulares. La viabilidad se celular se mantuvo por arriba del 90%, lo cual es esperado para cultivos de células no infectadas ni sometidas a estrés. La fase exponencial comenzó alrededor de las 48h y duró aproximadamente 100 h. La velocidad específica de crecimiento fue 0.024 h^{-1} , similar a las reportadas previamente (Ikonomou, 2003). El t_d fue de 28.9 h.

•Después de 48 h postinfección y de incubar las células en la microcámara de cultivo, se puede observar la fluorescencia del gen reportero, indicando que las células han sido infectadas.

Para conocer y comenzar a caracterizar el comportamiento de los cultivos de células de insecto en la microcámara de cultivo y así poder comprobar, entre otras cosas, que dicho

equipo es capaz de mantener a las células y que la expresión del gen reportero (GFP-VP2) no se ve afectada, comprada con la expresión en células infectadas cultivadas en suspensión, como típicamente se hace en el laboratorio.

Después de 24 horas de incubación, se determinó la concentración y la viabilidad celular para entonces infectar las células a una MDI de 1.0 ufp/célula. A las 48 h postinfección hpi, se tomó una muestra de 3 mL del matraz para observarla al microscopio (TE 3000, Nikon, invertido) y se adquirieron imágenes digitales utilizando el programa Nikon NIS Elements AR y un detector CCD (Qi1MC, Nikon), además de una cámara digital de 5MP de Samsung.

El objetivo de este ensayo sencillo, que comparar, al menos de manera visual, que las células cultivadas en la microcámara de cultivo podían distinguirse de manera individual, que la expresión del gen reportero estaba presente y observar las diferentes morfologías conocidas para células de insecto en cultivo (Vaughn, 1977).

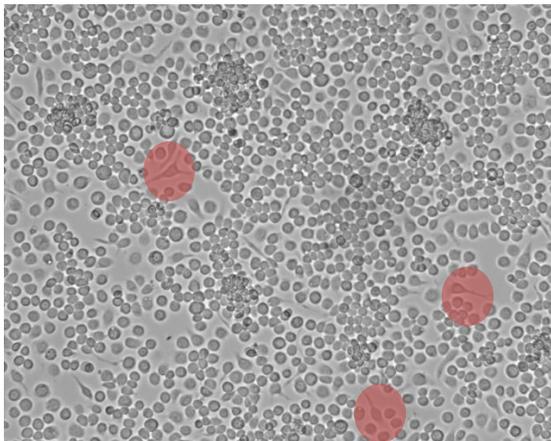


Figura 2A Cultivo de células Sf9 sin infectar a las 24 horas. (campo claro, 10x, cámara CCD)

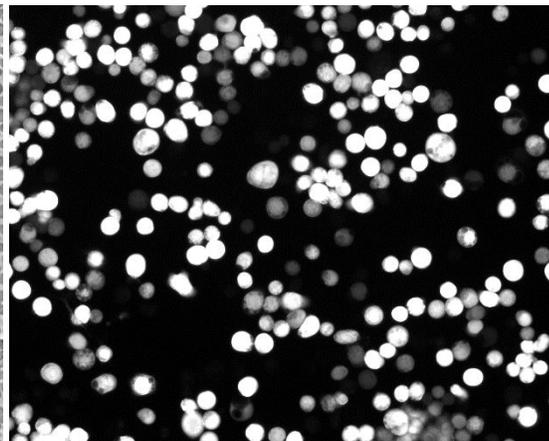


Figura 2B Células infectadas con bacGFPVP2 48 HPI (fluorescencia, 10x, Cámara CCD)

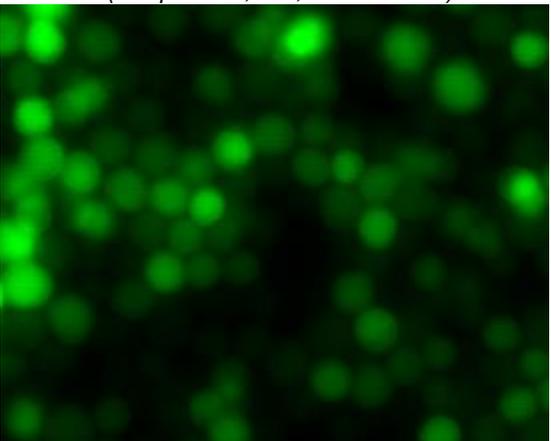


Figura 2C. Células infectadas con bacGFPVP2 48HPI (fluorescencia, 40x, cámara CCD)

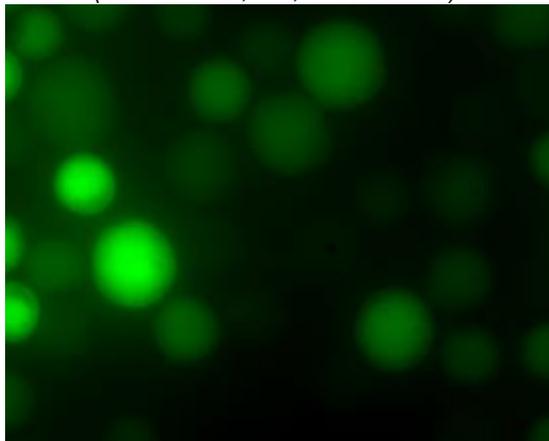


Figura 2D. Células infectadas con bacGFPVP2 48 HPI (fluorescencia, 60x, cámara CCD)

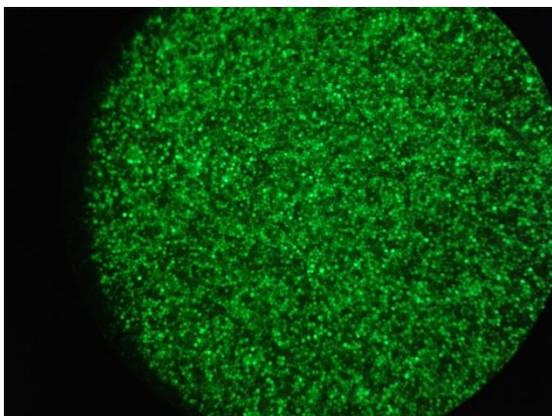


Figura 2E Células infectadas con bacGFPVP2 48 HPI (fluorescencia, 10x, cámara externa)

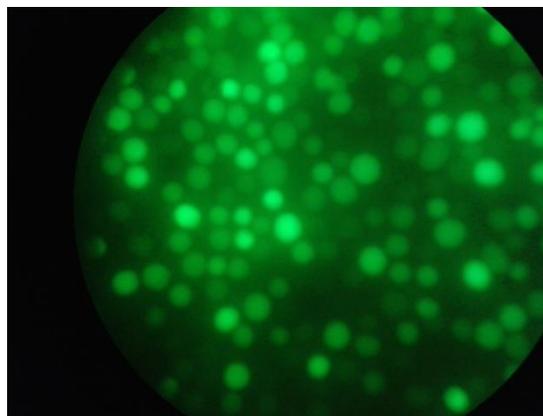


Figura 2F. Células infectadas con bacGFPVP2 48 HPI (fluorescencia, 40x, cámara externa)

Se observaron las células de insecto infectadas con bacGFPVP2 con diferentes objetivos y provenientes de ya sea de cultivo en suspensión o cultivo estático. La imagen 2A corresponde a un cultivo estático, donde pueden observarse las morfologías típicas de células de insecto. La mayoría son redondas, sin embargo algunas células tienen forma típicamente definida como fibroblastoide (marcadas en rojo), las cuales es común observar en este tipo de cultivos. En las demás imágenes se observa que la proteína verde fluorescente se expresó, indicando infección viral. Utilizando el programa Nikon NIS Elements AR se adquirieron las imágenes y posteriormente se realizaron algunas mediciones (tamaño y número total por campo) presentadas más adelante. Las imágenes 2C y 2E corresponden a una caja petri diferente a las correspondientes a las imágenes 2D y 2F. No se observó diferencia entre estas células aunque las dos primeras son de cultivo en incubadora y las dos últimas se tomaron de la microcámara de cultivo con condiciones controladas, indicando que las células crecen adecuadamente en la microcámara y, al menos para este fin y de manera preliminar, es posible considerarla del sistema de cultivo a proponer como herramienta para caracterizar poblaciones de células infectados con baculovirus recombinantes.

•Las cinéticas en placas de 96 pozos presentan ciertos inconvenientes metodológicos y de análisis.

Se planteó que una manera de conocer las dimensiones que podría tener el sistema de cultivo a diseñar así como evaluar el crecimiento celular a pequeña escala, se podría lograr cultivando las células en placas de 96 pozos donde se probaran distintos volúmenes de medio con cantidades celulares iniciales distintas. Por ello, para conocer el efecto del volumen del medio de cultivo sobre diferentes cantidades iniciales de células, se decidió

realizar cultivos en dichas placas, en las cuales fue posible probar simultáneamente 5 volúmenes, de 50 hasta 300 μL y cada uno con 5 números de células iniciales diferentes (27 400 a 164 000). Se consideró la absorbancia más alta registrada en cada uno de los cultivos (absorbancia máxima) y se graficó en función tanto del volumen como de la cantidad inicial de células. En las figuras 3 y 4 se observa que la absorbancia máxima de los cultivos tiene un comportamiento ascendente hacia volúmenes más grandes con una mayor cantidad de células iniciales, registrándose la más alta a 300 μL con 164 400 células iniciales, tanto en los cultivos agitados como en los estáticos.

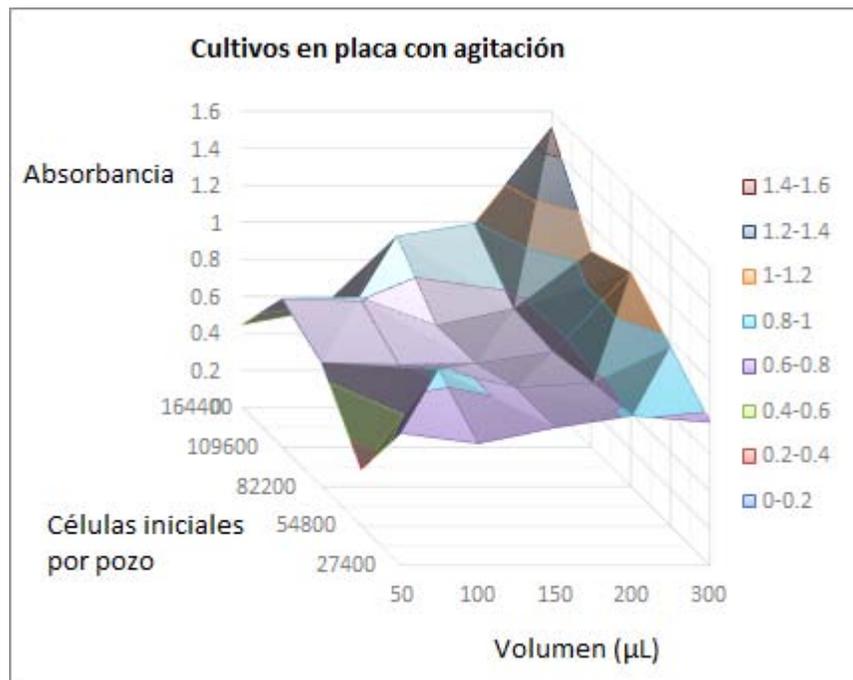


Figura 3. Absorbancias máximas obtenidas en cultivos en placa con agitación. Se presentan las absorbancias máximas para cada volumen y la cantidad inicial de células.

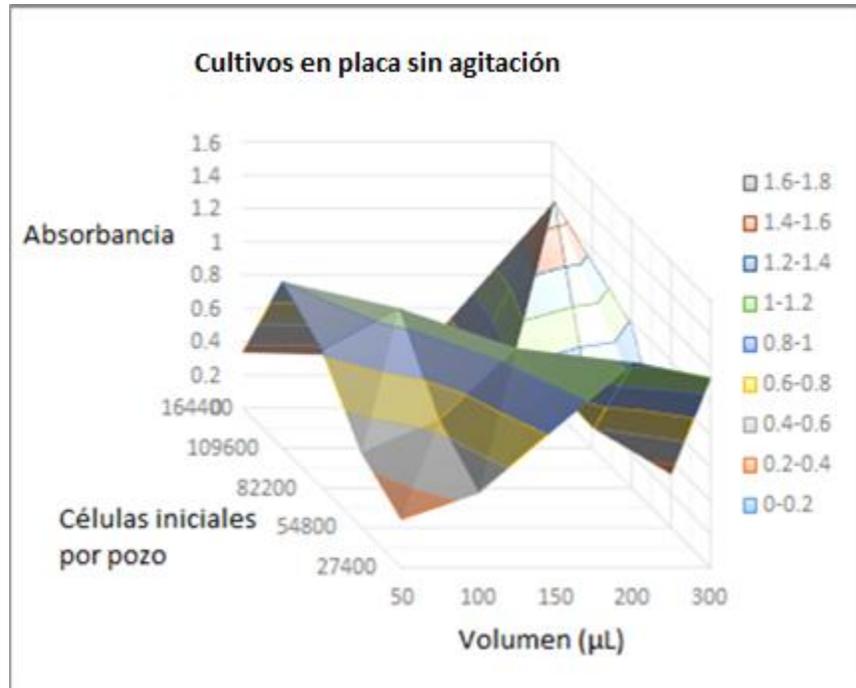


Figura 4. Absorbancias máximas obtenidas en cultivos en placa sin agitación. Se presentan las absorbancias máximas para cada volumen y la cantidad inicial de células.

En el caso de los cultivos en agitación, las otras combinaciones de números iniciales de células y volúmenes tuvieron una absorbancia máxima dentro del rango de 0.6 a 0.8 unidades de absorbancia, excepto los casos donde el volumen fue 50 µL con una cantidad o muy pequeña (27, 400) o muy alta (164, 400) de células. En el caso de los cultivos sin agitación, se observa que hubo una mayor absorbancia máxima en los volúmenes intermedios (100, 150 y 200 µL) con las cantidades intermedias de células (54 800, 82 200 y 109 600), e igual que en los cultivos agitados, la absorbancia fue menor a volúmenes más pequeños con cantidades de células mayores.

Este sistema de cultivo tiene varios inconvenientes que impiden obtener resultados representativos del comportamiento de las células en cultivo. Primero, la absorbancia a 630 nm no distingue a las células viables de las muertas. Otro inconveniente fue que siempre se condensa líquido en las tapas, el cual hay que remover antes de realizar las lecturas. Esto ocasiona dos problemas, el primero es que hay mucha manipulación de las cajas, por lo que hay mucho riesgo de contaminación. El segundo es que el tiempo requerido para eliminar la condensación de las cajas y llevarlas al equipo para registrar la absorbancia es demasiado alto y ocasiona que las células sedimenten. Debido a que el lector de microplacas, al registrar la absorbancia, hace pasar el haz de luz desde debajo de la placa, la absorbancia registrada podría estar sobreestimando la cantidad de células en ambos

tipos de cultivo, si no se elimina totalmente la condensación o si la tapa empieza a rayarse después de frotarla continuamente para secarla.

Adicionalmente, se observó que en los cultivos agitados en estas placas las células tienden a agregarse (figura 5), lo cual dificultaría un análisis individual de ellas, así como su crecimiento o viabilidad, interfiriendo con uno de los objetivos de este trabajo.

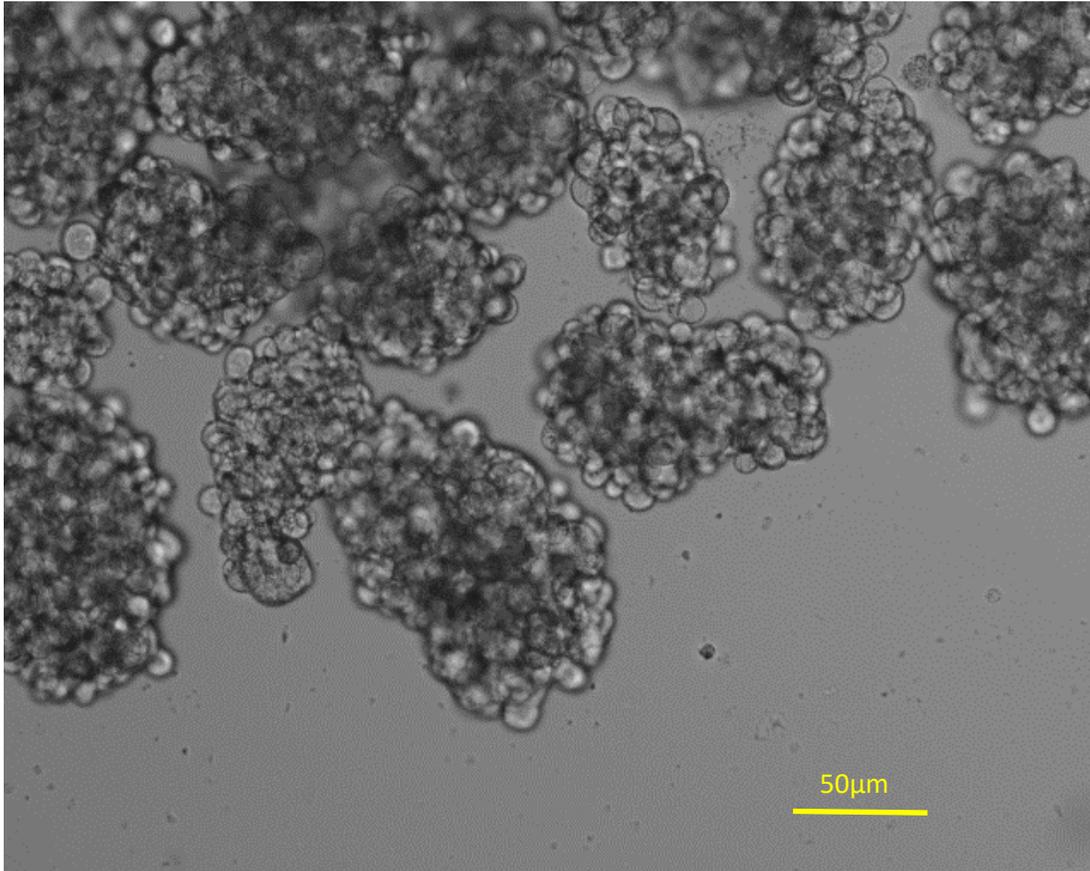


Figura 5 Aglomerados celulares en cinéticas en placa agitada. Campo claro, 10x.

Por estas razones, no se puede asociar un valor de absorbancia sólo al número de células, ya sean vivas o muertas, ya que hay otros factores que pudieran estar afectando las lecturas, por lo tanto no es posible estudiar los efectos del volumen y la concentración o cantidad inicial de células en el crecimiento celular con esta metodología.

Si se resuelven estos problemas de lectura de absorbancia y detalles técnicos, esta manera de estudiar la cinética celular sería muy conveniente, ya que se podría evaluar el efecto de muchas condiciones diferentes al mismo tiempo. Hasta ahora, el comportamiento de las cinéticas ha sido muy errático (Anexo I) sin que este se pueda asociar a una variable específica.

•El cultivo en agarosa de bajo punto de fusión aparentemente no limita la transferencia de oxígeno ni el crecimiento celular.

Como en los cultivos en placas de 96 pozos fue difícil interpretar los datos para asegurar si las células estaban creciendo en condiciones limitantes, se decidió cultivarlas con agarosa de bajo punto de fusión preparada con medio de cultivo, razonando que un medio semisólido mucho más viscoso que el agua podría generar condiciones limitantes de oxígeno. Adicionalmente, se requirió de un colorante que fuera específico para células vivas, con el cual se pudiera discriminar la población de células muertas y una metodología para registrar el crecimiento celular en el tiempo. Para el colorante se eligió al rojo neutro, una molécula fluorescente con 2 longitudes de onda máximas de emisión (550 y 650 nm) que puede ser utilizada para teñir células vivas (Singh, 1998, Dubrovsky, 2006), de tal manera que la intensidad de fluorescencia puede asociarse a una cantidad de células vivas, no siendo así con las muertas. Para registrar la intensidad de fluorescencia del rojo neutro en las placas, se utilizó el equipo Typhoon.

Para este ensayo, primero se determinó la cantidad de células iniciales (X_0) por pozo adecuada para no tener una saturación de la intensidad de emisión del rojo neutro desde un inicio, la cual fue de 0.1×10^6 células (figuras 5 y 6). De esta forma, las células podrán crecer hasta aproximadamente 0.8×10^6 por pozo y permanecer en la zona lineal de respuesta de la intensidad fluorescencia.

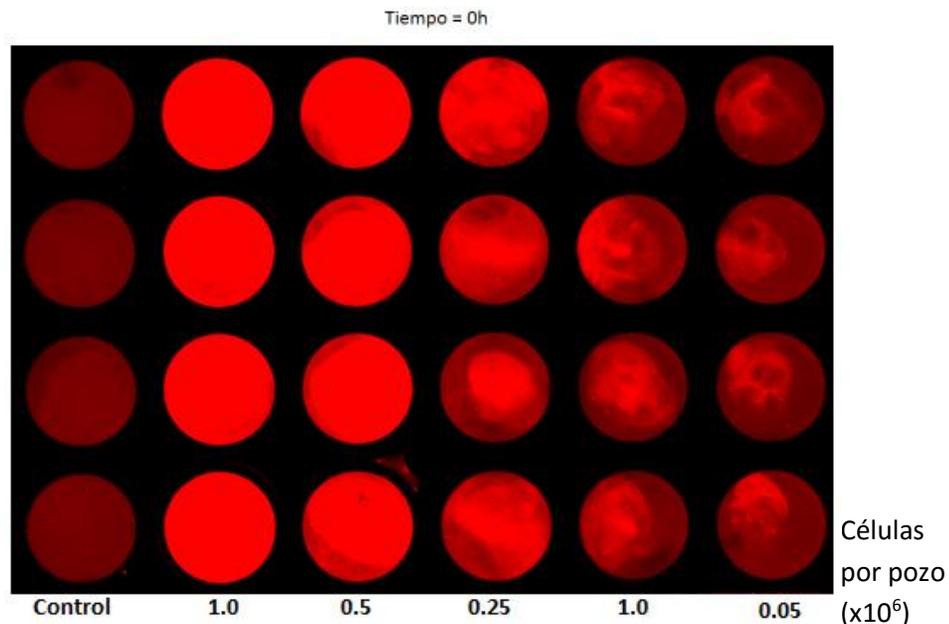


Figura 5. Intensidad de fluorescencia del Rojo Neutro a 550nm en placa de 24 pozos a diferentes cantidades de células al tiempo 0.

