

00562
//

Universidad Nacional Autónoma de México



Instituto de Biotecnología

Departamento de Bioingeniería

**“Estudio de escalamiento descendente
del proceso de producción de
anticuerpos monoclonales
por hibridomas ”**

**Tesis para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias**

**Presenta:
I.B.Q. José Antonio Serrato Pérez**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Cuernavaca, Mor. Julio 2002



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 realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto (IN-216100) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de los proyectos 33348-B, NC-230 y con la beca 144901.

Indice General

	Página
Indice de figuras	v
Indice de tablas	vii
Nomenclatura	viii
Resumen	1
Capítulo 1 Introducción	3
Capítulo 2 Antecedentes	6
Hibridomas y anticuerpos monoclonales	6
Principios del método de generación de hibridomas	6
Aplicaciones de los anticuerpos monoclonales	7
Estado del arte sobre anticuerpos monoclonales para uso terapéutico	7
El oxígeno	9
Importancia del oxígeno en los cultivos de hibridomas	9
Influencia del oxígeno en el metabolismo de glucosa	10
Influencia del oxígeno en el metabolismo de glutamina	12
Influencia del oxígeno en el potencial redox del cultivo (PRC)	13
Medición de la concentración de oxígeno disuelto	13
Tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno disuelto	14
Suministro de oxígeno	15
Consumo de oxígeno	17
Escalamiento	20
Escalamiento ascendente	20
Evidencia de gradientes de oxígeno disuelto en reactores a gran escala	23
Escalamiento descendente	24
Análisis de régimen y tiempos característicos	25
Estudios de análisis de régimen reportados en la literatura	29

Simulación de gradientes de oxígeno disuelto	32
¿Existe la necesidad de realizar estudios de escalamiento descendente en cultivos de hibridomas?	34
Capítulo 3 Objetivos	36
Capítulo 4 Materiales y Métodos	37
Modelo biológico	37
Medio de cultivo	37
Mantenimiento de las células	38
Congelación de células	38
Descongelación de células	38
Inóculo	39
Sistema de cultivo	39
Biorreactor	39
Agitación y temperatura	40
Sistema computarizado de control, despliegue y adquisición de datos para oxígeno disuelto y pH	40
Programas de control	41
Caracterización del sistema	43
Determinación de la constante de tiempo del electrodo de TOD	43
Determinación de la constante de tiempo del sistema de cultivo	43
Cultivos con control de oxígeno disuelto y pH constante	44
Métodos analíticos	44
Cuantificación de la concentración celular	44
Cuantificación de la viabilidad celular	45
Determinación de la concentración de Anticuerpo Monoclonal (AcM)	45
Reconocimiento de la toxina 2 de alacrán por el AcM producido en BCF2	46
Cuantificación de glucosa, lactato, y glutamina	47

Consideraciones matemáticas	48
Determinación de la velocidad específica de crecimiento	48
Determinación de la velocidad específica de producción de AcM	48
Determinación de los coeficientes metabólicos de glucosa, lactato y glutamina	48
Capítulo 5 Resultados y Discusión	
Caracterización dinámica del simulador	49
Constante de tiempo del sistema de cultivo	49
Tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno disuelto	50
Selección de las condiciones de operación del sistema de cultivo	51
Generación de perfiles oscilantes	51
Cálculo de la constante de control proporcional	53
Cultivos a TOD constante	54
Cultivos a 10 % de TOD	54
Cultivos a TOD oscilante	57
Cultivos a TOD oscilante con periodo de oscilación de 800 s	57
Cultivos a TOD oscilante con periodo de oscilación de 1600 s, 6400 s y 12800 s	60
Rendimientos	
Rendimiento de lactato producido por célula ($Y_{lac/x}$) y de células por glucosa consumida ($Y_{x/Glc}$)	66
Rendimiento de AcM producido por célula ($Y_{AcM/x}$) y de células por glutamina consumida ($Y_{x/Gln}$)	67
Velocidades específicas	
Velocidades específicas de producción de lactato (q_{Lac}) y de consumo de glucosa (q_{Glc})	68
Velocidad específica de producción AcM (q_{AcM}) y de consumo de glutamina (q_{Gln})	69
Velocidad específica de crecimiento (μ) vs período de oscilación	70
Reconocimiento de la toxina 2 de alacran por el AcM producido en BCF2	71