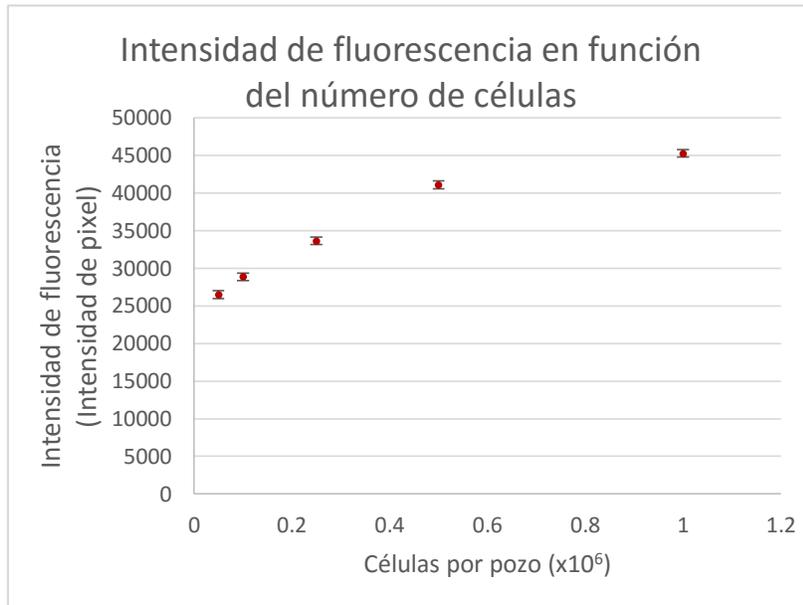


Figura 6. Intensidad de fluorescencia del rojo neutro a 550nm en función del número de células.

Las barras verticales indica la desviación estándar.

Si se cultivan las células en un medio semisólido, como la agarosa, se pueden eliminar los procesos convectivos que favorecerían la transferencia de masa en un medio líquido. Sin embargo, esta metodología presenta ciertos inconvenientes. Primero, el colorante rojo neutro es fotosensible, por lo que para poder correlacionar una intensidad de fluorescencia con el crecimiento celular, no se puede realizar la lectura de un solo pozo a lo largo del tiempo, es decir, se debe teñir sólo el o los pozos a los cuales les corresponde la lectura. No es posible seguir en detalle los cambios en el crecimiento celular, ya que se sacrifica el pozo para hacer una lectura (figura 7).

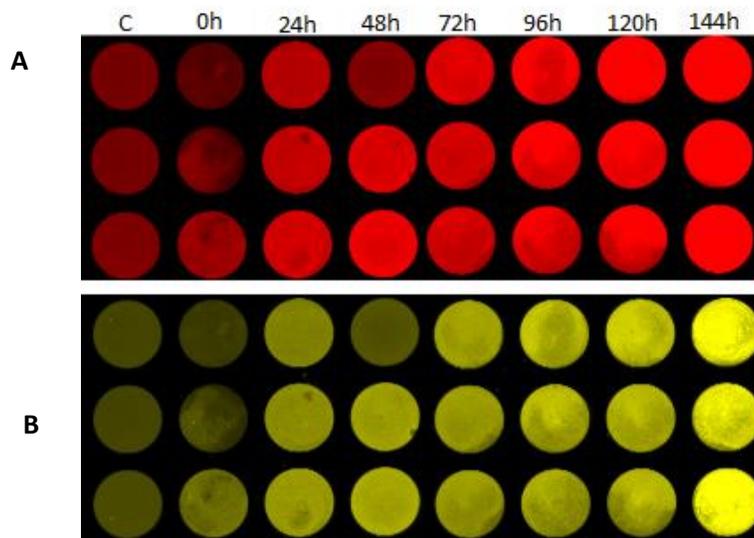


Figura 7. Cinética de crecimiento en agarosa de bajo punto de fusión. Se presenta la intensidad de fluorescencia del rojo neutro por triplicado a 550nm (A) y a 650nm (B). C, blanco sin células. $X_0 = 0.1 \times 10^6$ células por pozo.

El aumento lineal en la intensidad de fluorescencia (figura 8) se relacionó con el aumento en la cantidad de células vivas. La velocidad específica de crecimiento calculada ($\mu = 0.0025 \text{ h}^{-1}$) es un orden de magnitud menor a la obtenida en un cultivo en suspensión (0.024 h^{-1}) sugiriendo que las células crecen más lento en agarosa y esto podría deberse, entre otras cosas, a una transferencia de oxígeno deficiente.

Para comprobar esto, se determinó experimentalmente el coeficiente de difusión de oxígeno en agarosa de bajo punto de fusión al no estar disponible en la literatura, obteniéndose un coeficiente de $1.31 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ (figuras 9 y 10).

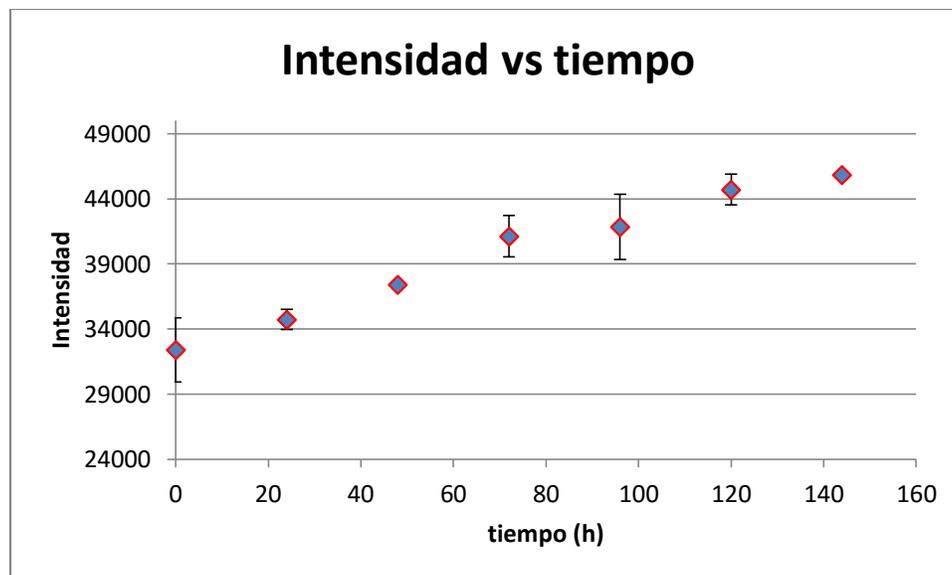


Figura 8. Intensidad de fluorescencia del rojo neutro a 550nm en función del tiempo. Velocidad específica de crecimiento obtenida, $\mu = 0.0025 \text{ h}^{-1}$

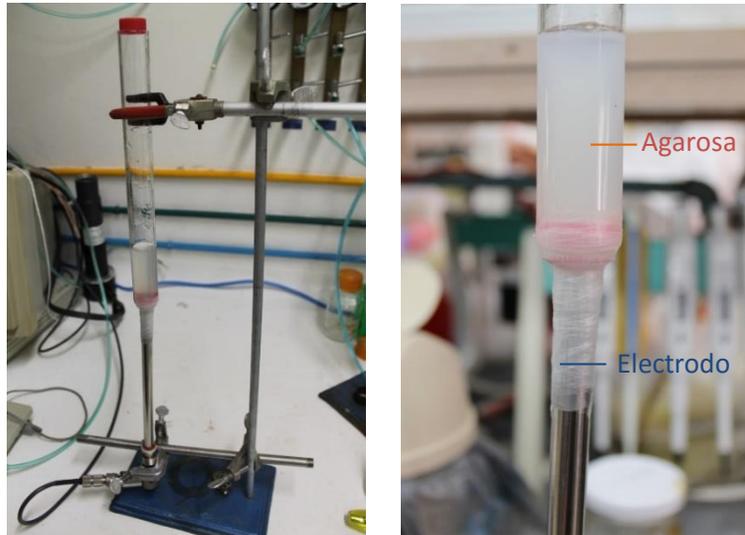


Figura 9. Se muestra el sistema para medir la difusión de oxígeno en agarosa de bajo punto de fusión

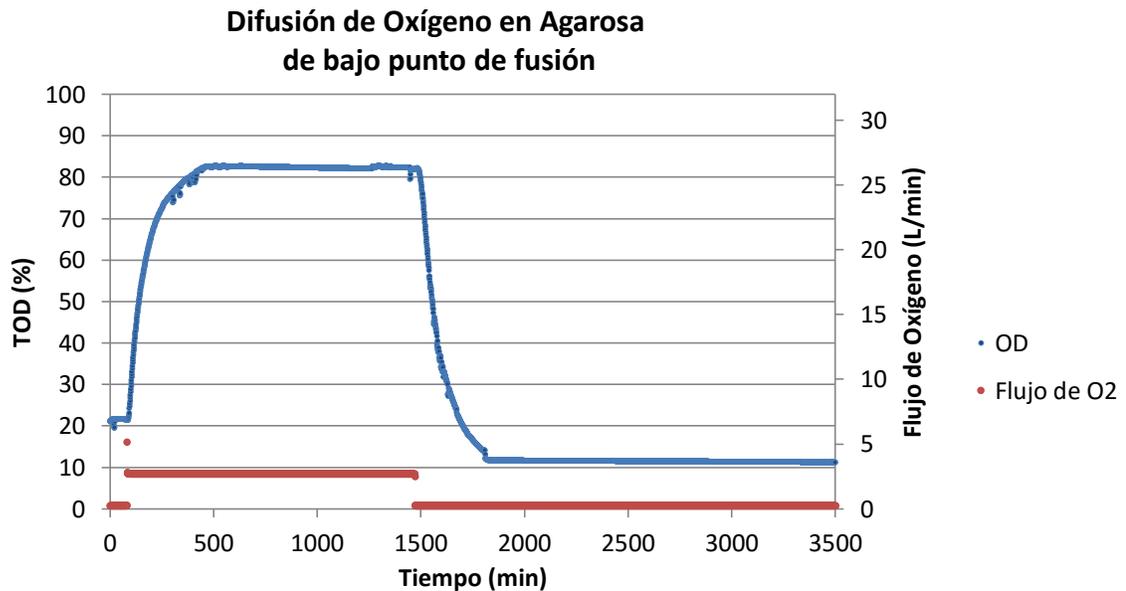


Figura 10. Medición del coeficiente de difusión de oxígeno en agarosa en agua al 1.3%. Oxígeno disuelto en función del tiempo y cambio escalonado de flujo de oxígeno hacia el sistema mostrado en la figura 9.

El cálculo, se realizó con los datos mostrados en figura 10, el tiempo requerido para que la TOD alcanzara un valor máximo (alrededor del 83% de TOD), considerando el tiempo al cual se comenzó a adicionar oxígeno al sistema (a los 82 minutos), así como el tiempo para que, a partir de este valor máximo, la TOD disminuyera a un valor mínimo (alrededor del 12%), tomando en cuenta el tiempo al cual se dejó de adicionar oxígeno al sistema (a los 1476 minutos). Una vez conocido este tiempo, se utilizó la ecuación

$$D = \frac{L^2}{t}$$

tomada de *Dusenbery (2011)*, donde D es el coeficiente de difusión, t es el tiempo y L es la distancia en la cual ocurre esta difusión, que en este caso fue de 1.7cm.

Para la parte ascendente: $D = (1.37\text{cm})^2 / 373\text{min} = 1.29 \times 10^{-4} \text{cm}^2/\text{min}$

Para la parte descendente: $D = (1.37\text{cm})^2 / 357\text{min} = 1.34 \times 10^{-4} \text{cm}^2/\text{min}$

Se tomó el promedio de ambos valores, obteniéndose un coeficiente más alto que el del agua ($2.5 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$) (Lakowicz, 2006). Por lo tanto, sería más favorable la transferencia de oxígeno en agarosa que en agua, no lográndose así una condición limitante de oxígeno, que era inicialmente la razón para cultivar las células con esta metodología. De hecho, en los cultivos líquidos con la mayor cantidad de células y el mayor volumen de medio se logró observar crecimiento celular, aunque con los inconvenientes ya mencionados, indicando que las células no están limitadas. Este resultado también indica que el lento crecimiento celular observado en cultivos en agarosa no es provocado por limitación de oxígeno.

•Los cultivos en la microcámara de cultivo ofrecen mucha información y tienen resolución temporal, siendo posible obtener tanto parámetros simples como tamaño, número y tiempo de duplicación, como observar procesos dinámicos que ocurren en diferentes condiciones ambientales.

Debido a que los cultivos son monitoreados a través de la adquisición frecuente de imágenes mediante un detector CCD acoplado a un microscopio (figura 11 A) y tanto la temperatura como la composición de gases es manipulable en este sistema (figura 11 B), es posible simular las condiciones adversas a las que se puede enfrentar una población de células, por ejemplo, en un cultivo a gran escala, lo cual es un objetivo de este proyecto.

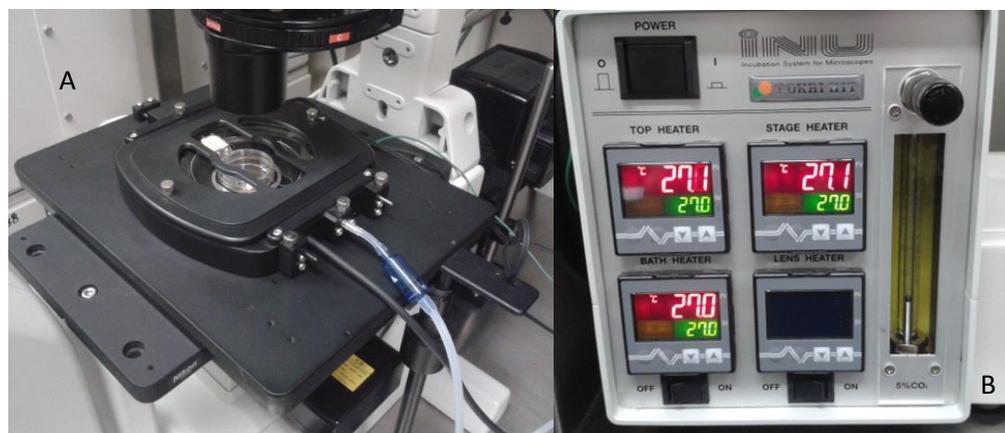


Figura 11. Microcámara de cultivo montada (izquierda) y controles de temperatura y entrada de gases (derecha)

Para estos experimentos, se inició comprobando que el sistema fuera capaz de mantener las condiciones ambientales que se requieren para que las células crezcan de manera adecuada. Para ello se compararon parámetros cinéticos y morfológicos de cultivos en matraz agitado y cultivos en la microcámara, tales como tamaño, número y viabilidad. Un aspecto importante a considerar es que debido a que la información obtenida con la microcámara de cultivo está en forma de imágenes, fue necesario calibrar el software para que las medidas como tamaño celular y rapidez representaran un valor exacto.

Para comprobar dicha calibración, se comparó el tamaño celular obtenido a partir del análisis de las imágenes y el tamaño obtenido por el equipo Coulter Multisizer. Los resultados que se muestran en las figuras 12 y 13 indican claramente que los valores son muy parecidos, por lo que se puede decir que la calibración fue correcta. Además, el que los tamaños celulares sean los típicos de células de insecto, indica que las condiciones ambientales de la microcámara de cultivo no afectaron este parámetro, el cual puede variar por factores adversos, tales como cambios en la temperatura de incubación.

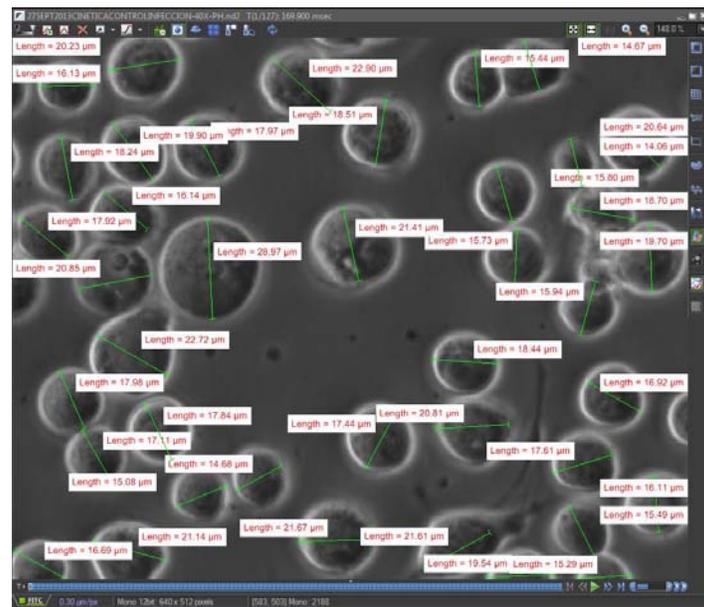


Figura 12. Ejemplo del análisis de imágenes usando el software Nikon NIS Elements para medir el número y tamaño de las células.

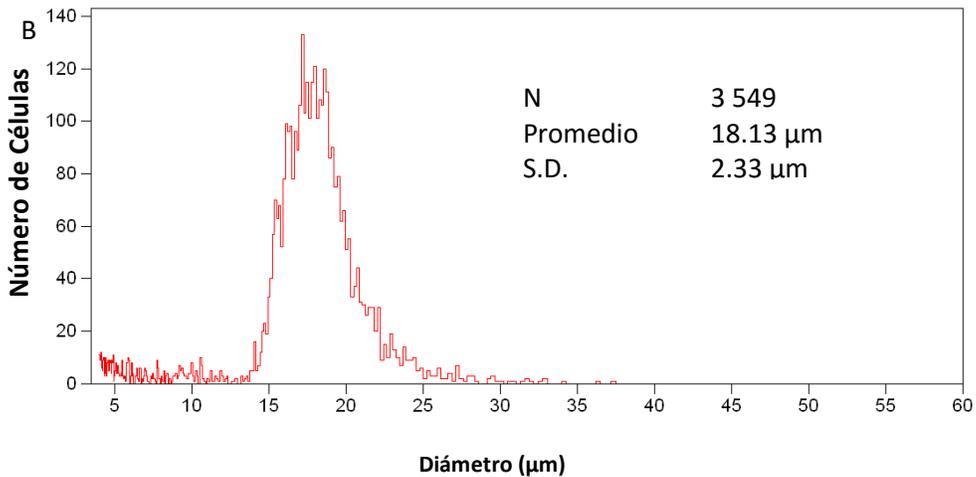
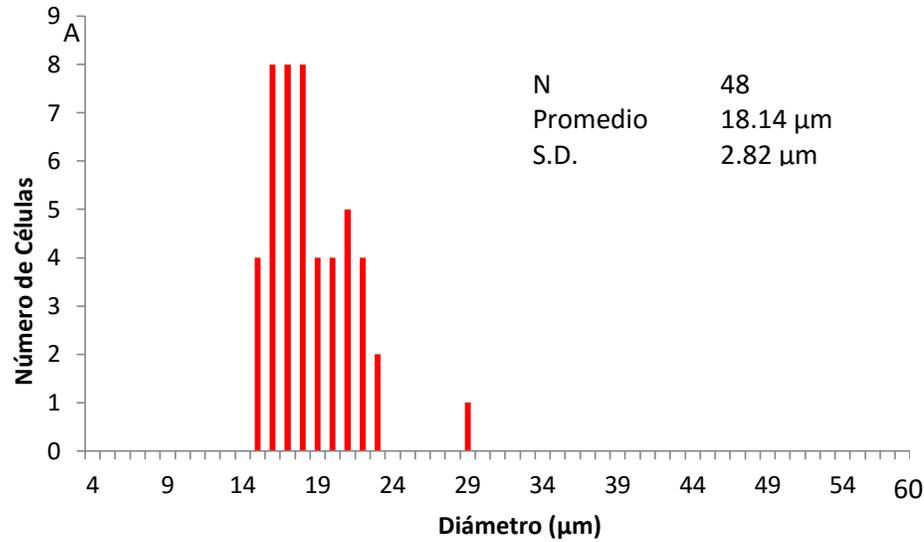


Figura 13. Histogramas de la distribución de tamaño celular obtenida con el análisis de imágenes (A) y con el equipo Coulter (B).

Adicionalmente, la microcámara de cultivo mostró grandes ventajas para el estudio de la interacción intercelular y la dinámica poblacional que no ofrecen las otras dos metodologías trabajadas, como lo son la observación, durante toda la cinética, de los eventos que ocurren en cada una de las células en el campo observado. Otra de las ventajas fue que la frecuencia de adquisición de imágenes se conocía. De tal forma, se pudo conocer la duración de los eventos celulares, por ejemplo el tiempo de duplicación de cada célula individualmente, el número de células por campo y la rapidez y frecuencia de migración.

Célula	Rapidez ($\mu\text{m}/\text{hora}$)
1	8.88
2	14.02
3	10.24
4	6.99
5	10.43
6	55.38
7	6.84
8	8.28
9	7.08
10	6.6
11	7.5
12	16.96
13	6.87
14	6.14
15	10.33
16	5.67
17	7.05
18	20.87
19	7.2
20	7.15
21	3.76
22	7.18
23	6.78
24	8.76
25	12.5
26	14.05
27	6.5
28	7.6
29	8.42
30	8.35
31	15.29
32	4.98
33	6.86
34	5.29
35	9.37
36	7.12
37	6.34
38	7.58
39	7.04
40	17.02
41	7.42
42	6.75
43	5.52
44	10.16
45	8.77
46	9.96
47	8.68
48	6.32
49	5.37
50	6.75

Promedio de rapidez = 9.53 $\mu\text{m}/\text{hora}$

Célula	Tiempo de duplicación (h)	μ (h^{-1})
1	24.8	0.0279
2	28.7	0.0242
3	32.1	0.0216
4	26.6	0.0261
5	21.5	0.0322
6	21.6	0.0321
7	18.9	0.0367
8	24.5	0.0283
9	26.7	0.026
10	25.3	0.0274
11	29.7	0.0234
12	38.3	0.0181
13	25.7	0.027
14	33	0.021
15	14.3	0.0484
16	25.3	0.0274
17	18	0.0385
18	29	0.0239
19	30.7	0.0226
20	27	0.0257
21	17.7	0.0392
22	23	0.0301
23	30	0.0231
24	26	0.0267
25	18	0.0385
26	19.5	0.0355
27	27.5	0.0252
28	23.5	0.0295
29	23.5	0.0295
30	21	0.033
31	25.5	0.0272
32	31.5	0.022
33	21.6	0.0321
34	18.3	0.0379
35	255	0.0027
36	25.3	0.0274
37	28.7	0.0242
38	32	0.0217
39	29.5	0.0235
40	25.6	0.0271
41	26.3	0.0264
42	23.5	0.0295
43	25.6	0.0271
44	24.4	0.0284
45	24.4	0.0284
46	21.5	0.0322
47	27.1	0.0256
48	25.6	0.0271
49	22.7	0.0305
50	21.2	0.0327

Promedio de tiempo de duplicación = 32.4 h

Promedio de velocidad específica de crecimiento = 0.028 h^{-1}

Tabla 1. Tiempos de duplicación, rapidez y velocidad específica de crecimiento de 50 células seleccionadas al azar.

En la tabla 1 se muestran los t_d , μ y rapidez de migración para 50 células seleccionadas al azar. Se observa que hay diferencias entre cada una aunque el promedio es similar al tiempo de duplicación determinado con la velocidad específica de crecimiento de células cultivadas en suspensión (28.6h). Como muestra esta información, hay una distribución en los valores de los parámetros medidos.

Caracterización de los cultivos realizados con la microcámara en diferentes condiciones ambientales.

Una vez que la microcámara de cultivo fue probada para llevar a cabo los experimentos y haber demostrado ofrecer la información que se deseaba obtener en este trabajo, se procedió a realizar los experimentos en diferentes configuraciones ópticas, tipo de medio de cultivo y a diferentes condiciones ambientales.

En cuanto a la configuración óptica de los experimentos, se probaron 2 tipos diferentes de iluminación: campo claro con el objetivo 10x (Plan Fluor, 0.30 de apertura numérica, Nikon) y contraste de fases con el objetivo de 40x (LWD, 0.55 de apertura numérica, Nikon). En cuanto a los tipos de medio de cultivo, se probaron el medio líquido PSFM y el medio semisólido (PSFM en garosa de bajo punto de fusión).

En cuanto a los cultivos en diferentes condiciones ambientales, se estudiaron cultivos infectados, sin infectar y cultivos limitados de oxígeno, habiendo determinado previamente la cantidad de células inicial adecuada para facilitar el análisis de imágenes (0.5×10^6 células).

Para obtener los parámetros cinéticos de los experimentos, se llevó a cabo una segmentación de las imágenes (Anexo 2). Este procesamiento es útil para obtener el número y tamaño de las células, sin embargo no ofrece información acerca de los fenotipos celulares de interés. Dicha información fue obtenida manualmente

Efecto de la multiplicidad de infección sobre la heterogeneidad poblacional de células de insecto

Antes de realizar los experimentos en la microcámara de cultivo, se determinó el efecto de la multiplicidad de infección sobre los cultivos de células de insecto utilizando un baculovirus recombinante, el cual fue construido en el laboratorio mediante el Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System por Enrique Paz. Este baculovirus contiene dos genes que codifican para proteínas de fusión: RFP₃-VP39 bajo el promotor de *vp39*, un promotor de fase tardía

de baculovirus, y EGFP-VP3 bajo el promotor de *polh*, un promotor de fase muy tardía (figura 14). VP39 es la mayor proteína estructural más abundante en la cápside de baculovirus y VP3 es una proteína de cápside de virus adenoasociado sin una función particular al ser expresada en células de insecto.

Como puede observarse en la figura 14, es posible diferenciar las diferentes poblaciones celulares de manera no invasiva utilizando los marcadores fluorescentes indicados, los cuales están codificados genéticamente.

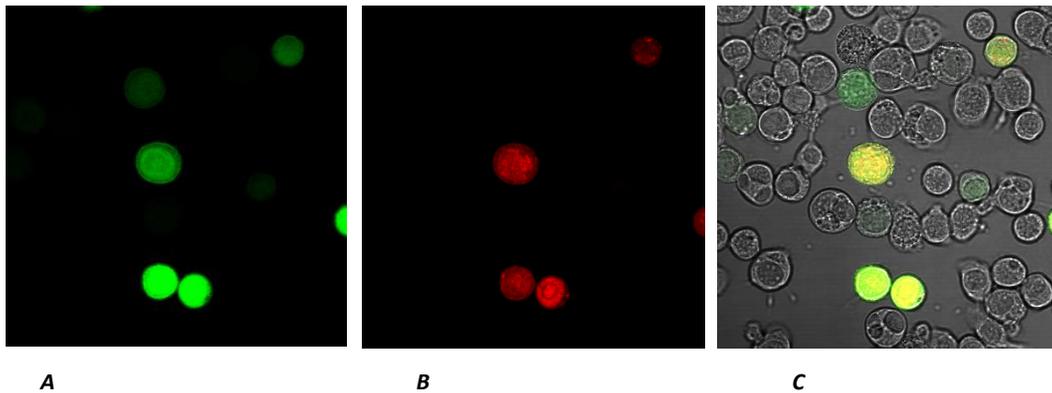


Figura 14. Imágenes de fluorescencia de células de insecto infectadas con el baculovirus recombinante construido en el laboratorio. A, canal de EGFP. B, canal de RFP. C, Sobrelape de los canales de fluorescencia y campo claro

Para caracterizar el comportamiento de los cultivos infectados con respecto al tiempo utilizando este baculovirus recombinante, primero se determinó el efecto de la MDI sobre la cantidad total de células.

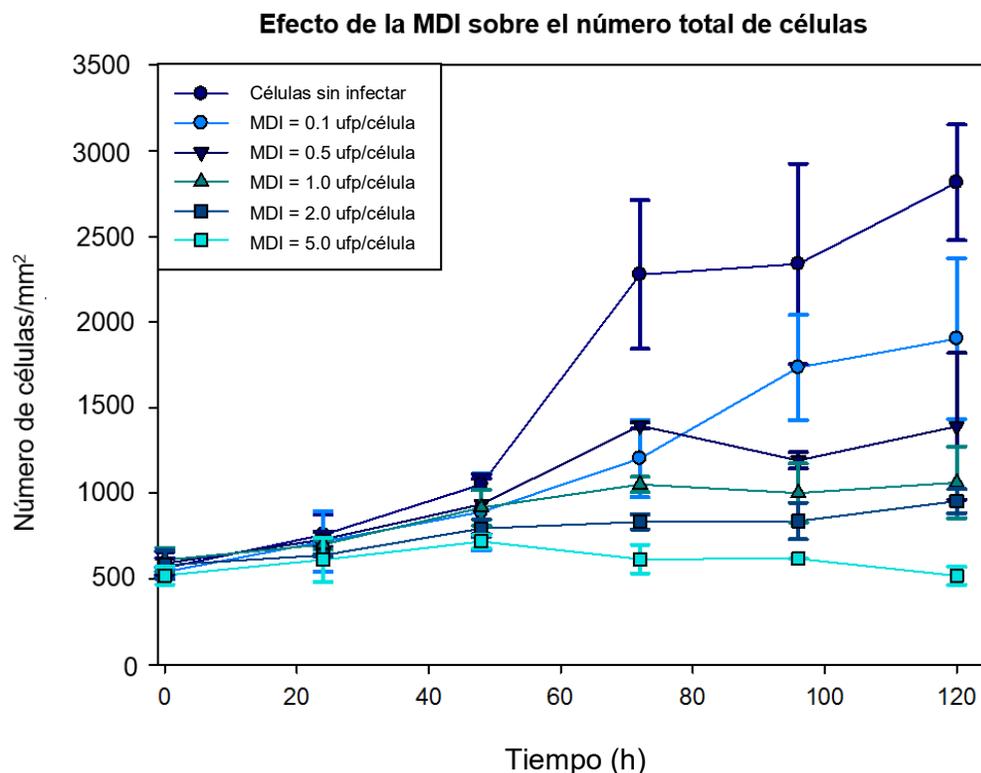


Figura 15. Cinéticas de crecimiento para los cultivos en placa a diferentes MDI. Las barras representan la desviación estándar entre triplicados

Tras la infección, se espera que los cultivos presenten un arresto en la tasa de crecimiento. En la figura 15 se representa el efecto de la multiplicidad de infección (MDI) sobre el número total de células; se observa que la cuantificación del crecimiento celular (número de células) es inversamente proporcional a la cantidad de virus utilizado en la infección (MDI), comprobando que la infección genera una notable disminución en la tasa de crecimiento de los cultivos celulares realizados.

El análisis de imágenes de diferentes canales (CC, verde y rojo) del mismo campo, permite clasificar las células de acuerdo a su fenotipo. En este caso, se clasificaron a partir de las imágenes de campo claro a las células muertas, células vivas y células vivas con fenotipo fibroblastoide. Con las imágenes de epifluorescencia se identificaron las células vivas que presentan fluorescencia en alguno de los canales o en ambos.

En la figura 16 es posible observar el efecto de la MDI sobre la cantidad de células fluorescentes en los cultivos. Como se esperaba, se puede apreciar una relación directamente proporcional entre la MDI y la cantidad de células fluorescentes. Dicha fluorescencia para el canal verde es indicativa de expresión de proteína recombinante y

Efecto de la MDI sobre la heterogeneidad poblacional en cultivos de células de insecto

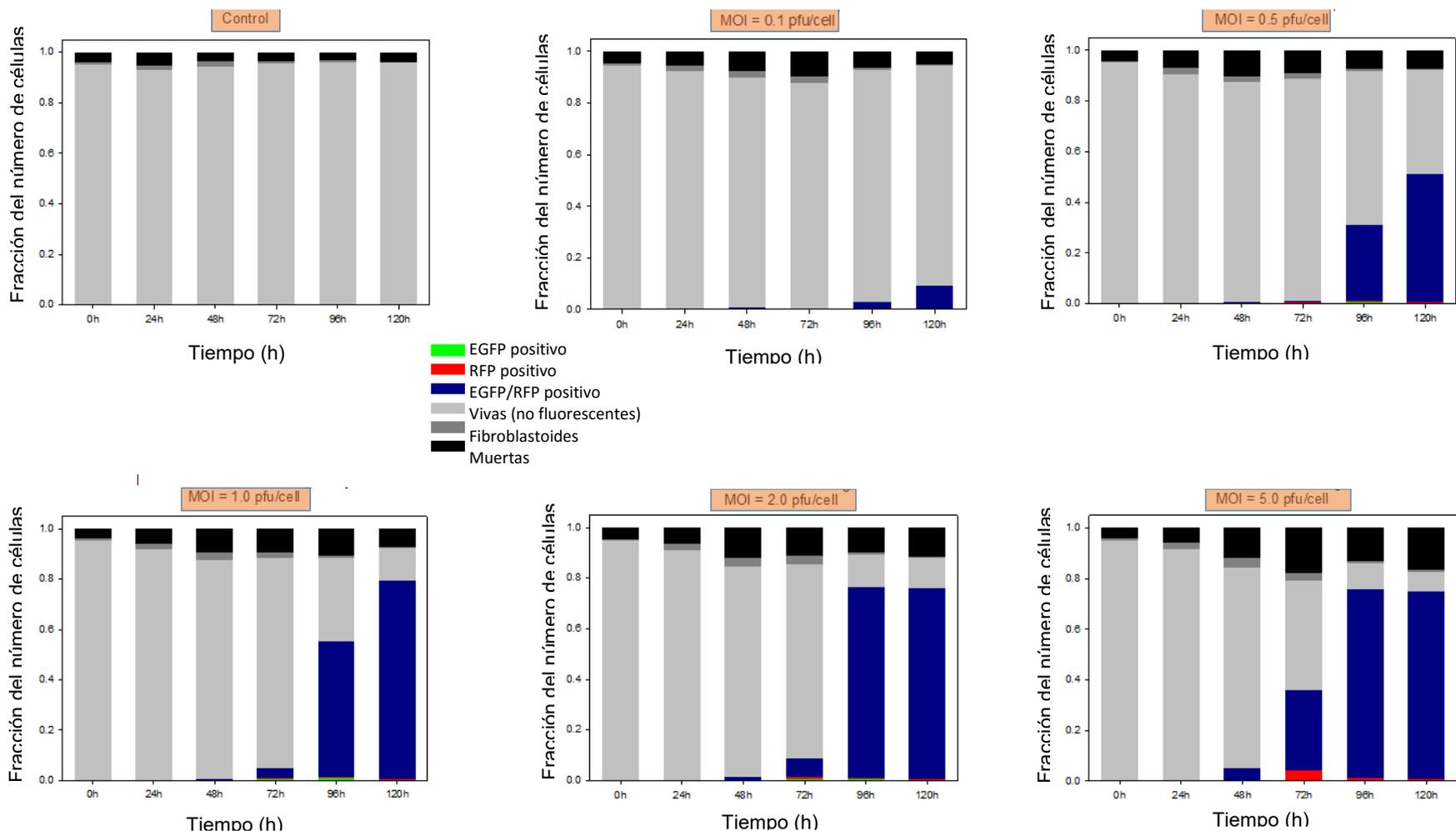


Figura 17. Distribución de las subpoblaciones celulares con respecto al tiempo en los cultivos en pozos a diferentes MDI.

En la figura 17 se observa la distribución de subpoblaciones en los cultivos infectados. El control (cultivo no infectado) muestra 3 poblaciones identificables mediante las imágenes de campo claro: las células muertas, las vivas (redondas) que no son fluorescentes y las células con fenotipo fibroblastoide. Hay un pequeño aumento la cantidad de estas últimas células alrededor de la hora 48 y disminuye a partir de ese momento (también en el caso de los cultivos infectados). Además de ello, el comportamiento de la población en el cultivo infectado es similar al observado para cultivos agitados sin infectar (figura 1).

Para los cultivos infectados, es posible observar células fluorescentes a partir de las 48h. Además del comportamiento cinético ya mencionado a partir de las figuras 15 y 16, es interesante observar que para todas las MDI empleadas, hay una pequeña fracción de la población (no mayor al 10%) de células fluorescentes que expresa solo uno de los dos genes que codifican para proteínas de fusión (fluorescentes). Para el caso de células expresando únicamente RFP, probablemente ocurra que como el promotor de *vp39* se expresa a un tiempo más temprano que el de poliedrina, dichas células aún no estén expresando EGFP-VP3, al menos en una cantidad que sea detectable mediante este sistema. Para las células expresando EGFP pero no RFP, es posible que haya algún paso en la regulación del ciclo infeccioso de baculovirus (transporte de los viriones al núcleo, regulación transcripcional o traduccional) esté favoreciendo que se exprese dicho gen pero no otros genes presentes en el genoma de baculovirus.

Además, es también interesante notar que la fracción de células con fenotipo fibroblastoide no presenta fluorescencia, al menos hasta horas muy tardías del cultivo o en multiplicidades altas (5 ufp/célula) e incluso en esos casos, hay solo una pequeña cantidad de células fluorescentes con este fenotipo. En este estudio utilizamos la fluorescencia como un marcador de la infección viral. Es posible que las células con fenotipo fibroblastoide no expresen los genes virales. Esto podría deberse a que el virus no pueda ingresar a la célula, a que pesar de entrar, no pueda ser transportado hacia el núcleo (el arreglo del citoesqueleto en fibroblastos es diferente al de células redondas) o alguna otra razón que no es posible identificar con certeza con la información disponible en este ensayo.

Finalmente, las multiplicidades de 0.1 y 0.5 ufp/célula presentan una mayor cantidad de células fluorescentes hacia horas tardías del cultivo pero dicho número no es mayor a 10% (0.1 ufp/célula) o a 50% (0.5 ufp/célula). Para las multiplicidades de 1.0, 2.0 y 5.0 ufp/célula, se observa aproximadamente la misma relación de células fluorescente hacia la hora 120

del cultivo, alcanzando esta máxima cantidad a dicha hora para el cultivo de 1.0 ufp/célula y desde la hora 96 para los cultivos con 2.0 y 5.0 ufp/célula.

Es importante notar que a pesar de que la distribución de subpoblaciones celulares para las multiplicidades de 1.0, 2.0 y 5.0 ufp/célula a lo largo del tiempo sea similar, la cantidad de células en cada cultivo es diferente, como se observa en la figura 15.

Cultivos en placa en medio líquido

Una vez que se caracterizaron los cultivos infectados con el baculovirus construido en el laboratorio, se realizaron cultivos en la microcámara de cultivo para determinar las condiciones y configuración del sistema óptimos para caracterizar el efecto de la TOD en cultivos infectados y sin infectar. De las series de imágenes obtenidas para cada caso, se obtuvieron datos cuantitativos como número de células y viabilidad. Cualitativamente, se observó la frecuencia de migración celular, formación de agregados y morfología (Video 1).

Primero, se realizó un cultivo en medio líquido utilizando un objetivo de 40x de contraste de fases. La cinética se muestra en la figura 18a y como ejemplo, una imagen correspondiente (18b).

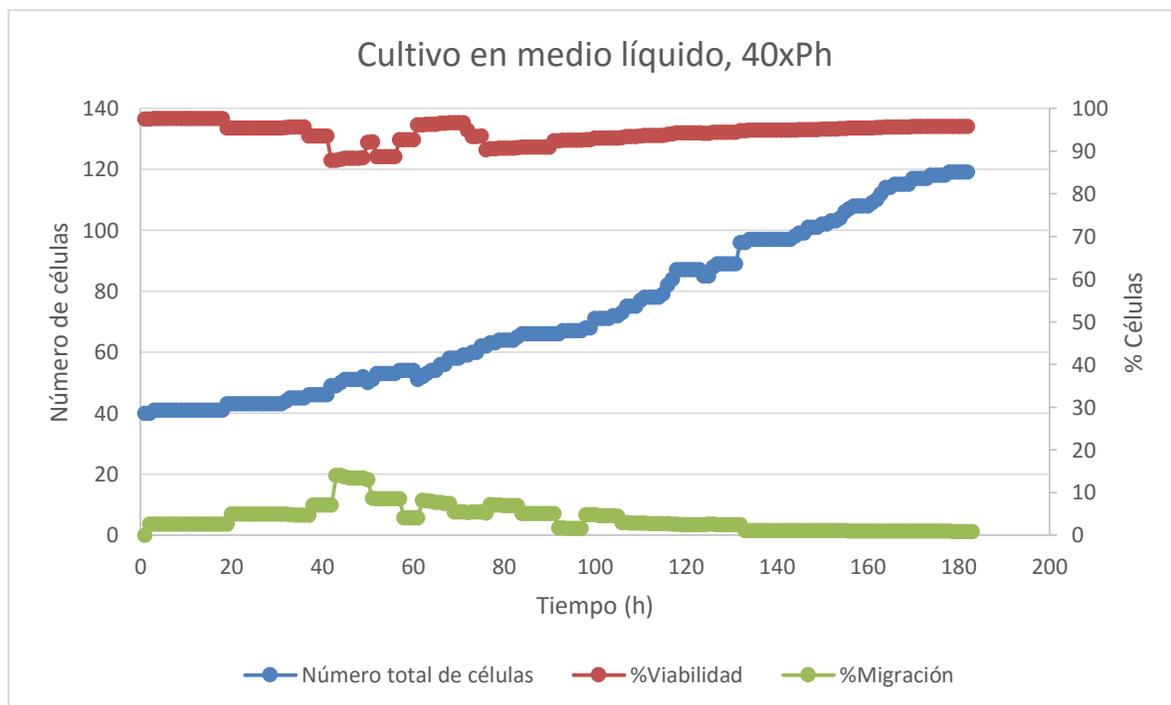


Figura 18a. Cultivo en medio líquido. 40x, Ph.

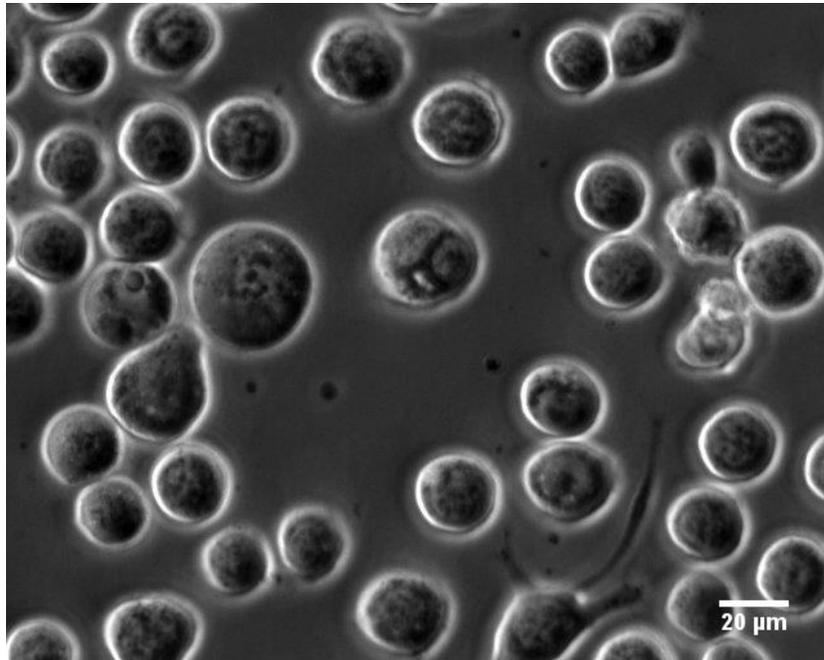


Figura 18b. Cultivo en medio líquido. 40x, Ph.

En la figura 18a es posible observar el comportamiento cinético de este cultivo, el cual fue obtenido al obtener el número de células vivas, muertas y con fenotipo fibroblastoide. Es importante notar que si bien era esperado que las células presentaran cierta movilidad, se observó que las células con fenotipo fibroblastoide en realidad están migrando. Se sabe que los fibroblastos son células que se encuentran en tejidos multicelulares que, de manera individual, emplean diversos mecanismos de locomoción para trasladarse a través de espacios en la matriz extracelular y sobre la superficie de otras células. Sin embargo, para el caso de células de insecto, aunque desde el establecimiento de líneas como la Sf21 y posteriormente Sf9 (Vaughn, 1977) ya se habían observado células de tipo fibroblastoide al ser cultivadas estáticamente, no se han encontrado reportes de que dicha línea celular (y más precisamente, una fracción de su población) presente migración. No está contemplado el estudio de este particular caso de células en este trabajo, pero es importante notar la existencia de este fenómeno para el cual no se han encontrado reportes y que es inherente al cultivo estático de esta línea celular.

Posteriormente se realizaron cultivos con un objetivo de 10x para campo claro. Se pensó inicialmente que así se podría observar un número de células mayor y que si había eventos interesantes, aunque menos frecuentes en los cultivos, habría una probabilidad de poder visualizarlos. Además, al tener una muestra con una n más grande, los datos poblacionales obtenidos estarían mejor representados.