Capítulo 6 Conclusiones	72
Capítulo 7 Perspectivas	74
Referencias	76
Apéndices	86
A.- Fotografía del biorreactor	86
B.- Sistema de control y adquisición de datos	87
C.- Programa de control	88
D.- Cultivos a 10% de TOD constante	93
E.- Cultivos a TOD oscilante con un período de oscilación de 800 s	95
F.- Cultivos a TOD oscilante con un período de oscilación de 1600 s	97
G.- Cultivos a TOD oscilante con un período de oscilación de 6400 s	99
H.- Cultivos a TOD oscilante con un período de oscilación de 12800 s	101

Indice de Figuras

Fig. 2.1.	Eventos clave en la industria de los AcM de uso terapéutico	9
Fig. 2.2	Esquema de las principales vías metabólicas en hibridomas	11
Fig. 2.3	Esquema de la ruta glicolítica y su regulación en hibridomas	12
Fig. 2.4.	Valores medidos y calculados de TOD para un reactor bacteriano de 20 m ³	24
Fig. 2.5.	Etapas del escalamiento descendente	25
Fig. 2.6.	Gráfica de la determinación del tiempo característico de mezclado	27
Fig. 2.7.	Orden de magnitud de los tiempos característicos	30
Fig. 2.8.	Tipos de simuladores de gradientes de TOD	34
Fig. 2.9.	Comparación de tiempos característicos a dos densidades celulares diferentes	35
Fig. 5.1.	Curva para determinar la constante de tiempo del sistema de cultivo	50
Fig. 5.2.	Curva del tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno disuelto.	52
Fig. 5.3.	Gráfica del perfil oscilatorio de TOD ante un “setpoint” cuadrado de oxígeno	53
Fig. 5.4.	Fluctuaciones de TOD con un período de oscilación de 125 s.	54
Fig. 5.5.	Curva para la determinación de la constante de control proporcional (K_c)	55
Fig. 5.6.	Cultivo típico al 10 % de TOD constante	57
Fig. 5.7.	Cultivo a TOD oscilante con un período de oscilación de 800 s	59
Fig. 5.8.	Cultivo a TOD oscilante con un período de oscilación de 1,600 s	64
Fig. 5.9.	Cultivo a TOD oscilante con un período de oscilación de 6,400 s	65
Fig. 5.10.	Cultivo a TOD oscilante con un período de oscilación de 12,800s	66
Fig. 5.11.	Rendimientos de lactato producido por célula y de células por glucosa consumida	67

Fig. 5.12.	Rendimientos de AcM producido por célula y de células por glutamina consumida	68
Fig. 5.13.	Velocidades específicas de producción de lactato y de consumo de glucosa	69
Fig. 5.14.	Velocidades específicas de producción de AcM y de consumo de glutamina	70
Fig. 5.15.	Velocidad específica de crecimiento (μ) vs periodo de oscilación	71
Fig. 5.16.	Reconocimiento del AcM de BCF2 utilizando: A) toxina de alacrán y B) un AcM anti-ratón.	72

Indice de Tablas

Tabla 2.1.	AcM de uso terapéutico aprobados hasta el 2001	10
Tabla 2.2.	Valores de $k_L a$ representativos para diferentes tipos de cultivos	17
Tabla 2.3.	Valores de qO_2 representativos para células animales	18
Tabla 2.4.	Valores de VCO representativos para procariotes y eucariotes	20
Tabla 2.5.	Efecto del escalamiento de un reactor de 40 L a 10,000 L, sobre las principales variables de cultivo, utilizando diferentes criterios de escalamiento	22
Tabla 2.6.	Correlaciones de la literatura para determinar algunos tiempos característicos	29