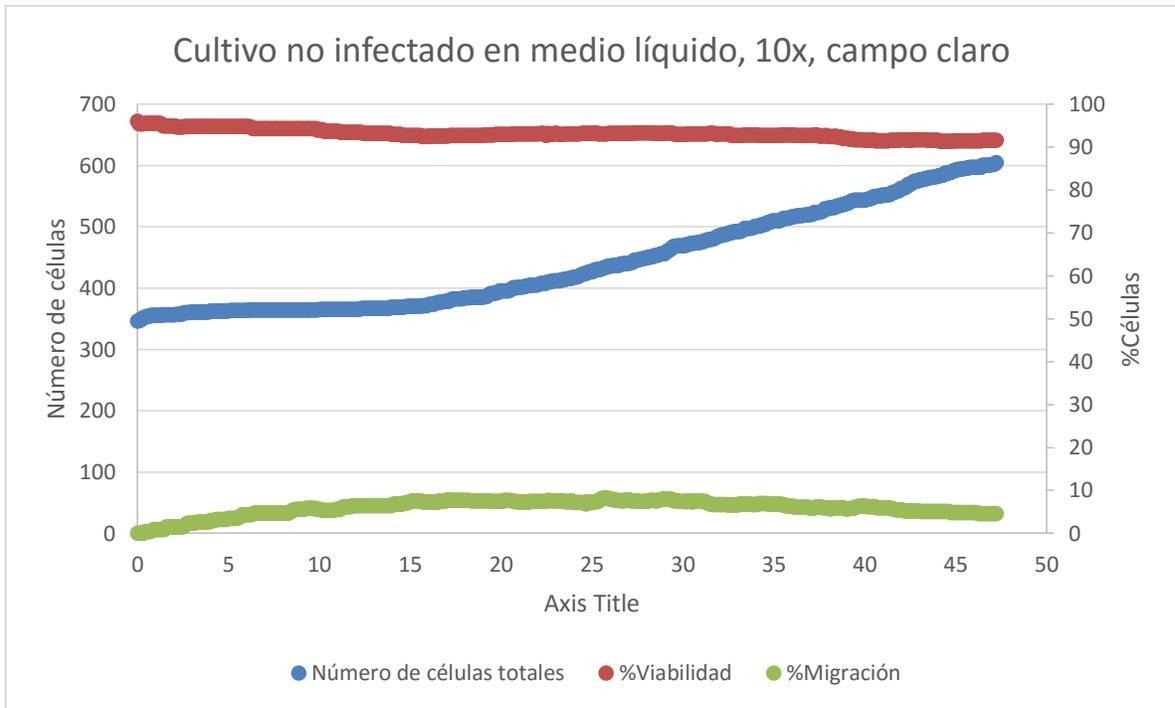


Figura 19a. Cultivo no infectado en medio líquido. Objetivo 10x, campo claro.

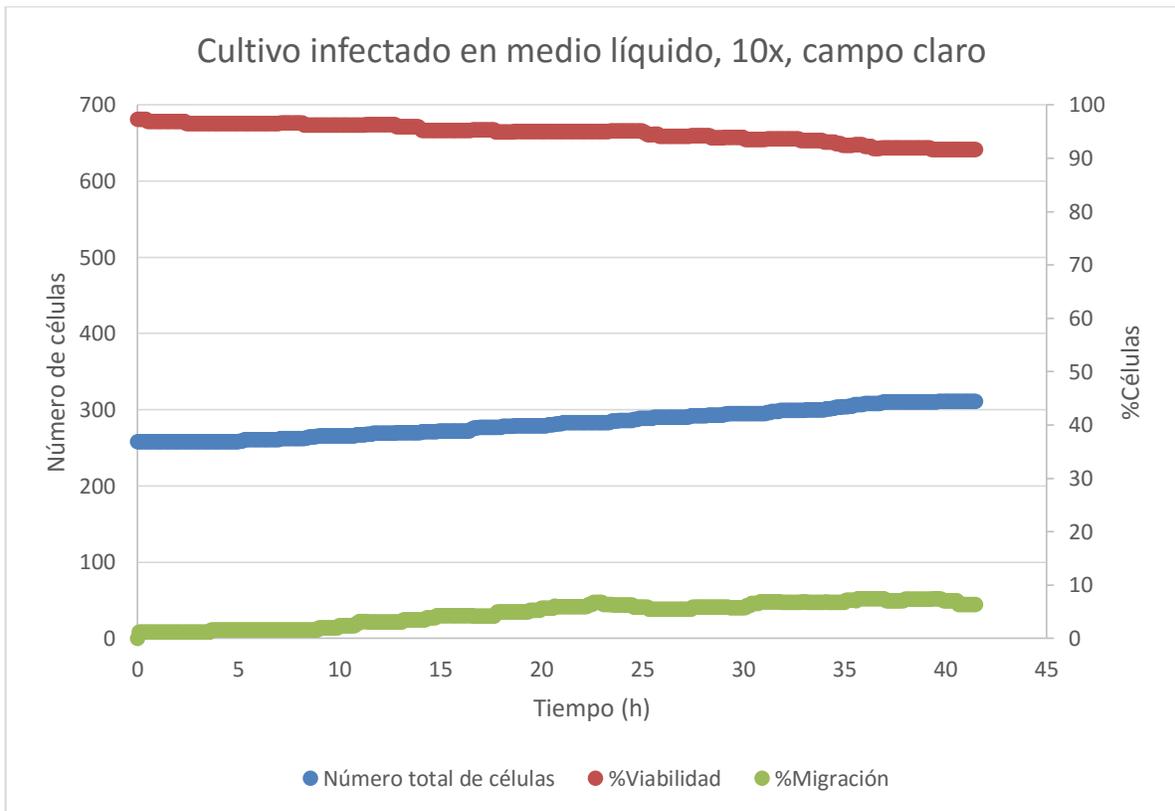


Figura 19b. Cultivo infectado en medio líquido. Objetivo 10x, campo claro.

Los cultivos control infectado (Video 2) y sin infectar (Video 3) se muestran en las figuras 19a y 19b. Como se esperaba, en el cultivo no infectado se observa una cinética de crecimiento típica mientras que en el cultivo infectado el aumento en el número de células es mínimo comparado con el cultivo infectado. El porcentaje máximo de células migrando se alcanza alrededor de las 20 h y comienza a disminuir alrededor de las 33 h. Hasta este punto las dos diferencias más importantes entre los cultivos realizados con el objetivo de contraste de fases y el de campo claro son el número de células que es posible observar y los detalles celulares que se pueden apreciar. Ciertamente, dependiendo del tipo de fenómenos que se quieran estudiar, se optará por uno u otro. En nuestro caso nos interesa poder representar la distribución de subpoblaciones en cultivo, de manera que se optó por utilizar el objetivo de 10x de campo claro, y que ofrece una n_i más grande.

Algo que es posible apreciar en las series de imágenes obtenidas es la saturación del campo visual. A medida que pasa el tiempo, al menos en los cultivos no infectados, la cantidad de células incrementa. El principal problema de esto es que las células comienzan a sobrelaparse y en cierto punto no es posible distinguir entre unas y otras.

Para evitar este problema, se pensó en iniciar con un número inicial de células menor. En las figuras 20a y 20b se muestran cultivos donde se inició con 0.5 veces la cantidad de células inicial que se había utilizado en los cultivos anteriores (0.25×10^6 células)

Fue inesperado observar el comportamiento celular de las series de imágenes con las que se construyeron las gráficas de las figuras 20a y 20b (Video 4). Se colocaron 0.25×10^6 células no infectadas al inicio y, como se había observado en los cultivos anteriores, alrededor de las 25 a 30 horas se alcanzó un máximo de número de células migrando. Sin embargo entre las 30 a 35 horas, se observó una disminución de la viabilidad celular hasta llegar a 0% en alrededor de 8 horas. La muerte de estas células pareciera coordinada.

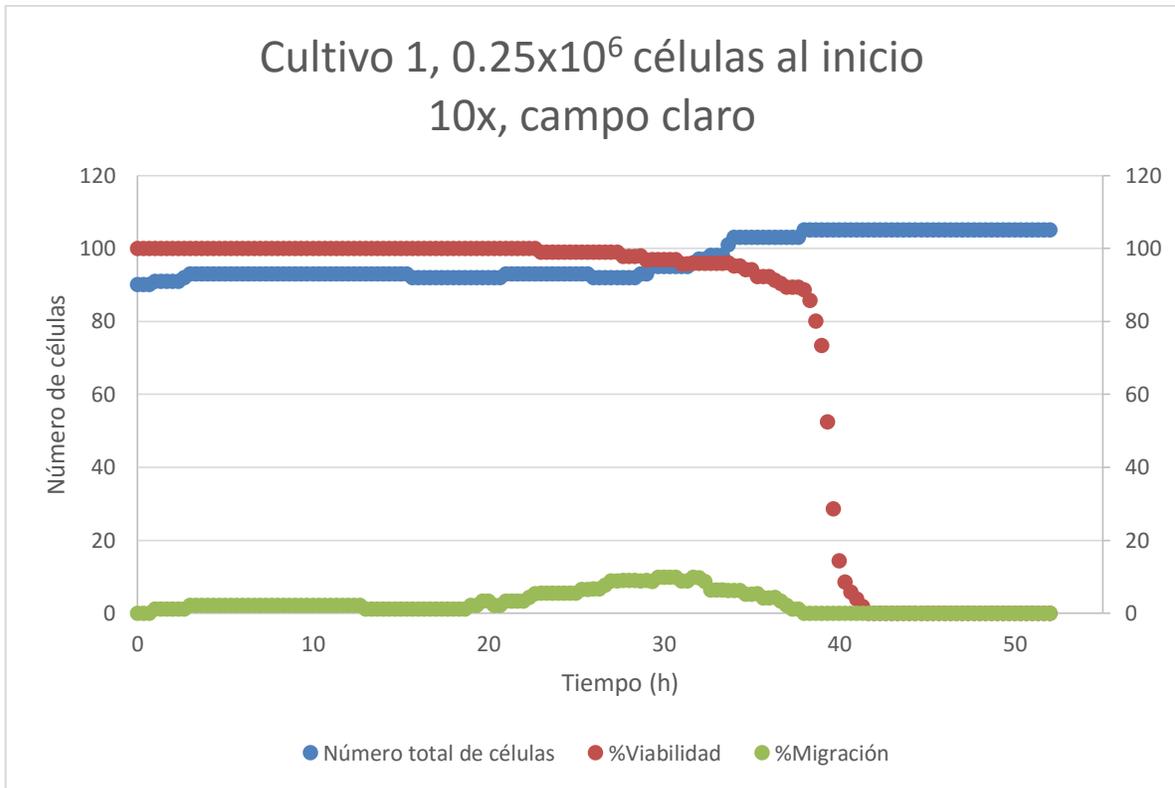


Figura 20a. Cultivo infectado en medio líquido. Objetivo 10x, campo claro.

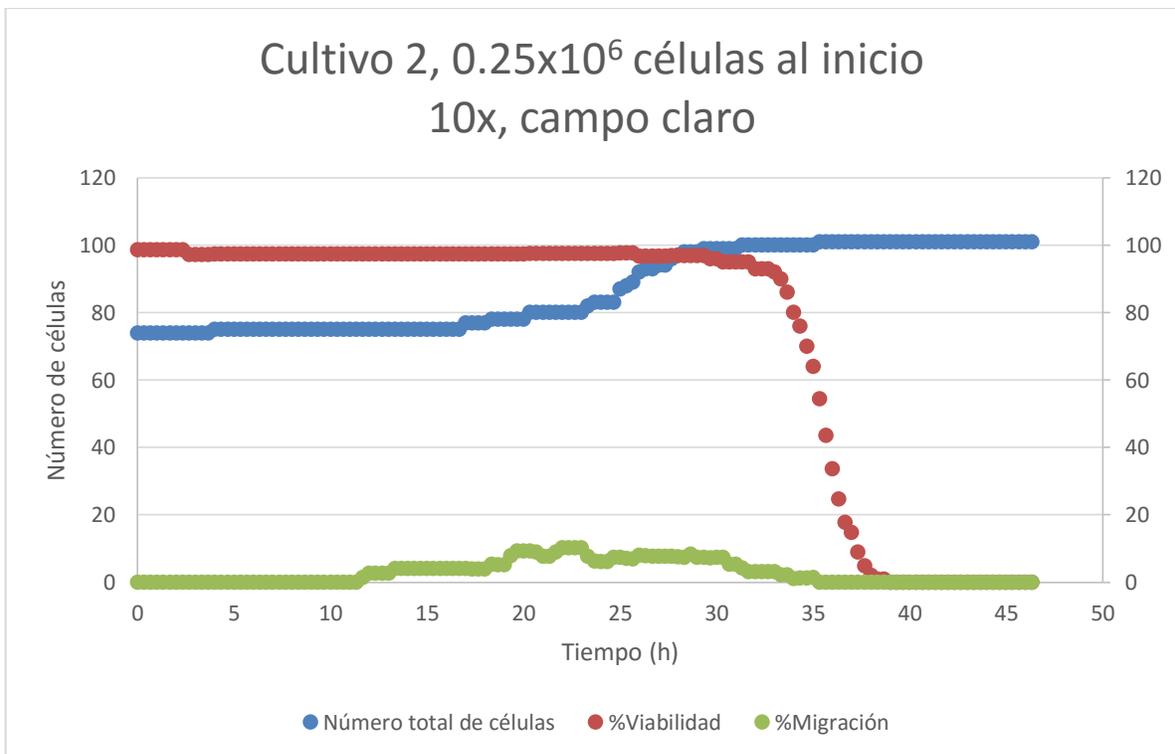


Figura 20b. Cultivo infectado en medio líquido. Objetivo 10x, campo claro.

Se sabe que este tipo de células requiere cierta concentración factores celulares para crecer. Posiblemente la baja concentración celular al inicio no fue suficiente para alcanzar una concentración suficiente de esos factores, por lo que las células mueren rápidamente, por lo tanto se decidió no disminuir la cantidad de células inicial. No es parte el objetivo de este trabajo explicar todos los fenómenos observados. Tal tarea requeriría mucho tiempo, sin embargo, sí es importante señalar que se cuenta ahora con antecedentes que pudieran ser interesantes de estudiar en un futuro.

Como prueba de concepto, también se cultivaron células iniciando con el doble de células que se habían planteado inicialmente.

En la figura 21a se observa se observa el comportamiento típico de un cultivo no infectado. El problema en este caso fue que el campo visual se saturó alrededor de las 70 horas por lo que no era posible discernir entre célula y célula (figura 21b). Además, en dicho cultivo las células comenzaron a aglomerarse, impidiendo un análisis de células individuales. Los datos para la cantidad de células migrando solo están disponibles a partir de alrededor de las 20 horas ya que en este cultivo, el microscopio se desenfocó.

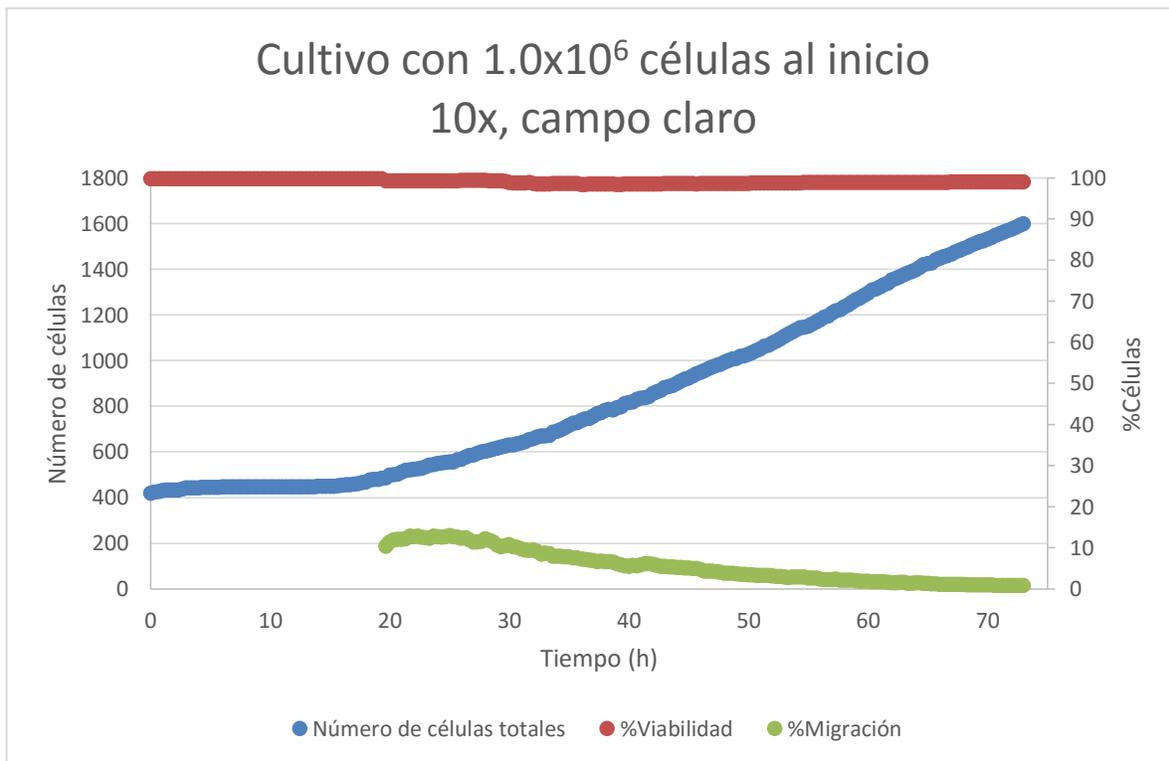


Figura 21a. Cultivo con 2.0x la cantidad inicial de células

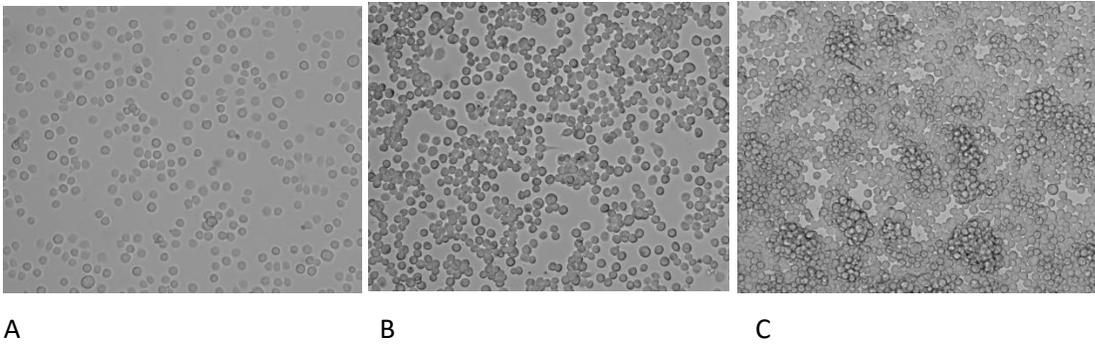


Figura 21b. Cultivo con 2.0x la cantidad inicial de células. A, 0h, B, alrededor de las 40h. C, alrededor de las 73h.

En consecuencia se decidió empezar los cultivos con medio millón de células y utilizar el objetivo de 10x.

Cultivos en medio semisólido

Inicialmente, los cultivos en medio semisólido se habían realizado para tratar de mantener a las células en posiciones fijas, evitar que migraran fuera del campo y poder visualizarlas durante todo el cultivo, facilitando su observación. No se continuaron estos cultivos ya que no fueron adecuados para cumplir con los objetivos de este trabajo.

En las figuras 22a y 22 b se observa el comportamiento cinético de los cultivos en medio semisólido. Lo observado en las series de imágenes (Video 5) sin duda es muy informativo y, según nuestro conocimiento, no existen estudios de células de insecto vivas cultivadas bajo estas condiciones. La agarosa de bajo punto de fusión, es utilizada típicamente en técnicas de plaqueo de baculovirus.

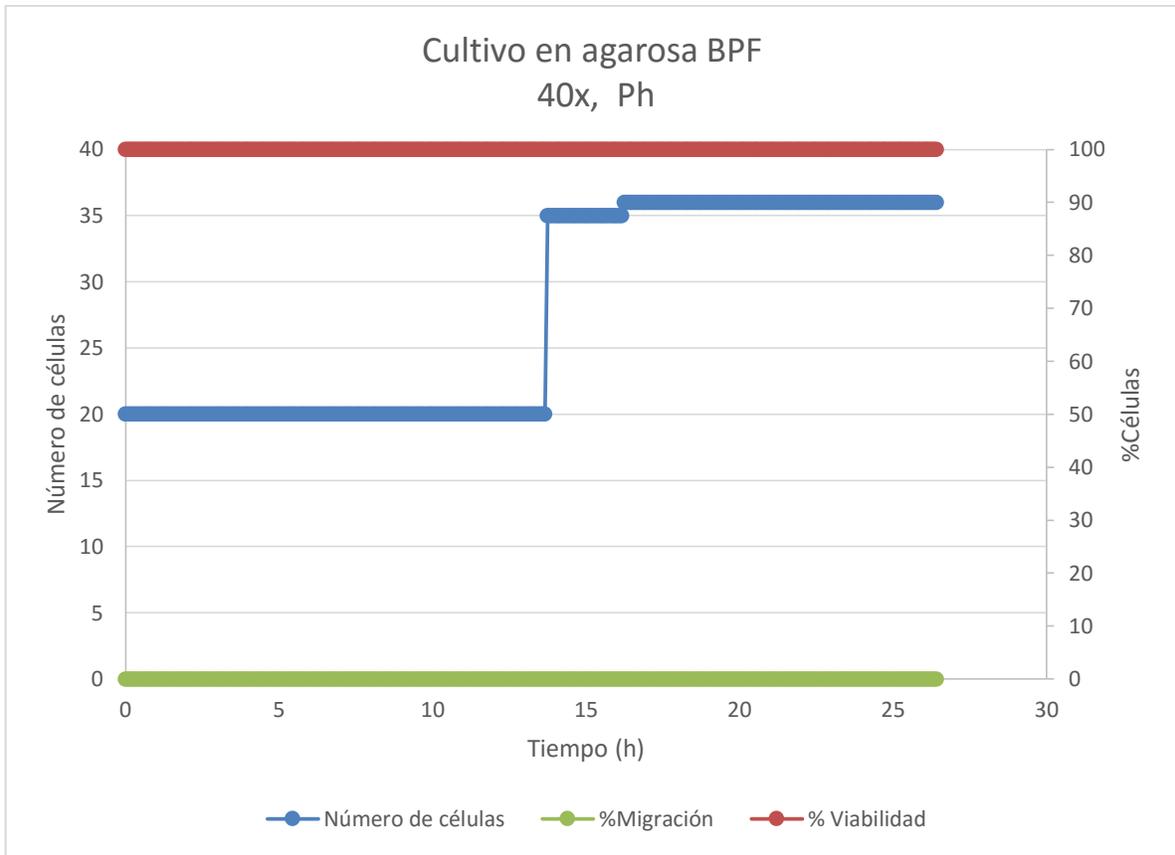


Figura 22a. Cultivo en medio semisólido. 40x, contraste de fase.

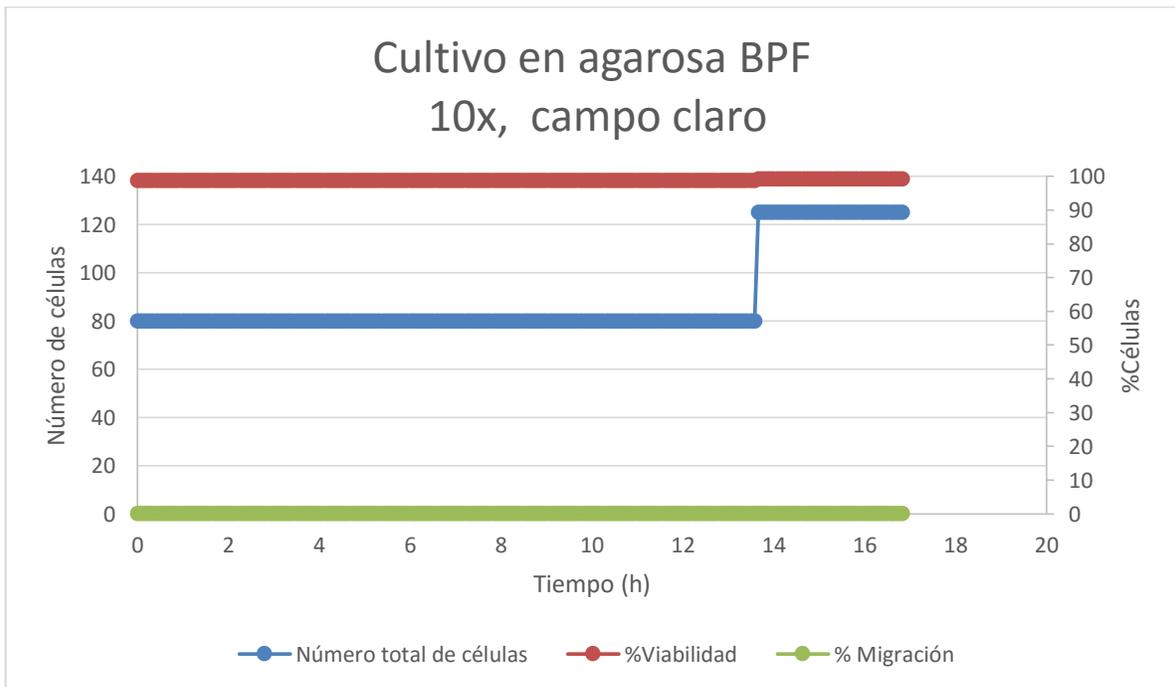


Figura 22b. Cultivo en medio semisólido. 10x, Campo claro.

De acuerdo a las series de imágenes, las células que se colocan al inicio, que tienen forma redonda, se aplanan sincronizadamente, dificultando su segmentación en el análisis de imágenes (figuras 23 y 24). De manera interesante, las células hijas de esta generación, son todas redondas, aunque no se observa que se dupliquen posteriormente.

El otro inconveniente es que a medida que pasa el tiempo, la agarosa de bajo punto de fusión comienza a deshidratarse y por lo tanto encogerse, por lo que el campo visual ya no enfoca a las células que inicialmente se observaban, imposibilitando la extracción de parámetros cinéticos y cualitativos del cultivo. Claramente existe una enorme plasticidad celular y resulta interesante observar este tipo de comportamiento. No se continuaron este tipo de experimentos ya que no cumplen con los objetivos de este trabajo.

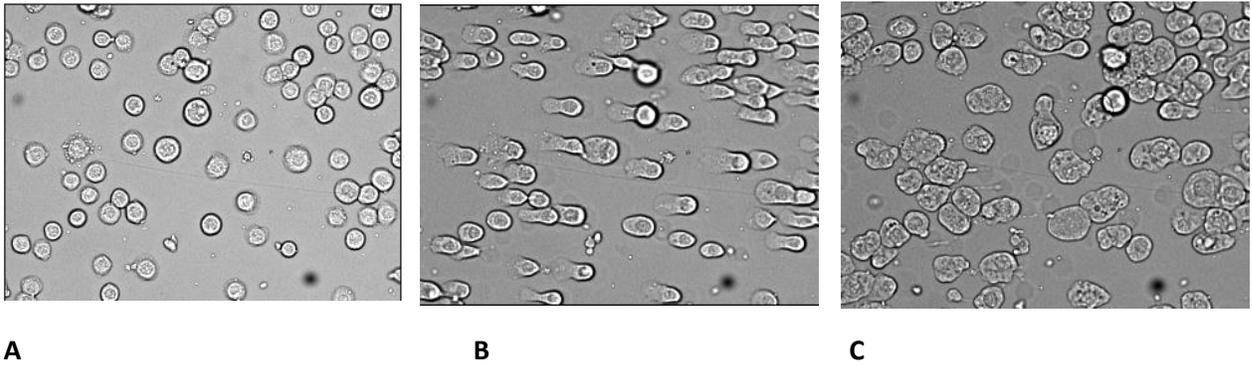
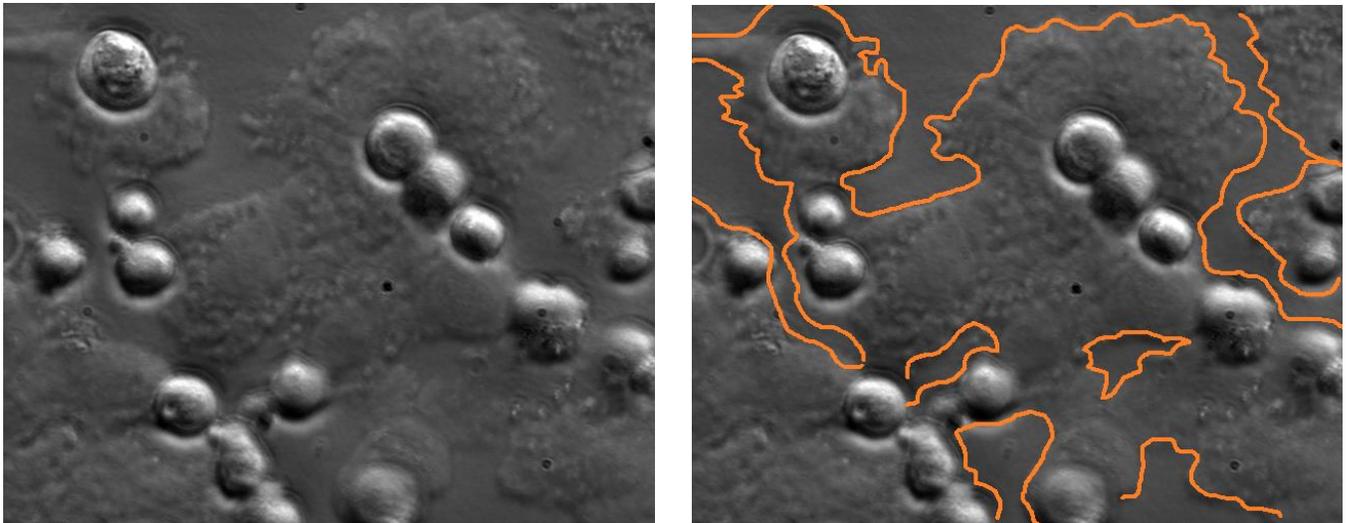


Figura 23. *Morfología que adoptan las células cultivadas en agarosa de bajo punto de fusión. A, al inicio. B, empiezan a adoptar una forma plana. C, forma completamente aplanada.*



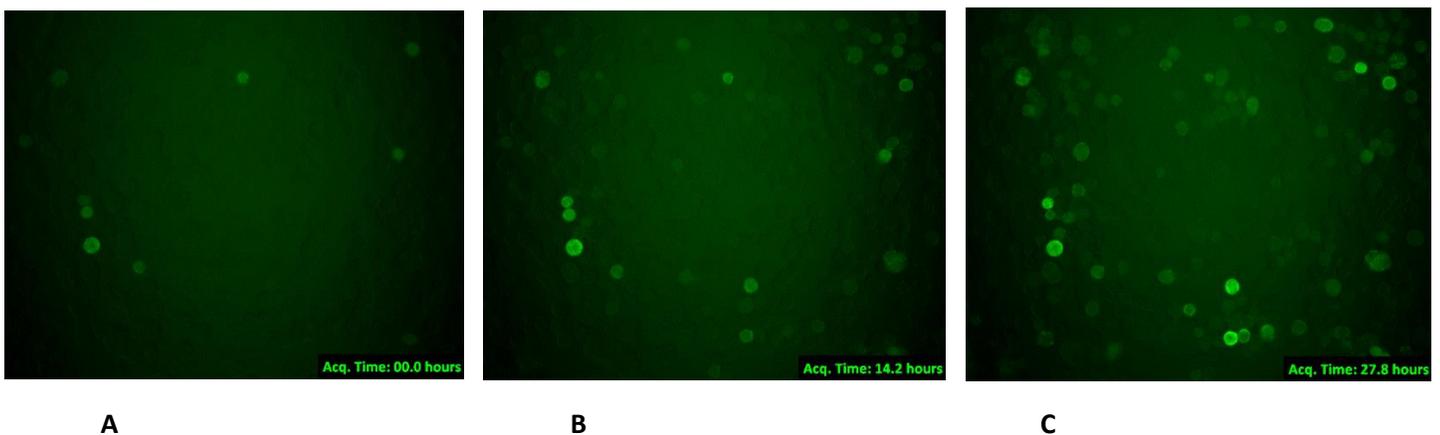
A

B

Figura 24. Imágenes de contraste fases para un cultivo en medio semisólido. A, Todas las células redondas son descendientes de las células colocadas inicialmente. B, Se marca en color anaranjado el contorno de las células aplanadas, que son las que inicialmente se colocaron en el cultivo.

Curso temporal de la intensidad de fluorescencia para cultivos infectados

Se monitoreó la aparición y el curso temporal de fluorescencia (figura 25) en un cultivo infectado. Primero se observó cuántas células presentaban infección como función del tiempo (figura 26). Posteriormente se seleccionaron 10 células fluorescentes al azar (figura 27) y se monitoreó el cambio en la intensidad de esos píxeles. Esto se realizó de manera manual para toda la serie de imágenes (Video 6) y los datos posteriormente fueron normalizados con respecto a la intensidad de los píxeles del fondo.



A

B

C

Figura 25. Imágenes de epifluorescencia de un cultivo infectado con un baculovirus recombinante a MDI de 1.0 ufp/célula. La fluorescencia está dada por EGFP fusionada a VP2 de rotavirus. A, B y C representan diferentes horas del cultivo.

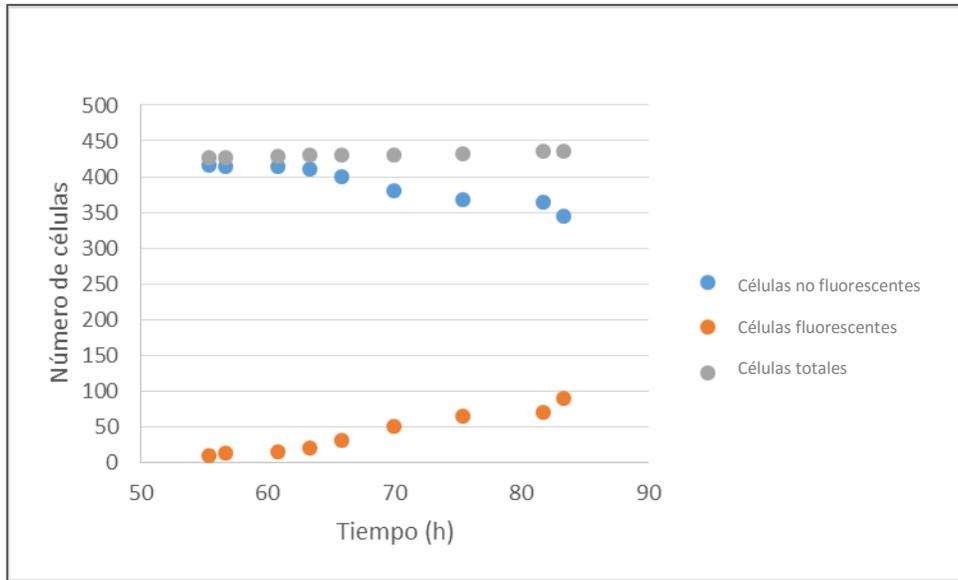


Figura 26. Gráfica comparando el número total de células, células no fluoresciendo y el número de células expresando EGFP.

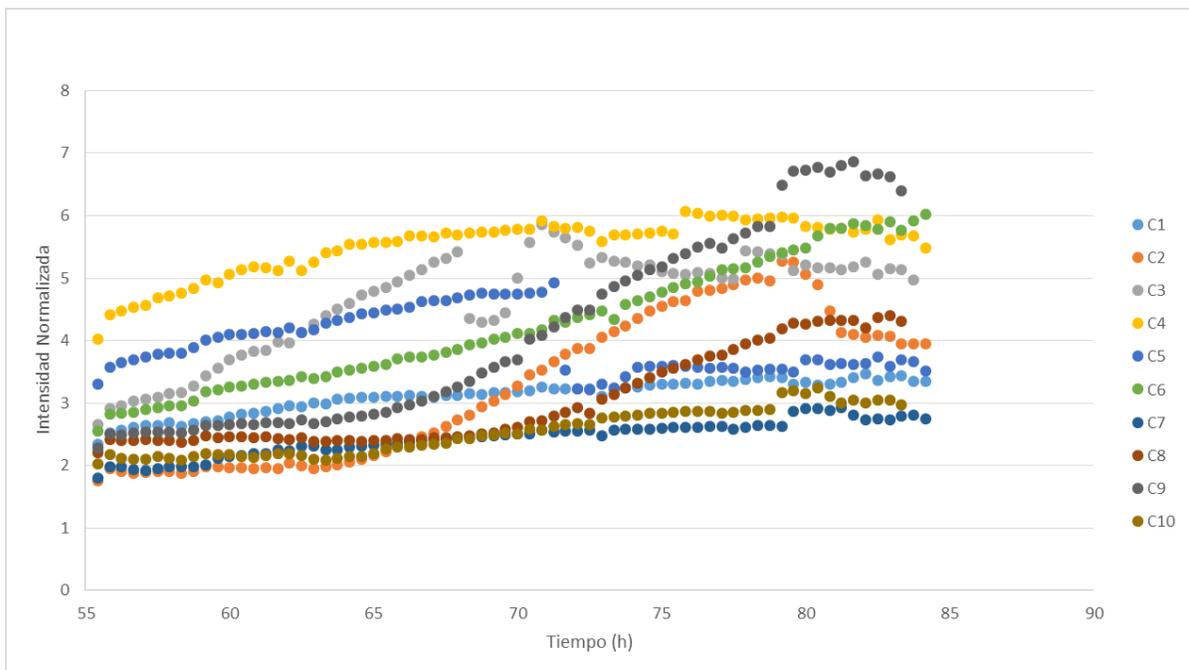


Figura 27. Intensidades normalizadas de fluorescencia en 10 células fluorescentes seleccionadas al azar (C1-C10).

De esta manera, fue posible determinar no sólo la aparición de fluorescencia (la cual es indicativa de producción de proteína recombinante, que es uno de los objetivos del proyecto), sino su curso temporal. En la figura 27 es posible ver que eventualmente la intensidad deja de aumentar y que los pixeles no están saturados, por lo que es posible

decir que la producción de proteína recombinante llega a un límite. El conocer esto, aunado al tiempo en el cual ocurre en el cultivo, es un parámetro muy importante para caracterizar un cultivo infectado. Si bien los datos de número de células de cada fenotipo de interés fue obtenido, un muestreo de la intensidad de fluorescencia como el presentado arriba requirió el cambio manual de los filtros para fluorescencia cada 0.5h. En cultivos de 120h no es posible esa frecuencia de muestreo. En el laboratorio se cuenta con equipo para poder hacer este tipo de estudios de manera automática (computarizada), sin embargo no existe un software que tenga los protocolos necesarios para llevarlos a cabo. De obtenerlo, en un futuro sería interesante realizar experimentos donde se estudie la temporalidad de diferentes fenómenos que se han observado con el carácter masivo que el uso de un equipo automatizado puede ofrecer.

Cultivos con baja tensión de oxígeno disuelto (TOD)

Una vez determinados parámetros como la cantidad inicial de células a utilizar, la configuración óptica y ya habiendo adquirido un sensor fluorescente de oxígeno disuelto (Fibox 3, PreSens) que fuera capaz de implementarse en el sistema de cultivo, se realizaron cultivos infectados y no infectados a diferentes TOD.

Primero, se comparó la respuesta del parche fluorescente que se utilizará en el microsistema de cultivo con un electrodo polarizado de oxígeno.

En la figura 28 se muestra la señal obtenida con el electrodo y con el parche fluorescente para medir oxígeno. Para realizar este ensayo se colocaron ambos dispositivos en un matraz Erlenmeyer de 250mL burbujeadado con aire. Después de que la señal del electrodo polarizado de oxígeno se estabilizara, se calibró como el 100% de TOD con respecto al aire. Posteriormente se burbujeo el sistema con nitrógeno y cuando la señal del electrodo polarizado se mantuvo estable, se consideró ese punto como 0% de TOD. Se calibró el parche fluorescente de acuerdo a las instrucciones del manual: utilizando el valor de “fase” que mostró el software de este sensor de oxígeno (que es un valor dependiente del voltaje generado por la intensidad de luz proveniente del parche) en los puntos donde según el electrodo polarizado de oxígeno, había un 100% y un 0% de oxígeno disuelto. Con la señal ya convertida a TOD se pudo construir la gráfica de la figura 28.

En dicha gráfica es posible observar que el parche sí responde a cambios en la TOD y particularmente, lo hace más rápido que el electrodo polarizado.

Posteriormente se probó el parche en el microsistema de cultivo.

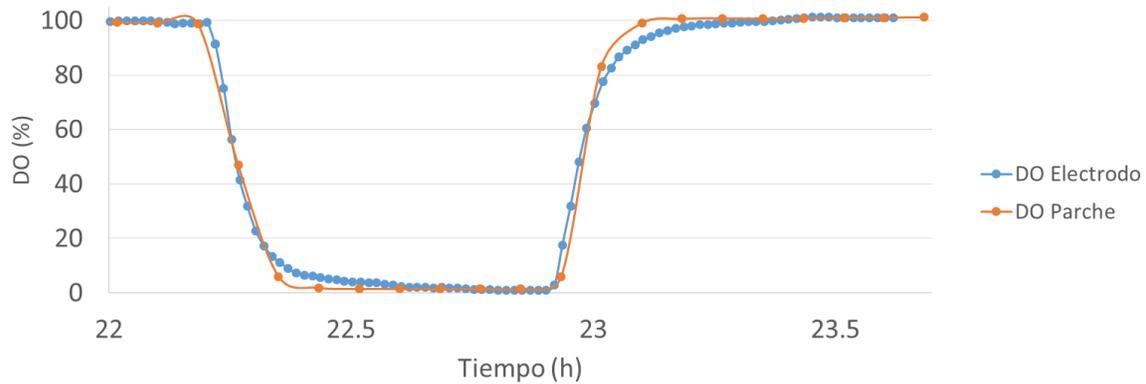


Figura 28. Comparación del parche fluorescente con el electrodo polarizado de oxígeno. En un matraz Erlenmeyer de 250mL se colocaron 170 mL de agua con el electrodo polarizado de oxígeno y el parche fluorescente. Se burbujeó aire y una vez estabilizada la señal se inyectó nitrógeno. Una vez estabilizada la señal se volvió a inyectar aire.

En la figura 29 se observa el cambio escalón realizado en el micro sistema de cultivo a las condiciones que se llevarían a cabo el resto de los experimentos. Se inyectó aire o nitrógeno al sistema a través de una manguera conectada a una torre de control (New Brunswick). Como se observa, el parche respondió a los cambios en la TOD con respecto al aire. Los pequeños picos que se observan entre las 40 y 50 horas corresponden al cambio en la TOD que ocurre cuando se levanta la tapa de la microcámara de cultivo. Esto debe hacerse cada 1 o 2 días para rellenar el baño de la microcámara con agua y así evitar que el medio de cultivo se evapore.

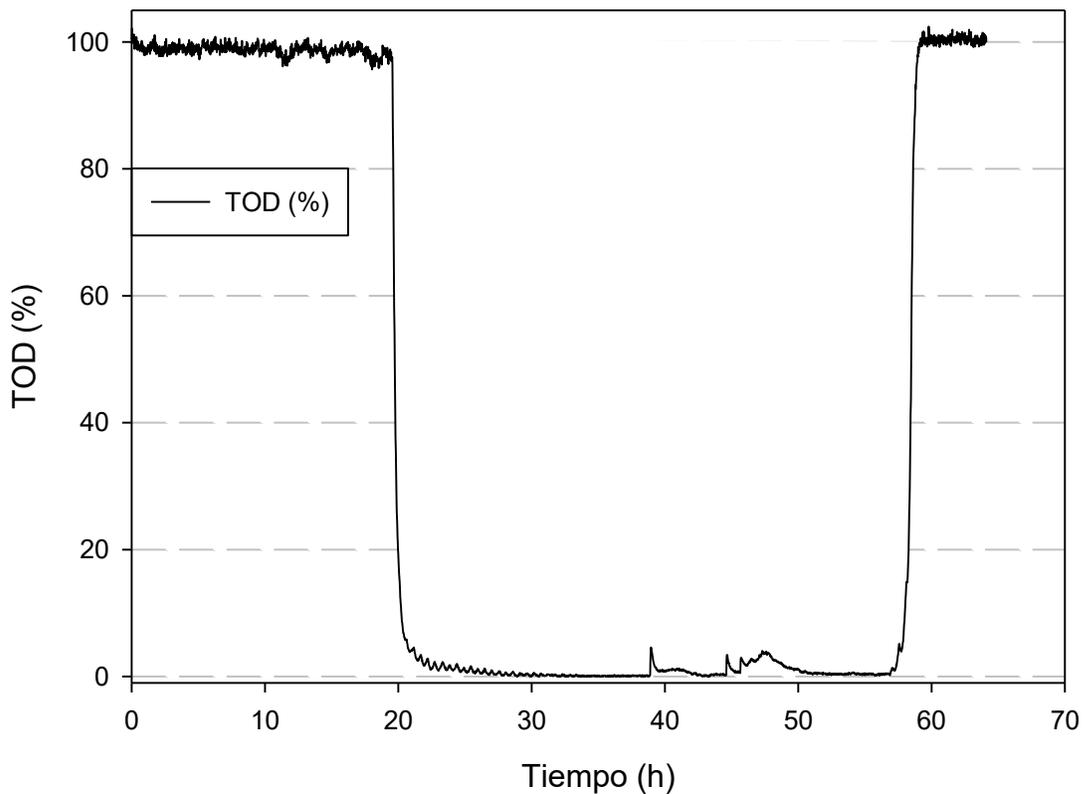


Figura 29. Cambio escalón realizado en el microsistema de cultivo midiendo la TOD con el parche fluorescente. Se inyectó aire al sistema de cultivo y una vez estabilizada la señal, se inyectó nitrógeno. Cuando la señal se mantuvo estable se volvió a inyectar aire.