Nomenclatura

H	Altura de la paleta de los impulsores	(m)
W	Ancho del impulsor	(m)
Q _i	Capacidad de bombeo del impulsor	(m ³ /s)
k _L a	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	(h ⁻¹)
X ₀	Concentración inicial de células viables	(cel/mL)
C _L	Concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo	(mg O ₂ /L)
C _g *	Concentración de oxígeno disuelto a la saturación del aire	(mg O ₂ /L)
X _v	Concentración de células viables	(cel/mL)
X _{tot}	Concentración de células totales	(cel/mL)
K _c	Constante de control proporcional	(-)
D	Diámetro del tanque	(m)
D _i	Diámetro del impulsor	(m)
E _n	Error actual	(%)
G	N ₂ , O ₂ o CO ₂	(-)
%G _n	Flujo de gas actual	(%)
%G _{n-1}	Flujo de gas anterior	(%)
N _p	Número de potencia	(-)
Re	Número de Reynolds	(-)
P	Potencia	(W)
Y _{X/S}	Rendimiento de células sobre sustrato	(cel/g sustrato)
t	Tiempo	(h)
t _c	Tiempo de circulación	(s)
t _{ca}	Tiempo característico	(s)
T _d	Tiempo muerto	(s)
N	Velocidad de agitación	(rpm, s ⁻¹)
Na	Velocidad de transferencia de oxígeno	(mg O ₂ /L h)
q	Relación entre la velocidad angular en la punta del impulsor y la velocidad angular del impulsor	(-)
q _{O2}	Velocidad específica de consumo de oxígeno	(mg O ₂ /cel h)
q _{AcM0}	Velocidad específica de producción de AcM	(mg AcM/cel h)

q_{glucosa}	Velocidad específica de consumo de glucosa	(g Glc/cel h)
$q_{\text{Glutamina}}$	Velocidad específica de consumo de glutamina	(mmol Gln/cel h)
q_{lactato}	Velocidad específica de producción de lactato	(g Lac/cel h)
VCO	Velocidad de consumo de oxígeno	(mmol O ₂ /L h)
V	Volumen	(m ³)

Abreviaturas

AcM	Anticuerpo Monoclonal	
CAT	Ciclo de los ácidos Tricarboxílicos	
Ccpm	Centímetros cúbicos por minuto	
PRC	Potencial Redox de Cultivo	(mV)
RFP	Reactor de Flujo Pistón	
SFB	Suero Fetal Bovino	
TOD	Tensión de Oxígeno Disuelto	(%)

Letras griegas

ρ	Densidad	(Kg/m ³)
τ	Constante de tiempo	(s)
τ_e	Constante de tiempo del electrodo de TOD	(s)
τ_s	Constante de tiempo del sistema	(s)
μ	Velocidad específica de crecimiento	(h ⁻¹)
η	Viscosidad	(Pa s)
π	Constante	3.1416

Resumen

Los AcM juegan un papel muy importante en la industria farmacéutica y de diagnóstico, la cual, para poder satisfacer sus demandas ha tenido que hacerlo mediante cultivos de células animales a gran escala. Dadas las características inherentes a estas células, como es la fragilidad celular, no es posible aplicar altas velocidades de agitación y/o aereación; esto, aunado a que el oxígeno es un nutriente con una muy baja solubilidad, ocasiona que la formación de gradientes de oxígeno disuelto en reactores a gran escala se torne inevitable, de ahí la importancia de conocer el efecto que estos pueden ocasionar en el metabolismo y la producción de anticuerpos monoclonales por dichas células. La simulación de estos gradientes de oxígeno disuelto en reactores de escala laboratorio mediante la metodología del escalamiento descendente representa una herramienta muy útil.

En este trabajo se diseñó y caracterizó un simulador de gradientes de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) consistente en un biorreactor agitado con un volumen de 220 mL, debidamente instrumentado con sensores de pH, TOD, potencial redox de cultivo (PRC), control de temperatura y agitación, acoplado a un sistema de control, despliegue y adquisición de datos.

La TOD fue manipulada mediante un algoritmo de control proporcional, que incluye una subrutina de “*setpoint*” variable (onda cuadrada) de los flujos de O₂ y N₂ que permitió generar ambientes oscilantes de TOD en forma de ondas sinusoidales, de eje, amplitud y período de oscilación determinada. Una vez caracterizado el simulador, se utilizó en el escalamiento descendente del proceso de producción de Anticuerpos Monoclonales (AcM) por hibridomas. La línea de hibridomas BCF2 fue utilizada como modelo para este trabajo. Esta línea celular produce un AcM que es específico y neutraliza *in vivo* a la toxina 2 del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann.

Se realizaron cultivos por lote con la finalidad de investigar el efecto de las fluctuaciones de TOD en el desarrollo de los cultivos de hibridomas, evaluando cuatro períodos diferentes de oscilación (800, 1,600, 6,400 y 12,800s) a un mismo eje (7 % de TOD) y amplitud de

oscilación (7 % de TOD) determinado. Los resultados se compararon con cultivos control a 10 % de TOD constante. Se encontró que la velocidad específica de crecimiento se redujo aproximadamente un 37 %, disminuyendo de 0.032 h^{-1} para los cultivos a TOD constante, a 0.020 h^{-1} para los cultivos con el periodo de oscilación mas grande.