Una vez que se comprobó que el sistema era capaz de monitorear la TOD, se realizaron cultivos infectados y no infectados a diferente TOD.

En la figura 30a se muestran los cultivos no infectados realizados a 100%, 50% y 0% de TOD con respecto al aire. La viabilidad celular para las 3 condiciones se mantuvo similar a lo largo de todo el cultivo. No hubo diferencia en la velocidad máxima de crecimiento a 100% o a 50% de TOD. No se observó crecimiento a 0% de TOD.

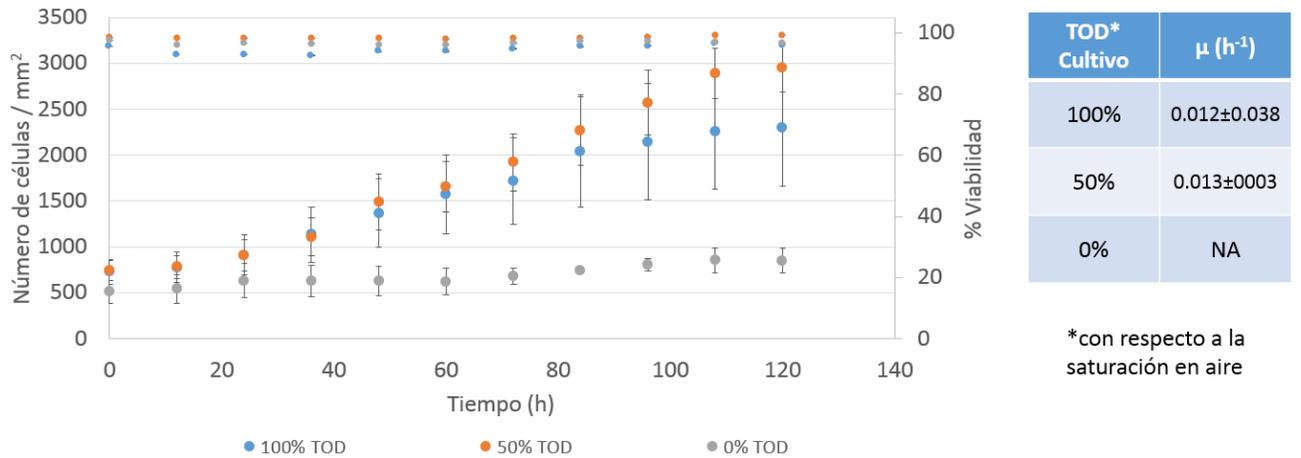


Figura 30a. Cultivos no infectados a diferentes TOD y su velocidad específica de crecimiento

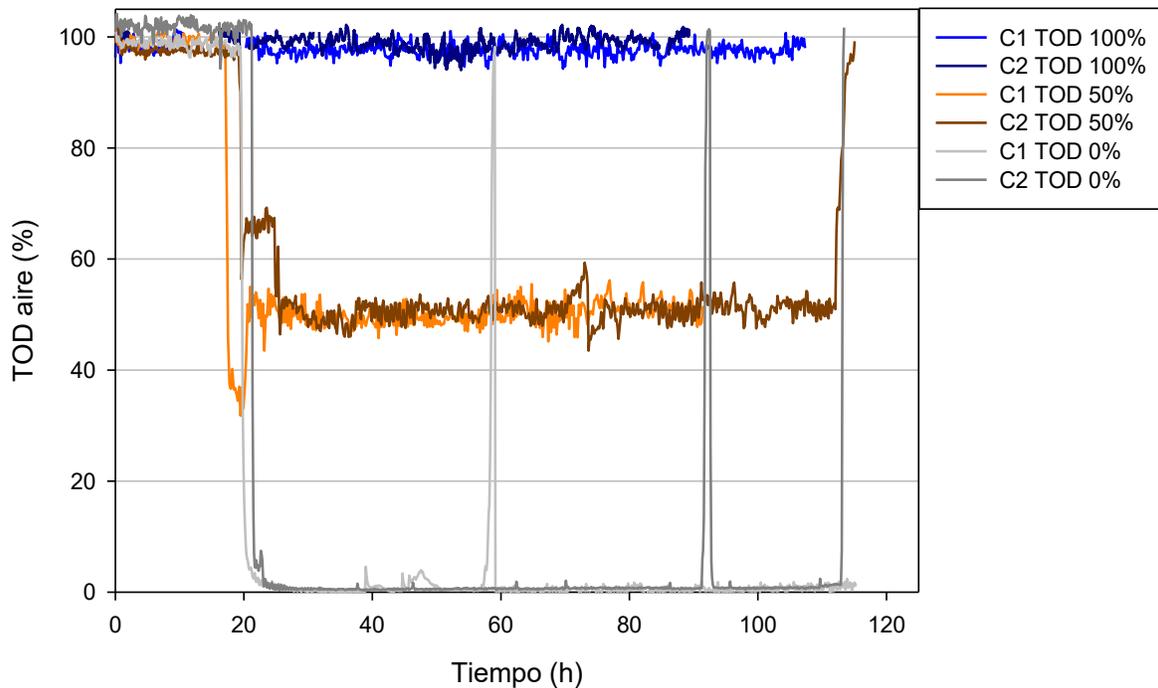


Figura 30b. Valores de TOD con respecto al aire en cultivos no infectados. C1 y C2 indican cada una de las dos repeticiones para cada condición.

Los valores de TOD a lo largo de los cultivos se muestran en la figura 30b. Como en el caso de la figura 29, los picos pequeños en la señal de TOD se deben al levantamiento de la tapa del microsistema de cultivo para rellenar el baño del cultivo con agua. Particularmente, en el caso de los cultivos a 0%TOD, los picos que alcanzan un valor alrededor de 100% de TOD se deben al cambio de tanque de nitrógeno realizado mientras el cultivo se llevaba a

cabo. Hacia el final de estos cultivos, se dejó de inyectar nitrógeno o la mezcla correspondiente de gases (50% aire y 50% nitrógeno) para verificar que el parche siguiera siendo sensible a cambios en la TOD.

En cuanto a las series de imágenes, se observa un comportamiento típico para los cultivos a 100% y 50% de TOD (Video 7), sin embargo, para el cultivo a 0% de TOD (Video 8) las células muestran un mayor porcentaje de migración con respecto a las demás condiciones, tal como se puede observar en la figura 30c.

Efecto de TOD sobre el número de células con fenotipo fibroblastoide Cultivos No Infectados

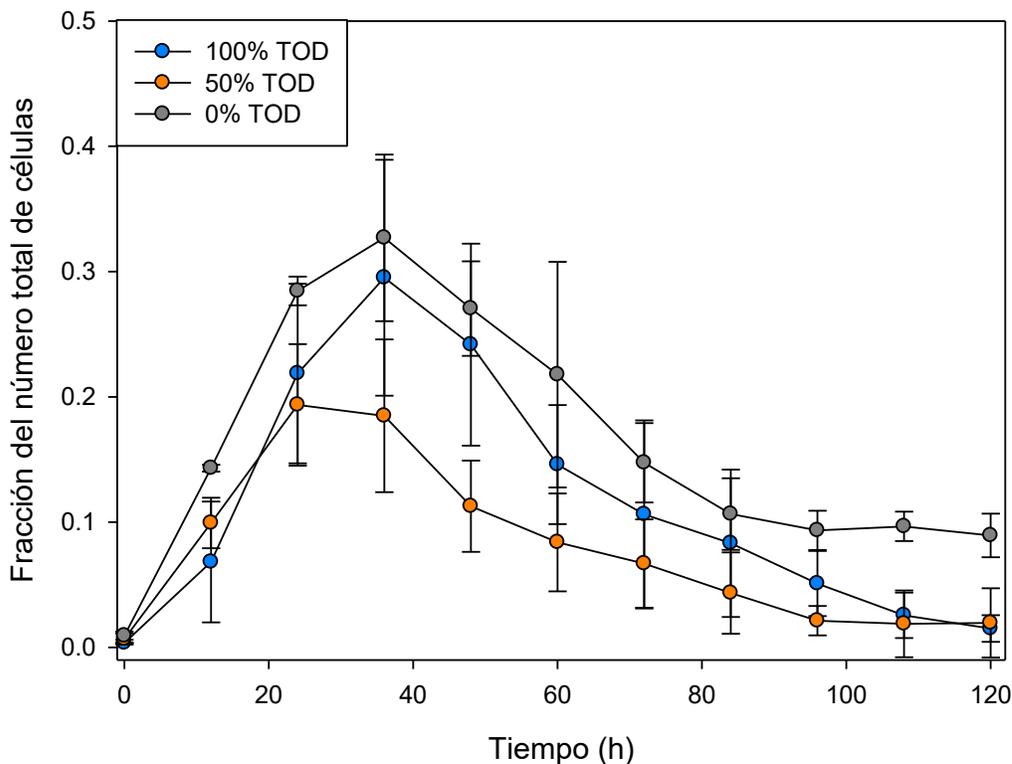
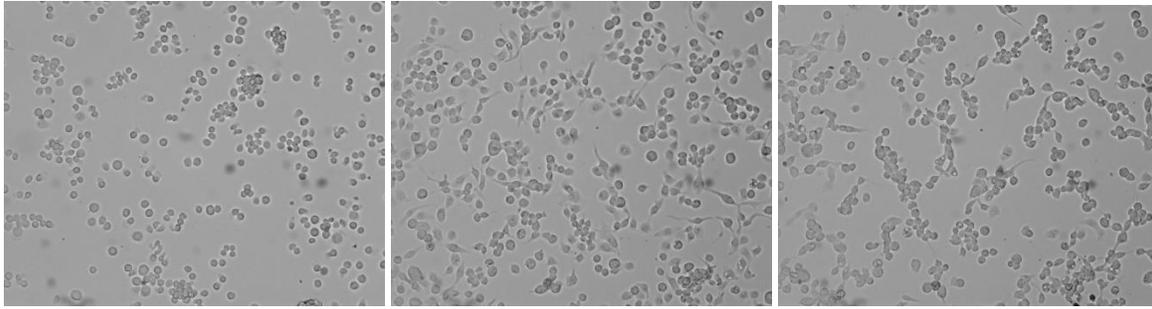


Figura 30c. Fracción del número de células con fenotipo fibroblastoide a diferentes TOD en cultivos no infectados.

En la figura 30c es posible observar una mayor cantidad de células fibroblastoideas en el cultivo a 0% de TOD. Dicho comportamiento probablemente pueda deberse a una respuesta celular ocasionada por el estrés de limitación de oxígeno disuelto. Las células que no tienen fenotipo fibroblastoide tendieron a agregarse y a cambiar su morfología de redonda a agregada (figura 31 C).



A

B

C

Figura 31. Cultivo no infectado a 0% de TOD. A, 0h. B, 60h. C, 120h

Posteriormente se realizaron los cultivos infectados a diferente TOD Solo se realizaron a 100% y 0% de TOD con respecto al aire.

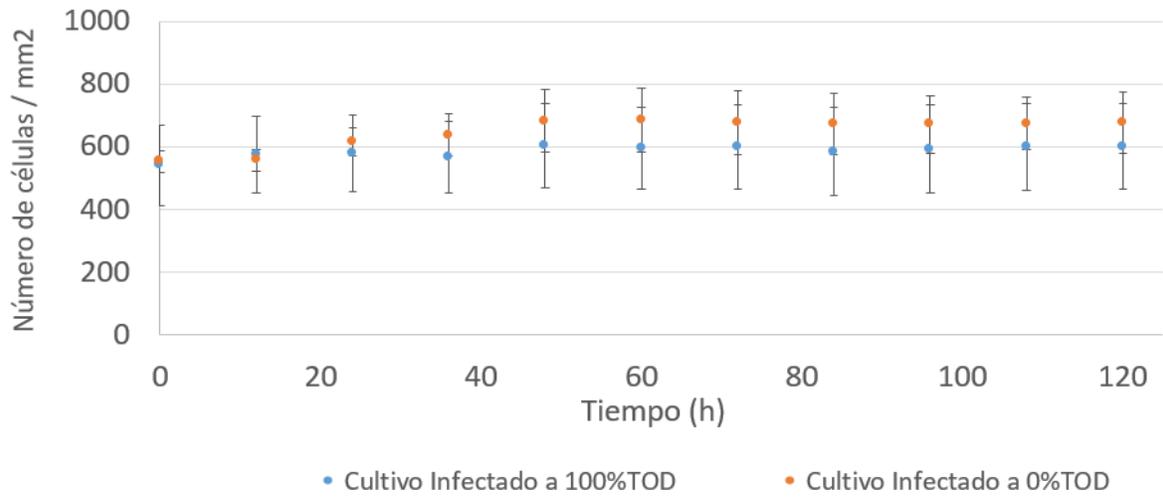


Figura 32a. Cinéticas de crecimiento de cultivos infectados a 100% y 0% de TOD.

*Con respecto al aire.

TOD aire para cultivos infectados

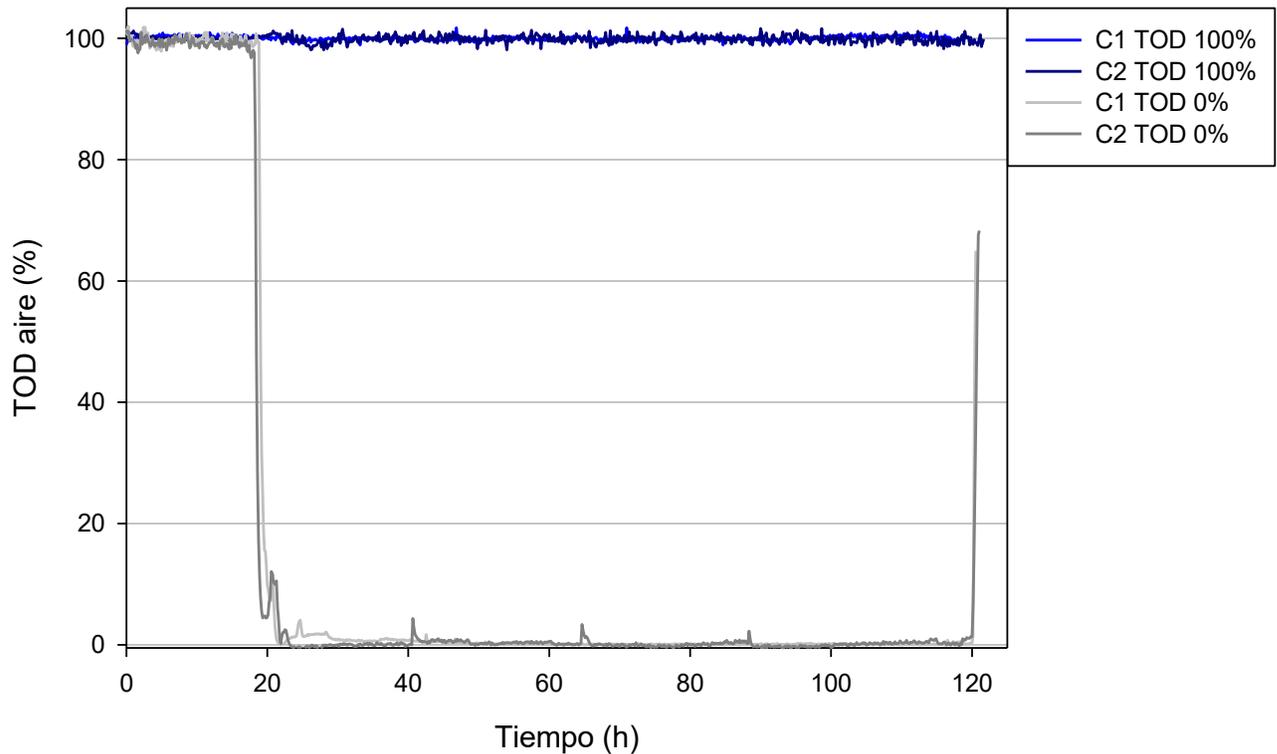


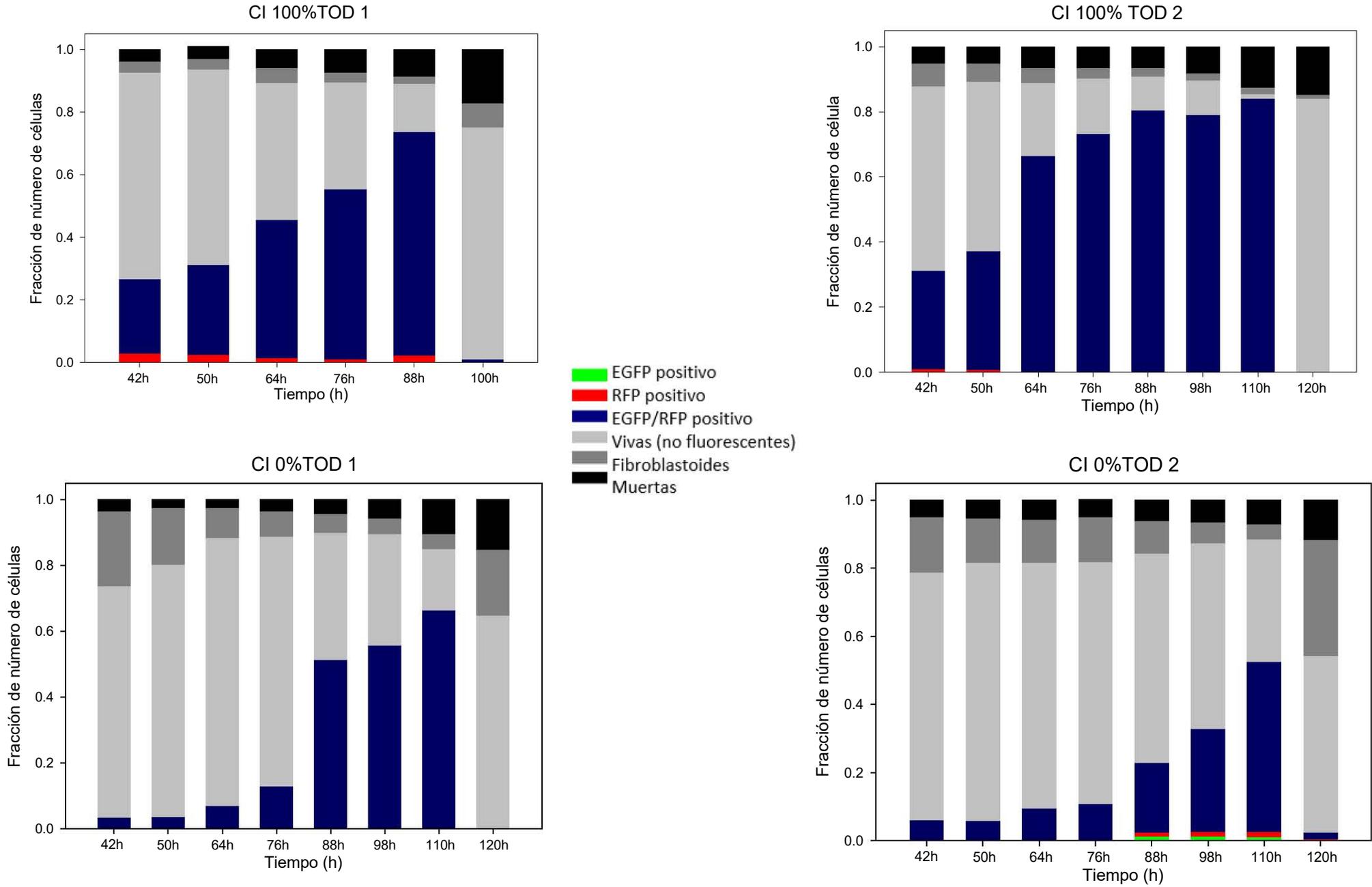
Figura 32b. Cinéticas de crecimiento de cultivos infectados a 100% y 0% de TOD. C1 y C2 indican cada una de las dos repeticiones para cada condición.

En la figura 32a se muestra el comportamiento de los cultivos infectados (MDI = 1.0 ufp/célula) a 100% y 0% de TOD. A diferencia de los cultivos no infectados, en ambas condiciones, los cultivos infectados se comportaron de la misma forma con respecto a la cantidad total de células. Evidentemente no es posible calcular una velocidad específica de crecimiento.

En la figura 32b se muestran los valores de TOD para ambas condiciones. Como se mencionó arriba, los pequeños picos generados indican que se levantó la tapa. El incremento en la TOD hacia el final de los cultivos se debe a que se dejó de inyectar nitrógeno al sistema para ver si el parche seguía siendo sensible hacia cambios en la TOD.

En los cultivos infectados, fue posible observar mediante el análisis de imágenes de fluorescencia y de campo claro, las diferentes subpoblaciones celulares, tal como se hizo en los ensayos en placa para determinar el efecto de la MDI.

Figura 32C. Subpoblaciones celulares en los cultivos infectados a diferentes TOD.



En la figura 32C se pueden observar la distribución de las diferentes subpoblaciones celulares en los cultivos infectados a diferentes TOD.

En los cultivos infectados a 100% de TOD, se observó que la cantidad máxima de células infectadas fue de alrededor del 80%. Eso coincide con lo observado en el ensayo mencionado arriba. La cantidad de células expresando solo una de las dos proteínas fluorescentes fue mayor para RFP que para EFGP, sin embargo, esta pequeña subpoblación sigue sin ser mayor al 10% y parece disminuir conforme avanza el cultivo. La cantidad de células fibroblastoides se asemeja a la observada anteriormente y, de la misma manera, parece no presentar fluorescencia o al menos no es detectable con esta metodología.

En cuanto a los cultivos a 0% de TOD, a pesar de haber sido infectados a la misma multiplicidad que los cultivos a 100% de TOD (MOI = 1.0 ufp/célula) la cantidad máxima de células fluorescentes fue de alrededor del 60%, es decir, aproximadamente 20% menos, y es alcanzada alrededor de las 110h. Es posible apreciar una pequeña población expresando solo 1 de las dos proteínas fluorescentes pero al igual que los cultivos anteriores, no es mayor al 10%.

En cuanto a las células Fibroblastoides, es posible observa un ligero incremento de su número con respecto a los cultivos a 100% de TOD. Como se vio anteriormente estas células parecen no presentar fluorescencia (por ejemplo se lograron observar solo 3 células aparentemente fibroblastoides y fluoresciendo en el cultivo 2 a 0% de TOD) pero en general, como se mencionó arriba, estas células no parecen favorecer la expresión de proteínas recombinantes. La naturaleza de este fenómeno en el laboratorio y la información en la literatura es extremadamente escasa.

En el presente trabajo se logró implementar un sistema de cultivo estático con condiciones ambientales controladas para el estudio no invasivo de células vivas por periodos largos de tiempo. Las series de imágenes obtenidas con este sistema tienen una gran resolución temporal y permiten ver comportamientos a nivel celular y poblacional, algunos de estos previamente no estudiados. Como limitantes, está el hecho de que el uso de este sistema de cultivo sólo permite observar un campo a lo largo del tiempo, perdiéndose información del resto de las células. Esto se debe a que la platina del microscopio no está automatizada.