Con respecto al rendimiento de los cultivos, se observó que solamente los rendimientos de lactato producido por célula y de células generadas por gramo de glucosa se vieron afectados de forma significativa. Por su parte, el rendimiento de AcM producido por célula viable se mantuvo constante, mientras que el número de células generadas por mmol de glutamina disminuyó ligeramente. Con respecto a las velocidades específicas, se observó que solamente la velocidad específica de producción de lactato tuvo un ligero aumento. Las velocidades específicas de producción de AcM, de consumo de glucosa y de consumo de glutamina se mantuvieron en valores relativamente constantes. Con respecto a las concentraciones máximas de células viables alcanzadas, se observó una disminución de $1.5 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ para los cultivos a TOD cte., a $1.0 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ para los cultivos con el período de oscilación mas extremo (12,800 s), mientras que las concentraciones máximas de AcM alcanzadas se mantuvieron relativamente constantes.

Contrariamente a lo que se esperaría, los resultados de este estudio muestran que la exposición de los hibridomas a gradientes de TOD, incluso varios órdenes de magnitud mayores a los que pueden encontrarse en reactores de gran escala, no ocasionan un efecto negativo en el desempeño de los cultivos y por ende en la producción del AcM. Los resultados de este estudio proporcionan bases racionales para el escalamiento de éstos cultivos, además de que conducen a proponer estrategias novedosas de cultivo mediante las cuales se puede, por un lado, reducir los costos de operación y, por el otro, disminuir las condiciones de estrés a las que se encuentran sometidas las células.

Capítulo 1 Introducción

Es posible anticipar que en los siguientes años, gracias a la biotecnología, se descubran y desarrollen nuevos y valiosos medicamentos. Entre estos, proteínas con modificaciones postraduccionales (glicosilación, fosforilación, formación de puentes disulfuro, etc.) necesarias para su funcionalidad, que requerirán de células animales para su expresión (Sanders, 1990). Asimismo, a medida que se expandan los mercados de dichas proteínas, los cultivos a gran escala de células animales serán cada vez más necesarios. Por ejemplo, tan solo en el año 2000, la FDA aprobó más de 80 nuevos productos farmacéuticos; Cáncer, enfermedades infecciosas, cardiovasculares y del sistema inmune, así como desórdenes del sistema nervioso central (SNC) y padecimientos endocrinos, fueron el blanco de la mayoría de éstas medicinas, de las cuales 20 fueron biomedicamentos desarrollados por compañías biotecnológicas (Ernst y Young, 2001).

Para poder cumplir con las demandas requeridas, los biorreactores tipo tanque agitado son los sistemas más ampliamente difundidos en el área biotecnológica para la producción de una gran variedad de productos, debido a la versatilidad que presentan respecto a otras configuraciones. Los objetivos fundamentales de todo biorreactor agitado son el mantener homogéneo el medio de cultivo (mezclado) y suministrar el oxígeno y demás nutrientes (transferencia de masa) necesarios para el crecimiento de las células (Doran, 1998; Galindo, 1996). Sin embargo se ha demostrado teórica y experimentalmente que el mezclado se hace más deficiente a medida que aumenta la escala, como consecuencia de las limitaciones físicas, así como de las limitaciones económicas que no permiten suministrar la potencia necesaria para cumplir dicho objetivo (Oosterhuis y Kossen, 1984; Doran, 1993; Tramper *et al.*, 1996). Lo anterior trae como consecuencia la formación de gradientes espaciales de parámetros importantes como la temperatura, el pH, la concentración de metabolitos, la tensión de oxígeno disuelto (TOD) y de otros nutrientes dentro del tanque. Bajo tales condiciones, los procesos de cultivo pueden verse afectados en cuanto a rendimientos o producción del metabolito de interés (Rhiel y Murhammer, 1995).

En vista de que el oxígeno es un elemento muy poco soluble en medios acuosos, es el sustrato más difícil de suministrar al cultivo. Esta situación puede llegar a ser crítica ya que se puede convertir en el sustrato limitante para el crecimiento de las células. Por lo tanto, conocer de que manera pueden afectar los gradientes de TOD el desempeño de los cultivos de células animales resulta de gran importancia. Sin embargo, la experimentación utilizando tanques de gran escala es poco accesible en vista de los gastos operacionales que involucra y de la poca disponibilidad de tanques de gran volumen para tal efecto.

Así, la metodología del escalamiento descendente (*scale down*) surge como una herramienta de investigación de más fácil acceso. El escalamiento descendente es una metodología que surge en los años 80's para identificar y solucionar la problemática de los cultivos bacterianos a gran escala mediante simulaciones en reactores de escala laboratorio (Oosterhuis, *et al.*, 1985). Este método semiempírico permite, mediante la aplicación de sus etapas (análisis de régimen, simulación, optimización e implementación), evaluar el efecto de los gradientes de las variables de proceso mediante la experimentación en reactores de escala laboratorio, sin la necesidad de realizar experimentación a escala industrial (Sweere *et al.*, 1987).

La implementación experimental para simular gradientes de TOD en biorreactores de laboratorio se realiza asumiendo que en el tanque de gran escala se distinguen dos zonas: una zona considerada como bien mezclada que corresponde físicamente a las regiones aledañas a los impulsores en movimiento, donde la transferencia de oxígeno resulta eficiente y por consiguiente se logran concentraciones de oxígeno adecuadas para el metabolismo celular, y otra zona, deficiente de oxígeno, localizada lejos de los impulsores, en donde las tensiones de oxígeno son bajas, llegando incluso a cero. Se ha desarrollado una variedad de diseños para la simulación de gradientes de TOD. Existen sistemas de dos compartimientos en donde los gradientes de TOD se llevan a cabo mediante recirculación del medio de cultivo entre dos biorreactores que pueden ser de diferente tipo y configuración, y sistemas de un solo compartimiento, como el que se diseñó en este estudio, en donde los gradientes de TOD se logran mediante la manipulación de la TOD en un solo reactor. Con este último tipo de diseño, se logra simular el tránsito de las células a través de las distintas zonas del biorreactor industrial (variable de espacio) mediante el cambio en el tiempo (variable temporal) de la TOD en un reactor que puede considerarse perfectamente mezclado.

Aportaciones relevantes de este trabajo

Hasta la fecha, la mayoría los estudios de escalamiento descendente en donde se han evaluado fluctuaciones de TOD, pH, o nutrientes han sido realizados para el cultivo de procariotes o eucariotes inferiores. El presente trabajo es uno de los primeros estudios formales de escalamiento descendente en el cultivo de células animales. Este tipo de trabajos abrirá una nueva línea de investigación para el estudio de las heterogeneidades en las variables de cultivo dentro del área de ingeniería del cultivo de células animales.

Específicamente, en este trabajo se desarrolló un sistema a nivel laboratorio para ensayar el efecto de la TOD oscilante sobre el cultivo de hibridomas y la producción de AcM. En el sistema diseñado se realizó una caracterización exhaustiva de los distintos parámetros cinéticos y estequiométricos, tanto a condiciones de TOD oscilantes como constantes. Los resultados permitieron proponer criterios y estrategias de escalamiento más racionales a los hasta ahora disponibles.

Capítulo 2 Antecedentes

Hibridomas y Anticuerpos monoclonales

La fusión celular entre una célula B, productora de anticuerpos, con una de mieloma tumoral, da por resultado un hibridoma que puede propagarse indefinidamente y que secreta anticuerpos con las características del linfocito B paterno (Köhler y Milstein, 1975). El producto secretado consiste en inmunoglobulinas homogéneas, de especificidad definida y constante de afinidad uniforme, ya que se derivan de una clona y por lo tanto se denominan anticuerpos monoclonales (AcM).

Principios del método de generación de hibridomas

La tecnología para la producción de los AcM surgió de la investigación básica en biología. Por una parte, en el área de inmunología, la posibilidad de inducir mielomas (células cancerosas) de ratón; es decir, generar mediante la estimulación con aceite mineral, células tumorales de linfocitos B (MOPC de su nombre en inglés “mineral oil plasmacitoma cell”) que secretan un solo tipo de inmunoglobulinas (Igs). En otra área de la experimentación, los biólogos celulares desarrollaron la fusión de células con diferentes caracteres genéticos para formar híbridos, portadores de cromosomas de ambas células paternas. Además, establecieron las técnicas para poder seleccionar los pocos híbridos formados de la gran población de células paternas no fusionadas.