Adicionalmente, hasta que se automatice la adquisición de imágenes de fluorescencia, no es posible registrar simultáneamente de manera automática los eventos en campo claro

como de fluorescencia sin embargo sí es posible obtener información de los diferentes canales para estudiar cambios en los cultivos en periodos largos de tiempo.

Conclusiones

El sistema propuesto es útil para estudiar y caracterizar poblaciones celulares a la vez que ofrece información valiosa asociada a cada célula en diferentes condiciones ambientales, tiene gran resolución temporal y permite la observación de fenómenos celulares dinámicos.

- Las cinéticas realizadas en placas de 96 pozos no ofrecen una alternativa viable para el estudio de células en condiciones limitantes.
- El crecimiento celular en agarosa de bajo punto de fusión no ofrece una condición limitante de oxígeno disuelto y por lo tanto no es apta para lograr el objetivo del proyecto.
- Los cultivos en la microcámara de cultivo son sumamente informativos y las condiciones a las cuales se lleva a cabo son controladas, por lo que son una buena herramienta para el análisis no invasivo de las células en diferentes condiciones ambientales, algunas de las cuales pueden ser limitantes. Este sistema tiene ciertos inconvenientes, como son el hecho de que para mantener la resolución temporal, solo se puede estudiar un campo visual por experimento, reduciendo el número de individuos a estudiar, comparado, por ejemplo, con equipos como el citómetro de flujo.
- Es posible obtener datos cuantitativos importantes de los cultivos en cada condición ambiental probada.
- Se han identificado comportamientos previamente no documentados y sin estudiar que, debido a su naturaleza, pueden ser de relevancia en el estudio de células de insecto. El más relevante de estos puede ser la documentación del fenotipo fibroblastoide, que es un fenotipo migratorio y cuya frecuencia de aparición parece ser dependiente de las condiciones ambientales.
- La disminución en la cantidad de oxígeno disuelto en cultivos no infectados afecta el crecimiento celular, aumenta la cantidad de células fibroblastoides y provoca cambios morfológicos en las células.
- La disminución en la cantidad de oxígeno disuelto en cultivos infectados no afecta el crecimiento celular pero si tiene consecuencias sobre la cantidad de células fluorescentes.

Perspectivas

- Las cinéticas en placas de 96 pozos, así como en agarosa de bajo punto de fusión, no resultaron efectivas para llevar a cabo el estudio, sin embargo se obtuvo información valiosa de ellas para un posterior diseño del sistema de cultivo donde se pueda integrar el análisis de todas las variables deseadas a microescala.
- El uso de cambiadores de filtro automáticos para fluorescencia así como de lámparas para campo claro automáticas podrán permitir tomar imágenes multicanal a las horas establecidas sin la necesidad de hacerlo manualmente, permitiendo una mayor cantidad de información por cultivo y la posibilidad de monitorear más de un campo a la vez.
- El baculovirus recombinante construido en el laboratorio puede emplearse en este sistema para probar otras condiciones ambientales de interés y cuya información puede ser posteriormente utilizada para la optimización de cultivos a escala industrial.
- Los fenómenos a nivel celular observados en este trabajo, tanto en las condiciones empleadas para los cultivos a diferentes TOD como en las demás condiciones de cultivo, como son los eventos de migración y la aparente ausencia de fluorescencia en células fibroblastoides en cultivos infectados con el baculovirus recombinante pueden ser de particular interés para futuros proyectos.

Referencias

- Adam K. Whitea, Michael VanInsberghea, Oleh I. Etriva, Mani Hamidia, Darek Sikorski, Marco A. Marrae, James Piret, Samuel Aparicio, and Carl L. Hansena. "High-throughput microfluidic single-cell RT-qPCR." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011: 13999-14004.
- Altschuler, S. J., & Wu, L. F. (2010). Essay Cellular Heterogeneity : Do Differences Make a Difference ?, 559–563. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.033>
- Alvaro R. Lara, Enrique Galindo, Octavio T. Ramírez, Laura A. Palomares. "Living With Heterogeneities in Bioreactors." *Molecular Biotechnology*, 2006: 355-381.
- Arellánez, Argel Gastélum. "Evaluación de sistemas de doble compartimento para escalamiento descendente en cultivos de células animales: Simulación de gradientes de oxígeno disuelto y esfuerzos de cortesubletales sobre la glicosilación de proteína recombinante." *Evaluación de sistemas de doble compartimento para escalamiento descendente en cultivos de células animales: Simulación de*

gradientes de oxígeno disuelto y esfuerzos de cortesubletales sobre la glicosilación de proteína recombinante, Argel Gastélum Arellánez, 1-7. Cuernavaca, Morelos, 2009.

- Bilello, J. P., Delaney, W. E., Boyce, F. M., & Isom, H. C. (2001). Transient disruption of intercellular junctions enables baculovirus entry into nondividing hepatocytes. *J Virol.*, 75(20), 9857–9871. <http://doi.org/10.1128/JVI.75.20.9857>
- Braunagel, S. C., Parr, R., Belyavskiy, M., & Summers, M. D. (1998). *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infection results in Sf9 cell cycle arrest at G2/M phase. *Virology*, 244(1), 195–211. <http://doi.org/10.1006/viro.1998.9097>
- Charlton, C. a, & Volkman, L. E. (1991). Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Journal of Virology*, 65(3), 1219–1227.
- Chen, C., Lin, C., Chen, G., & Hu, Y. (2011). Baculovirus as a gene delivery vector : Recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications. *Biotechnology Advances*, 29(6), 618–631. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.004>
- Damm, E., Liberali, P., Pelkmans, L., Snijder, B., Sacher, R., & Ra, P. (2009). Population context determines cell-to-cell variability in endocytosis and virus infection, 461(September). <http://doi.org/10.1038/nature08282>
- Danquah, J. O., Botchway, S., Jeshtadi, A., & King, L. A. (2012). Direct Interaction of Baculovirus Capsid Proteins VP39 and EXON0 with Kinesin-1 in Insect Cells Determined by Fluorescence Resonance Energy Transfer-Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Journal of Virology*, 86(2), 844–853. <http://doi.org/10.1128/JVI.06109-11>
- Doran, P.M. "Design of Bioreactors for plant cells and organs." *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* 48 (1993): 115-168.
- Dusenbery, D. B. "Living at microscale, The unexpected physics of being small", Harvard University Press, 2011
- Fritsch, F. S. O., Dusny, C., Frick, O., & Schmid, A. (2012). Single-Cell Analysis in *Biotechnology* , *Systems Biology* , and *Biocatalysis*. <http://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-062011-081056>
- Gakuen-cho, T. (2002). Significant Increase in Recombinant Protein Production of a Virus-Infected Sf-9 Insect Cell Culture of Low MOI under Low Dissolved Oxygen Conditions, 94(5), 426–433.

- Goley, E. D. (2009). Dynamic Nuclear Actin Assembly by, 464(2006), 464–468. <http://doi.org/10.1126/science.1133348>
- Hägstrom, L. Cell Metabolism, Animal. Vol. 1, in The Encyclopedia of Cell Technology, by R.E. Spier. New York: John Wiley and sons, 2000.
- Hell, S. W. (2009). Microscopy and its focal switch, 6(1). <http://doi.org/10.1038/nmeth.1291>
- Ikonomou L., Schneider Y.-J., Agathos S.N., <<Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins>> Applied Microbiology Biotechnology, 2003, volume 62, 1-20.
- Inceoglu, A. B., Kamita, S. G., & Hammock, B. D. (2006). Genetically Modified Baculoviruses: A Historical Overview and Future Outlook, 68(06), 323–360. [http://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)68009-3](http://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)68009-3)
- Jabs. "Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals." Biochemical Pharmacology, 1999: 231–245.
- Joseph G. Dubrovsky, M. I. Gutenberg, A. Saralegui, S. Napsucialy-Mendivil, B. Voigt, F. Baluska, D. Menzel, 2006. Neutral Red as a Probe for Confocal Laser Scanning Microscopy Studies. Annals of Botany, p. 97: 1127–1138.
- Kamiya, K., Kobayashi, J., Yoshimura, T., & Tsumoto, K. (2010). Confocal microscopic observation of fusion between baculovirus budded virus envelopes and single giant unilamellar vesicles. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1798(9), 1625–1631. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.05.011>
- Kerry, Routenberg, Love. "Microtools for single-cell analysis in biopharmaceutical development and manufacturing." Trends in Biotechnology, 2013: 280-286.
- Kost, T. a., & Condreay, J. P. (2002). Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. Trends in Biotechnology, 20(4), 173–180. [http://doi.org/10.1016/S0167-7799\(01\)01911-4](http://doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01911-4)
- Lakowicz, Joseph R., "Principles of Fluorescence Spectroscopy", Springer, 2006
- Landecker, H. (2009). Seeing things : from microcinematography to live cell imaging. Nature Methods, 6(10), 707–709. <http://doi.org/10.1038/nmeth1009-707>
- Lara A., Galindo E., Ramírez O.T., Palomares L.A. «Living With Heterogeneities in Bioreactors.» Molecular Biotechnology, 2006: Volumen 34, 355-381.
- Lecault, V., VanInsberghe, M., Sekulovic S., Mclaughlin, T., Jarandehi, A., Miller, M., Taghipour, F., Falconnet, D., White, A.K., Kent, D.G., Copley, M.R., Eaves, C.J., Humphries, R.K., Piret, J.M, Hansen, C.L.<<High-Throughput Analysis of Single

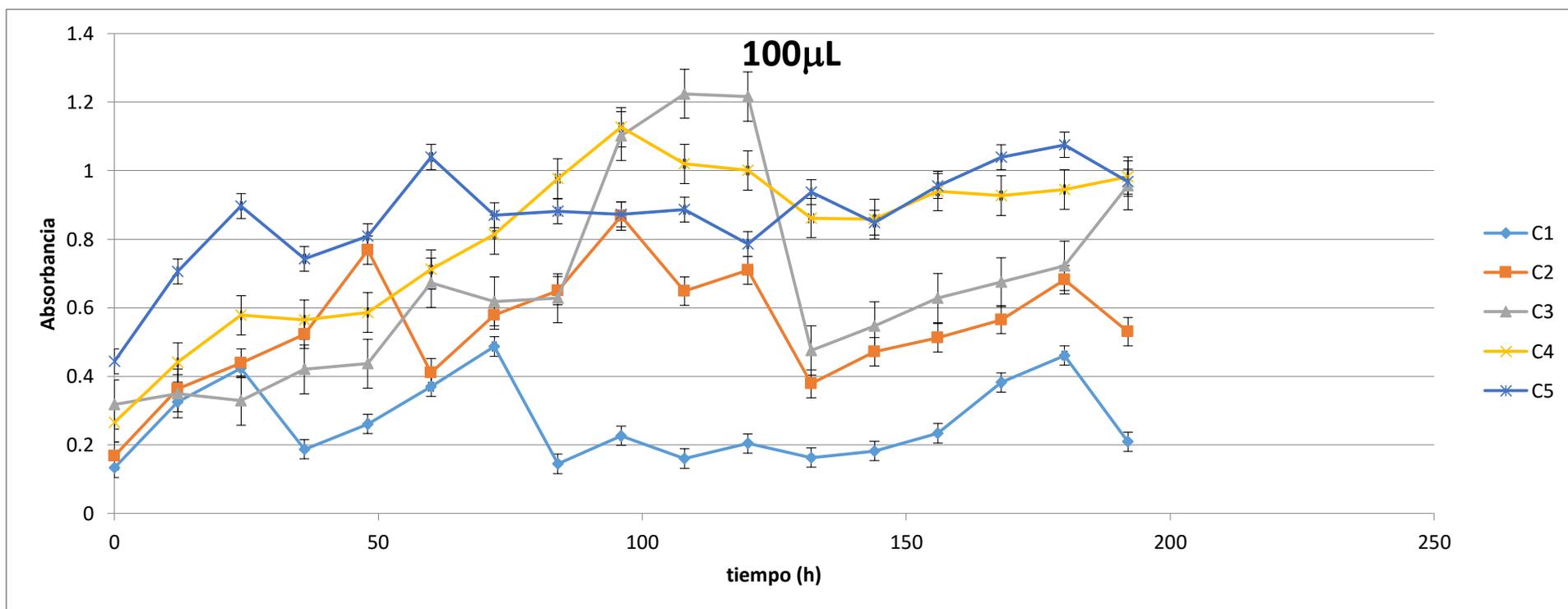
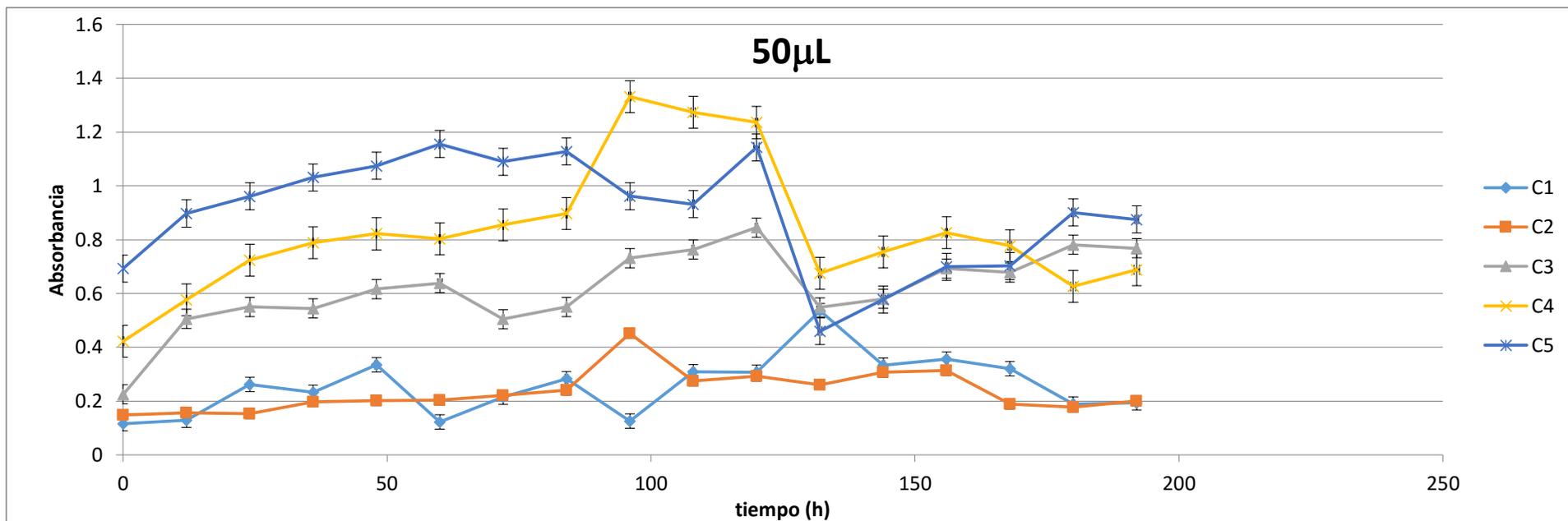
Hematopoietic Stem Cell Proliferation in Perfusion Microfluidic Cell Culture Arrays>>. *Nature Methods* 2011, Volumen 8:581-586.

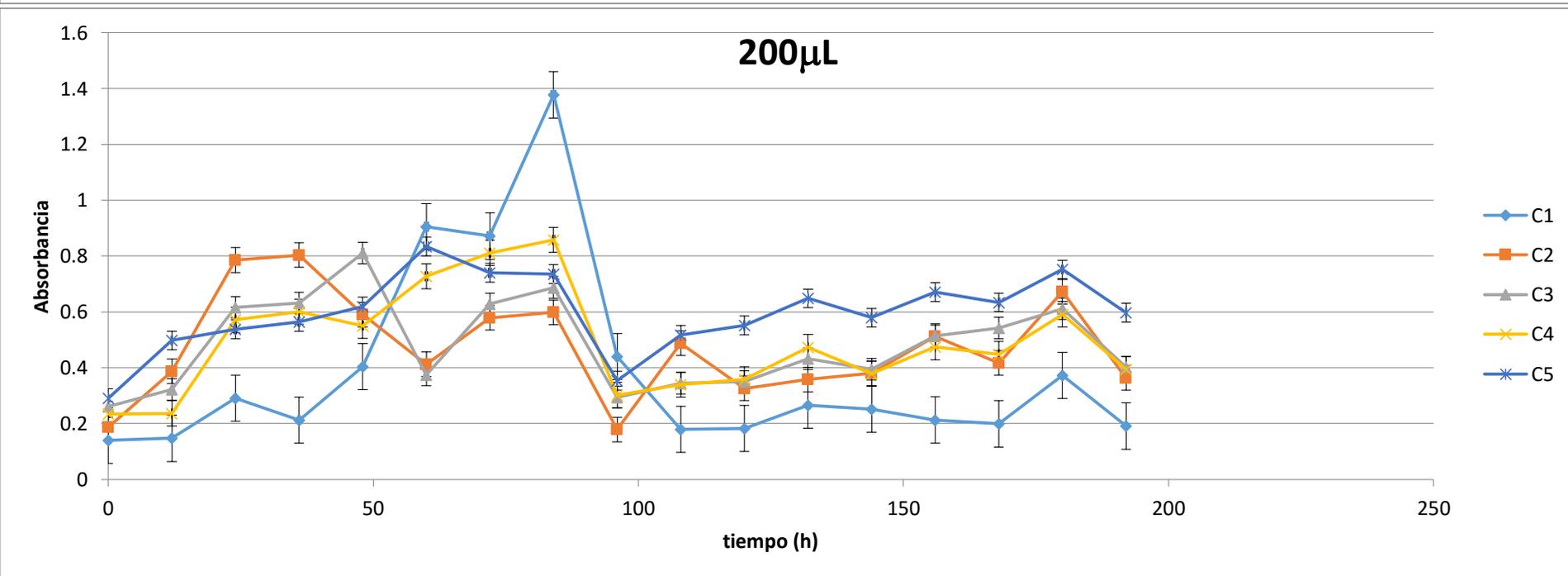
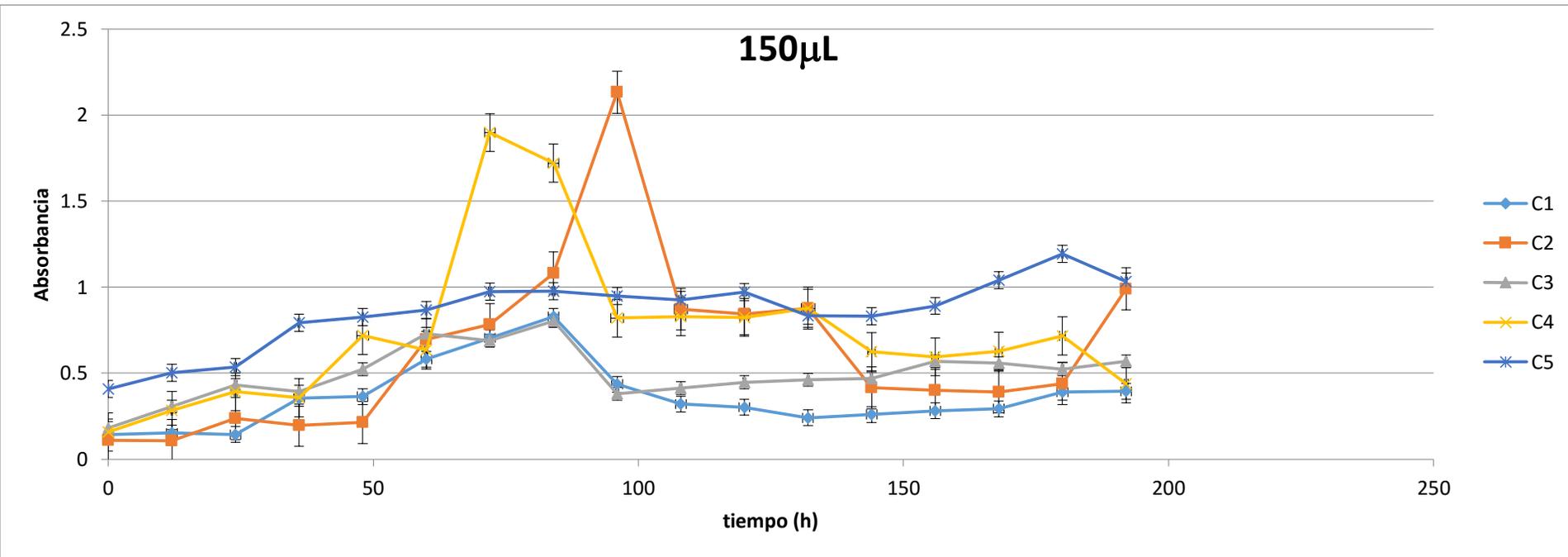
- Lew V., Diep Nguyen, Michelle Khine. «Shrink-Induced Single-Cell Plastic Microwell Array.» *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 2011: Volumen 16, Issue 6, 450-456.
- Lewis WH. Pinocytosis. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1931;49:17–27M. K. Singhi, H. P. A. C. B. A. V. S., 1998. Dual Solvatochromism of Neutral Red. *Photochemistry and Photobiology*, 68(1), pp. 32-38.
- Palomares, L. a, & Ramirez, O. T. (1996). The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. *Cytotechnology*, 22(1-3), 225–37. <http://doi.org/10.1007/BF00353943>
- Palomares, L.A. and Ramírez, O.T. "Bioreactor Scale-Down." In *The Encyclopedia of Cell Technology*, by R.E. Spier, 174-183. New York: John Wiley and Sons, 2000.
- Palomares, L.A., Estrada-Mondaca, S., Ramírez O.T. "Production of Recombinant Proteins: challenges and Solutions." *Methods in Molecular Biology. recombinant Gene Expression Protocols*, 2004.
- Panagiotou, V., Love, K. R., Jiang, B., Nett, J., Stadheim, T. & Love, J. C. <<Generation and screening of *Pichia pastoris* strains with enhanced protein production by use of microengraving>> *Appl. Environ. Microb.* 2011, Volumen 77, Issue 9, 3154-3156.
- Reuveny, S., Kim, Y. J., Kemp, C. W., & Shiloach, J. (1993). *Applied Microbiology Biotechnology* Effect of temperature and oxygen on cell growth and recombinant protein production in insect cell cultures, 619–623.
- Saarinen, M. A., & Murhammer, D. W. (2002). The Response of Virally Infected Insect Cells to Dissolved Oxygen Concentration : Recombinant Protein Production and Oxidative Damage. <http://doi.org/10.1002/bit.10460>
- Saito, T., Dojima, T., Toriyama, M., & Park, E. Y. (2002). The effect of cell cycle on GFPuv gene expression in the baculovirus expression system. *Journal of Biotechnology*, 93(2), 121–9.
- Schroeder, T. (2011). Long-term single-cell imaging of mammalian stem cells, 8(4). <http://doi.org/10.1038/nmeth.1577>
- Serrato J.A., Palomares L.A., Meneses A., Ramírez O.T. <<Heterogeneous Conditions in Dissolved Oxygen Affect N-Glycosylation but Not Productivity of a

Monoclonal Antibody in Hybridoma Cultures>> Biotechnology and Bioengineering, 2004, Volumen 88, Issue 2, 176–188.

- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E. R., & Morrison, S. J. (2009). Essay Heterogeneity in Cancer : Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution, 822–829. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.017>
- Stephens, D. J., & Allan, V. J. (2003). Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging, 300(April), 82–87.
- Steven J. Altschuler, Lani F. Wu. "Cellular Heterogeneity: Do Differences Make a Difference?" Cell, 2010: 559-563.
- Tani, H., Nishijima, M., Ushijima, H., Miyamura, T., & Matsuura, Y. (2001). Characterization of Cell-Surface Determinants Important for Baculovirus Infection. Virology, 279(1), 343–353. <http://doi.org/10.1006/viro.2000.0699>
- Valerie Lew, Diep Nguyen, Michelle Khine. "Shrink-Induced Single-Cell Plastic Microwell Array." Journal of the Association for Laboratory Automation, 2011: 1-7.
- Varadarajan N., Kwon D. S., Varadarajan, N., Kwon, D. S., Law, K. M., Ogunniyi, A. O., Anahtar, M. N., Richter, J. M., Walker, B. D. & Love, J. C. <<Rapid, efficient functional characterization and and recovery of HIV-specific human CD8+ T cells using microengraving>> Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012, Volumen 109, Issue 10, 3885-3890.
- Vidigal, J., Dias, M. M., Fernandes, F., Patrone, M., Bispo, C., Andrade, C., ... Teixeira, A. P. (2013). A cell sorting protocol for selecting high-producing sub-populations of Sf9 and High FiveTM cells. Journal of Biotechnology, 168(4), 436–439. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.020>
- Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., Wath, R. C. Van Der, Blanco-bose, W., Jaworski, M., ... Lio, P. (2008). Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair, 1118–1129. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.048>

Anexo I. Cinéticas de crecimiento en placas de 96 pozos sin agitación.





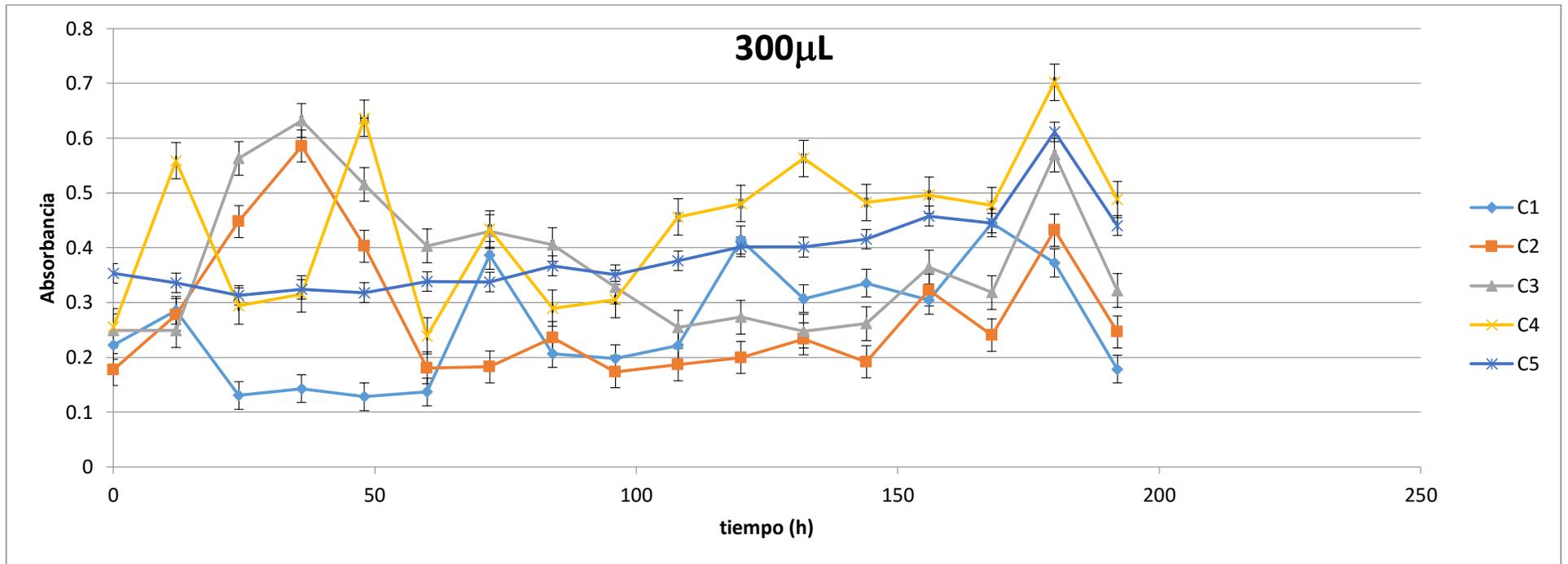
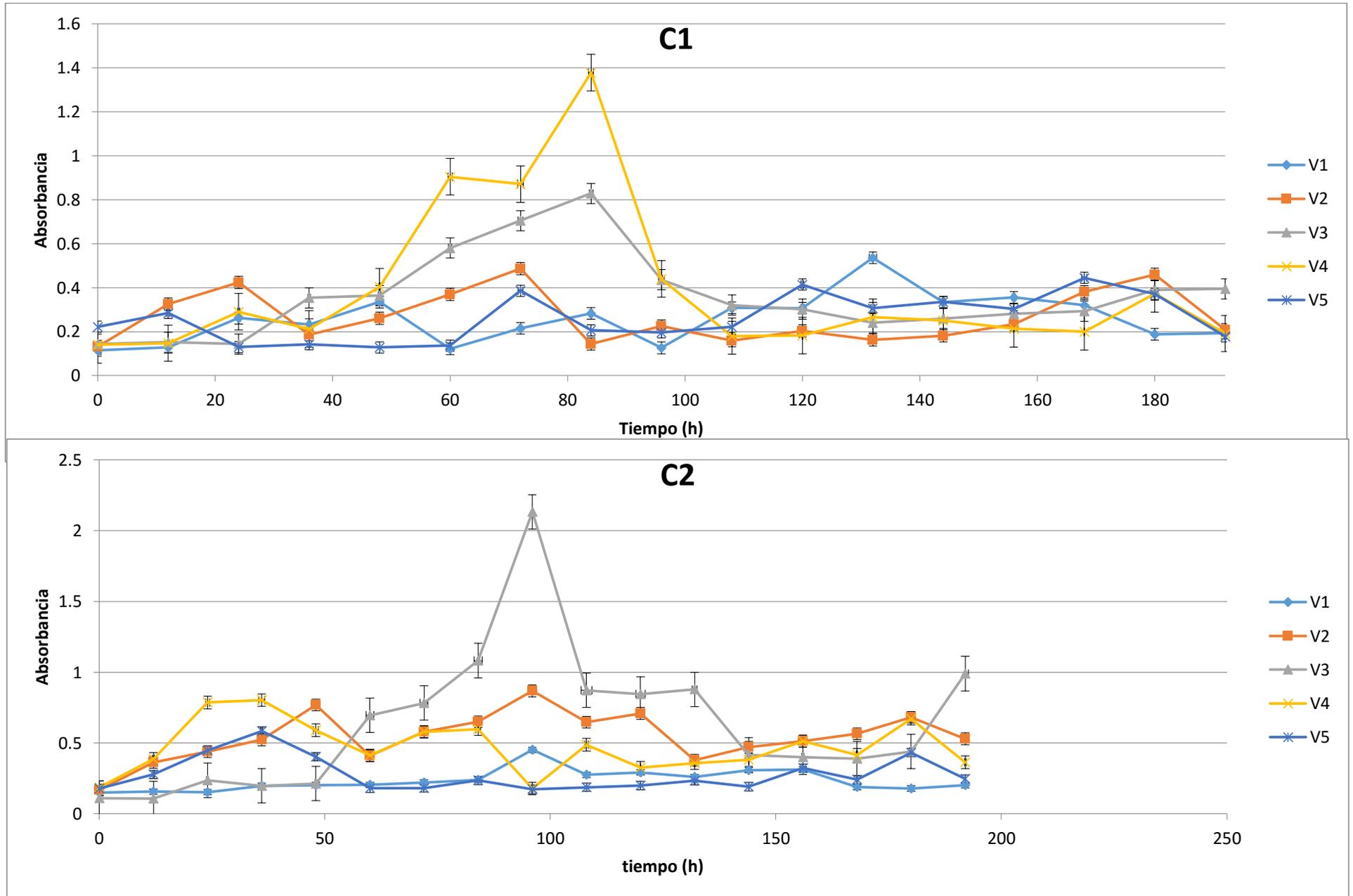
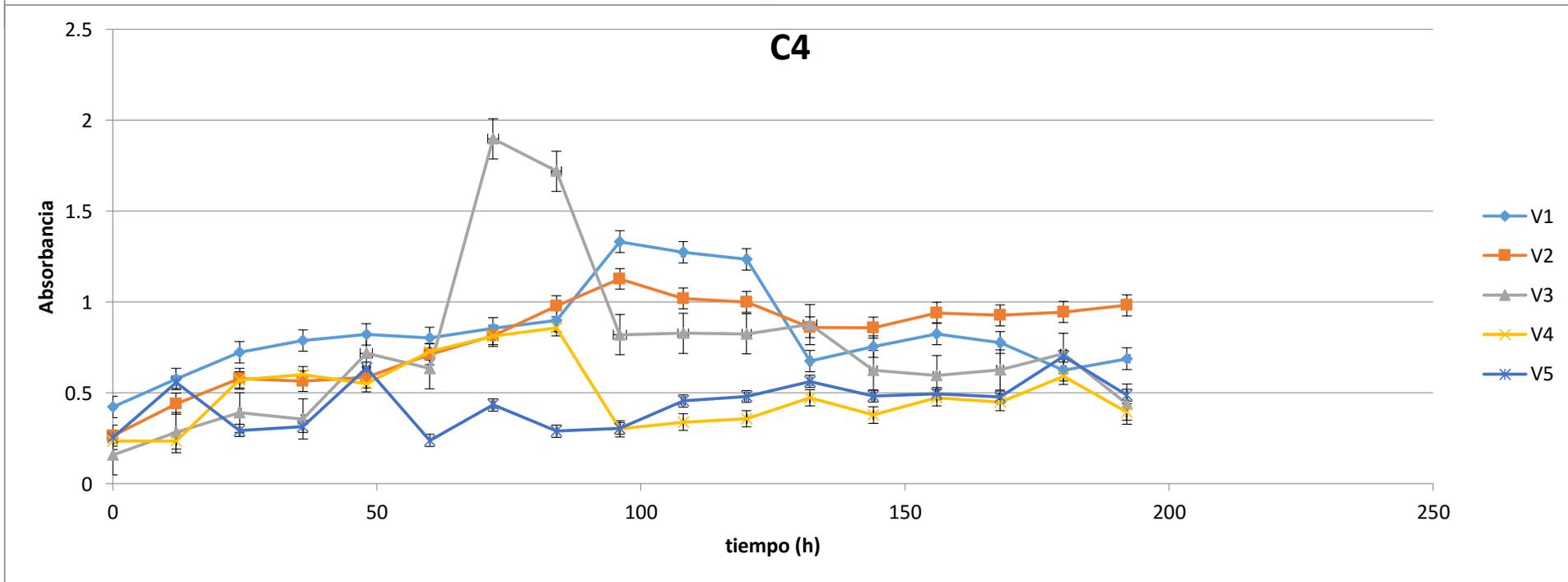
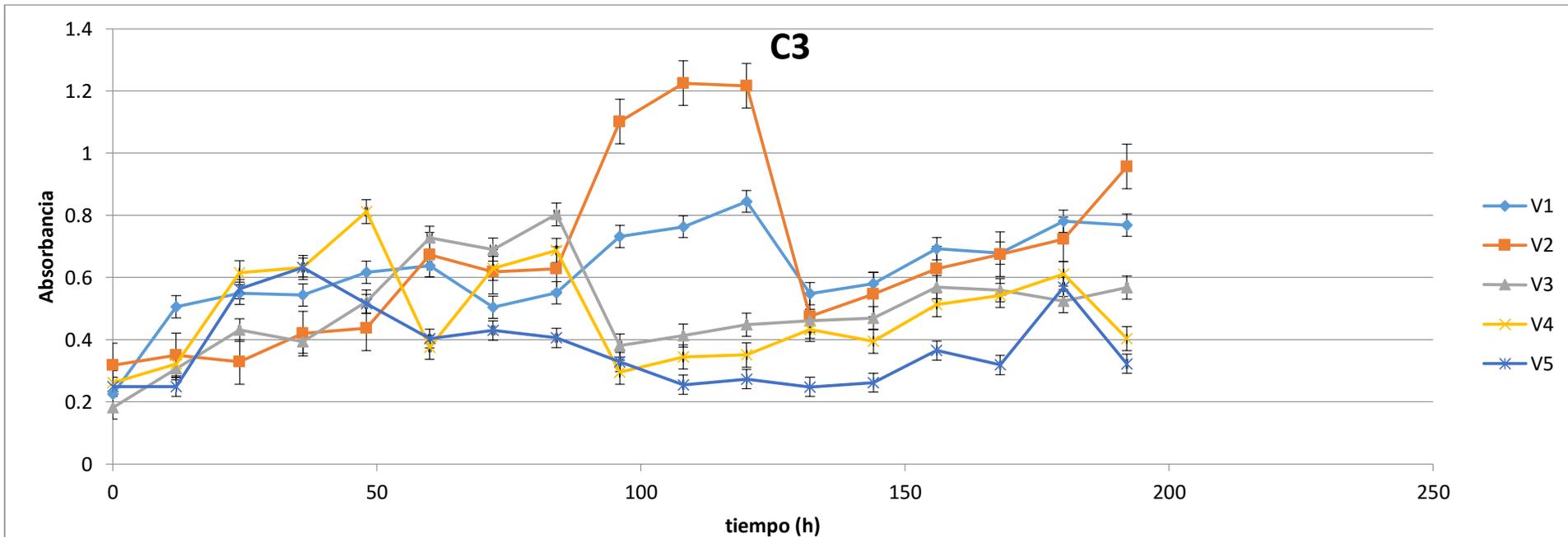


Figura A1. Gráficas de las cinéticas de 96 pozos sin agitación. Para Cada volumen se muestran las cinéticas con las 5 cantidades iniciales de células por pozo.

C1, 54 800. C2, 109 600. C3, 165 400. C4, 219200. C5, 328 800.

Cinéticas de crecimiento en placas de 96 pozos con agitación.





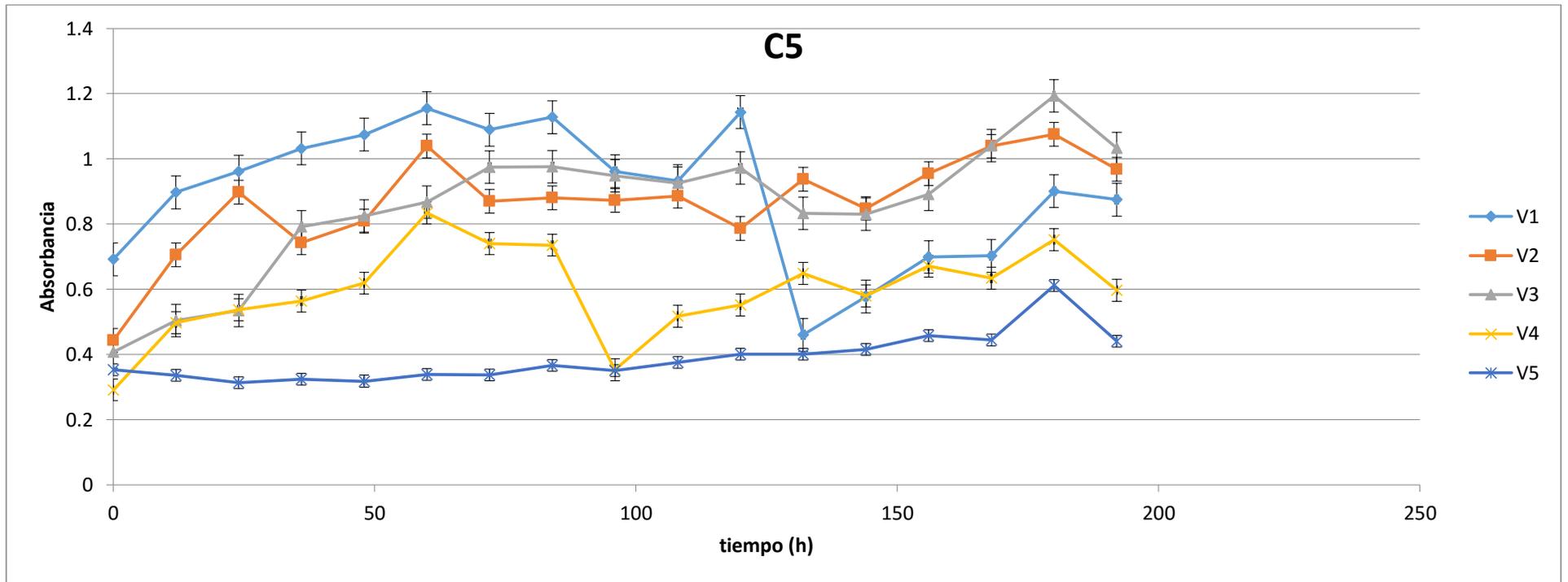


Figura A2. Gráficas de las cinéticas de 96 pozos con agitación. Para Cada cantidad de células (C) se muestran las cinéticas con los 5 volúmenes iniciales.

C1, 54 800. C2, 109 600. C3, 165 400. C4, 219200. C5, 328 800.

V1, 50μL. V2, 100μL. V, 150μL. V4, 200μL. V5, 300μL

Anexo II. Procesamiento computarizado de las imágenes de los cultivos

Para obtener parámetros cinéticos de los experimentos, se llevó a cabo una segmentación de las imágenes, es decir, se procesaron las series de imágenes para poder diferenciar los objetos (las células) del fondo. Una vez que las imágenes fueron segmentadas, fue posible realizar un análisis computarizado de los objetos segmentados para obtener datos como número y tamaño celular (figura A3), parámetros que son importantes para las cinéticas de los cultivos. Los datos obtenidos con dicho análisis automático fueron comparados con un análisis manual seleccionando algunas imágenes al azar de cada serie de imágenes. El fin de dicha comparación fue ver el grado de error de la automatización del análisis y asegurar que el método fuera ofreciera resultados cercanos a la realidad (figura A4).

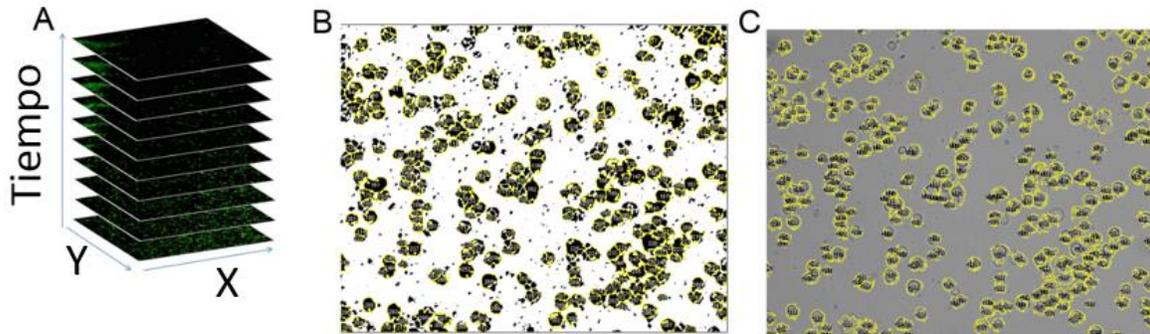


Figura A3 Pasos en el procesamiento y segmentación de las imágenes. A, Series de imágenes obtenidas para cada cultivo. B, Segmentación de las imágenes y análisis de los objetos (las células). C, Comparación de la segmentación sobre las imágenes originales del cultivo.

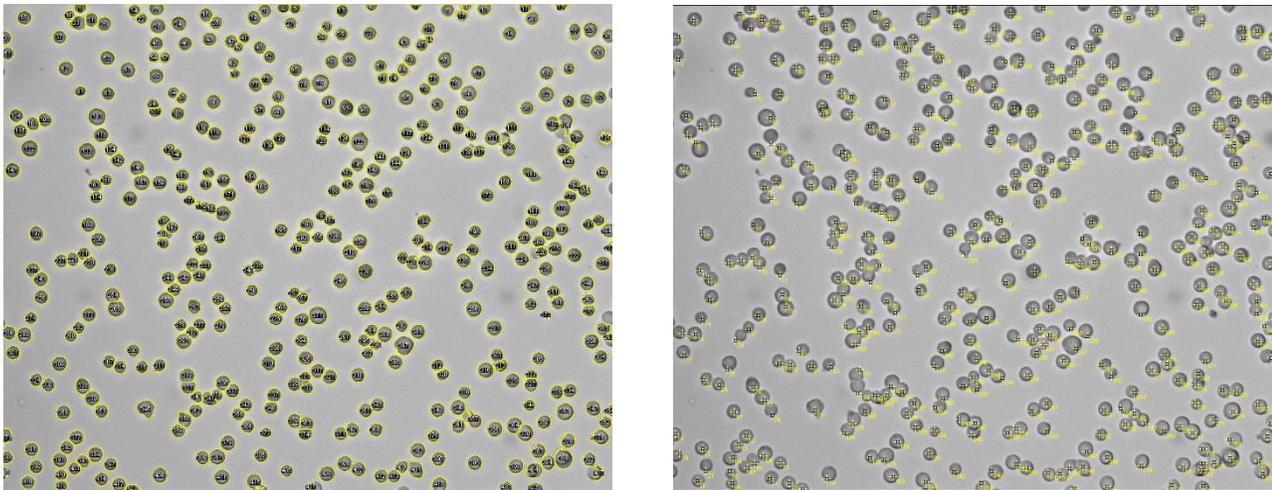


Figura A4. Ejemplo del análisis (en este caso, conteo) automático (A) y del análisis manual (B) realizado para una imagen al azar. El error entre ambas mediciones en este caso fue del 0.24%

Este método es mucho más rápido que un análisis manual de las imágenes y ofrece parámetros como número de células y tamaño, sin embargo, por su naturaleza (involucra binarización de las imágenes) no ofrece información acerca de fenotipos celulares de interés.