En cuanto a la producción de Igs, se observó que en la fusión de dos mielomas diferentes, en la célula híbrida se expresaron los dos conjuntos paternos de cadenas ligeras y pesadas de las Igs, pero ensamblados como anticuerpos híbridos al azar. A pesar de esta mezcla de ensamble, la codificación de cada cadena permaneció inalterada, sin nuevas secuencias, mostrando estabilidad e independencia en el control y la expresión de los genes de las Igs de ambos genomas paternos. También se observó que al fusionar una variante no secretora de mieloma, no se suspendió -en el híbrido resultante- la producción y secreción de Igs por

efecto de la no secretora (Kuby *et al.*, 1999). Con estos principios básicos es posible diseñar experimentos en los que al fusionar con polietilenglicol una célula B -activada específicamente con un antígeno (Ag) definido- con un mieloma carente de expresión de Igs, resulta un hibridoma productor de AcM, cuya especificidad la determina la célula B paterna. Estos hibridomas se propagan continuamente *in vitro*, como líneas celulares que secretan al medio cantidades sustanciales de anticuerpos monoespecíficos y homogéneos en estructura y afinidad (Gavilondo, 1995).

Aplicaciones de los anticuerpos monoclonales

La singular capacidad que tienen los AcM de poder reconocer -en forma selectiva- un número prácticamente ilimitado de compuestos mediante la formación de un complejo antígeno-anticuerpo, ha sido explotada exitosamente en una variedad de aplicaciones, en campos como la medicina humana y veterinaria, el medio ambiente, la agricultura, la industria química, de alimentos y farmacéutica entre otros. Gracias a sus propiedades exclusivas de ser monoespecíficos hacia un determinante antigénico, homogéneos en su estructura, clase de Ig y constante de afinidad, resultan ser un reactivo ideal para estudios inmunoquímicos. Son un instrumento de precisión para el aislamiento e identificación de antígenos de relevancia biomédica, donde es posible producir AcM contra moléculas de baja inmunogenicidad o de escaso contenido en una mezcla de antígenos. Con los AcM es posible hoy día separar y purificar compuestos de relevancia biológica mediante la técnica de inmunoafinidad; lo cual permite estudiar la estructura molecular y actividad biológica de estos componentes.

Estado del arte sobre anticuerpos monoclonales para uso terapéutico

Actualmente los AcM con fines terapéuticos están dando un giro importante a la producción de medicamentos de origen proteico en el área médica. Como muestra de esto, tenemos que del año 1997 al 2001, han sido aprobados por la FDA ocho AcM para uso terapéutico (Glennie y Johnson, 2000). Véase Figura 2.1.

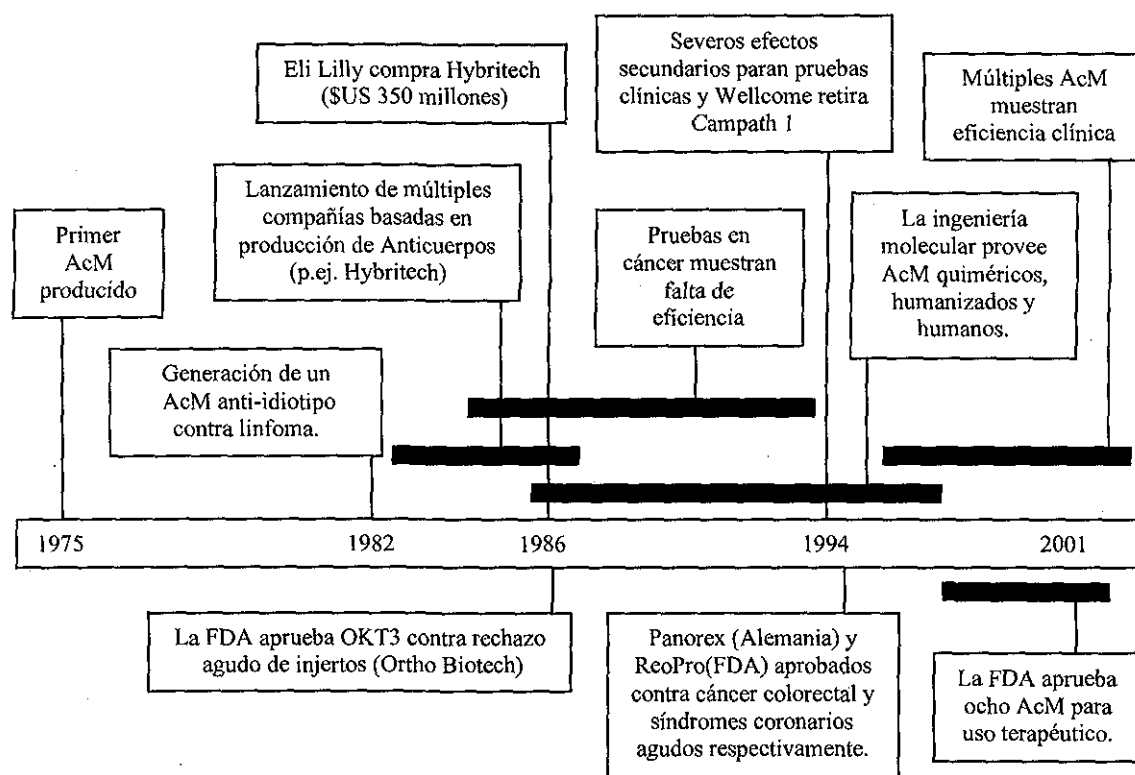


Figura 2.1. Eventos clave en la industria de los AcM de uso terapéutico (adaptado de Glennie y Johnson, 2000).

Los AcM son moléculas altamente específicas que sirven como una especie de “pegamento molecular” para unirse a un tipo específico de antígeno, habilidad que los hace excelentes para marcar células enfermas. Los AcM pueden ser usados en conjunto con otro agente terapéutico, p. ej. un isótopo radioactivo, de manera tal que el anticuerpo pueda llevar dicho agente a un sitio específico y desencadenar una respuesta. La radioactividad generada por el isótopo mata entonces a la célula no deseada de forma selectiva. Mylotarg[®], Bexxar[®] y Zevalin[®] son ejemplos exitosos de anticuerpos terapéuticos que llevan isótopos radioactivos.

Para el año 2001, siete AcM se encontraban ya en pruebas clínicas fase III, dos en fase II/III y 37 en pruebas preclínicas. La mayoría de estos AcM están dirigidos hacia el tratamiento de cáncer y enfermedades auto-inmunes (Ernst y Young, 2001). En la Tabla 2.1 se muestran los AcM de uso terapéutico que han sido aprobados hasta el año 2001.

Tabla 2.1. AcM de uso terapéutico aprobados hasta el 2001 (Ernst y Young, 2001; Glennie y Johnson, 2000).

Indicación	Antígeno de reconocimiento	Nombre del AcM	Tipo de AcM	Productor	Aprobado
Rechazo de injertos	CD3	Orthoclone/OKT3	Murine IgG2a	Ortho Biotech.	FDA-1986
Angioplastia coronaria	Glicoproteína	ReoPro	Fab Quimérico	Centocor/Lilly	FDA-1994
Cáncer colorectal	17-1A cell surface antigen	Panorex	Murine IgG2a	Glaxo Wellcome /Centocor	Alemania 1995
Rechazo de injertos	CD25	Zenapax	IgG1 Humanizado	Protein Design Lab. /Hoffman-La Roche	FDA-1997
Non-Hodgkin's Linfoma	CD20	Rituxan	IgG1 Quimérico	IDEC Pharm. /Genentech Roche/Zenyaku	FDA-1997
Rechazo de injertos	CD25	Simulect	IgG1 Quimérico	Novartis Pharm.	FDA-1998
Virus RSV	Proteína-F	Synagis	IgG1 Humanizado	Med Immune	FDA-1998
Cáncer de mama	HER2/neu	Herceptin	IgG1 Humanizado	Genentech	FDA-1998
Artritis Reumatoide	TNF- α	Infliximab	IgG1 Quimérico	Centocor	FDA-1999
Leucemia mieloide aguda	CD33	Mylotarg	AcM acoplado a quimioterapéutico	Celltech Group./ American Home Prod.	FDA-2000
Leucemia linfocítica crónica	CD25	Campath	AcM-Humanizado	Millennium Pharm. /Berlex Lab.	FDA-2001

El oxígeno

Importancia del oxígeno en los cultivos de hibridomas

El oxígeno es sin duda alguna uno de los sustratos más importantes en los cultivos de células animales y, debido a la baja solubilidad que tiene en el medio, debe ser continuamente suplementado al cultivo ya que puede afectar directa o indirectamente el metabolismo celular. En cultivos de células inmovilizadas, en cultivos suspendidos e incluso en tumores, en donde se alcanzan altas concentraciones celulares, la formación de gradientes de TOD parece inevitable por lo que las células estarán expuestas a bajas concentraciones de TOD. Esto a su

vez puede originar alteraciones en el metabolismo de las principales fuentes de carbono y energía (glucosa y glutamina), así como de los principales desechos metabólicos (lactato y amonio).

El oxígeno es un elemento esencial para la eficiente producción de energía (ATP), ya que participa como aceptor final de electrones y protones producidos en las reacciones de oxidación de la cadena respiratoria (Lodish *et al.*, 2000). El oxígeno disuelto es también el mayor determinante del potencial redox del cultivo, el cual tiene importantes implicaciones en el crecimiento, metabolismo y producción de metabolitos de interés (Hwang y Sinskey, 1991). En la Figura 2.2 se muestran un esquema de las vías principales del metabolismo de glucosa y glutamina así como de la formación de lactato y amonio (Miller *et al.*, 1988).

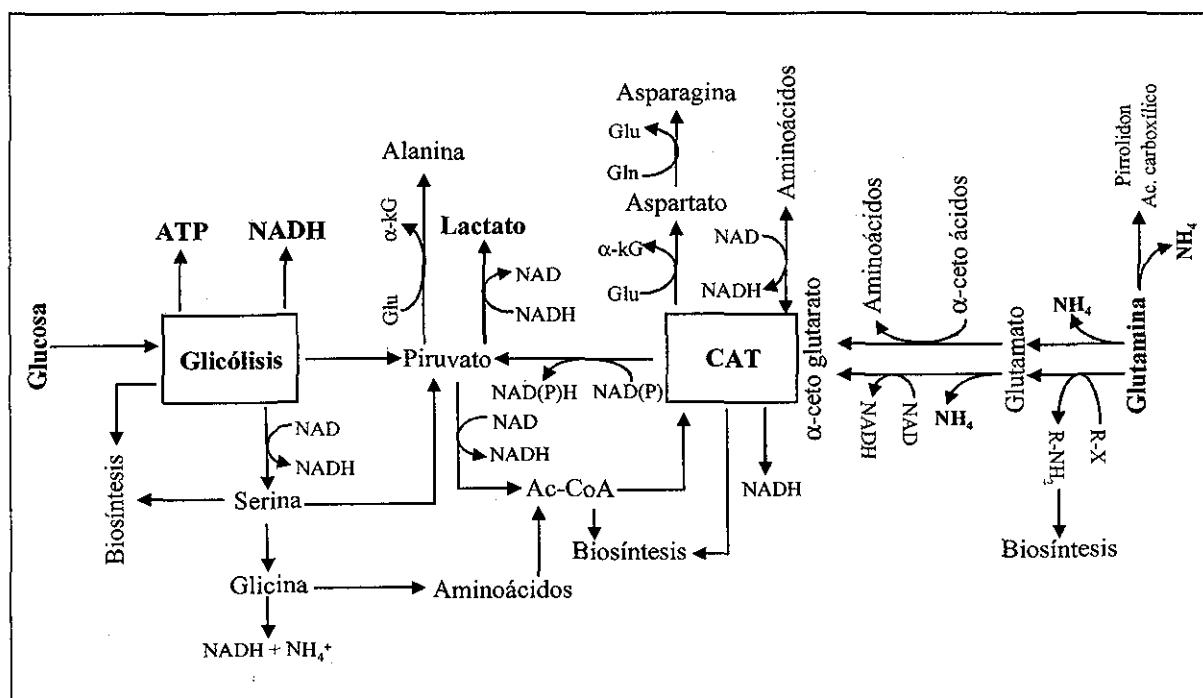


Figura 2.2. Esquema de las principales vías metabólicas en hibridomas (adaptado de Miller *et al.*, 1988).

Influencia del oxígeno en el metabolismo de glucosa

En todas las células de mamífero, la glucosa es convertida a piruvato vía glicólisis. Ante la presencia de un exceso de oxígeno, éstas células convierten el piruvato a acetil-CoA mediante

su oxidación en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT). El NADH formado en el CAT y glicólisis, es regenerado a NAD^+ dentro de la mitocondria, en un proceso acoplado a producción de ATP vía la fosforilación oxidativa, en donde el oxígeno es utilizado como acarreador de electrones y los productos finales son CO_2 y H_2O (Nelson y Cox, 2000).

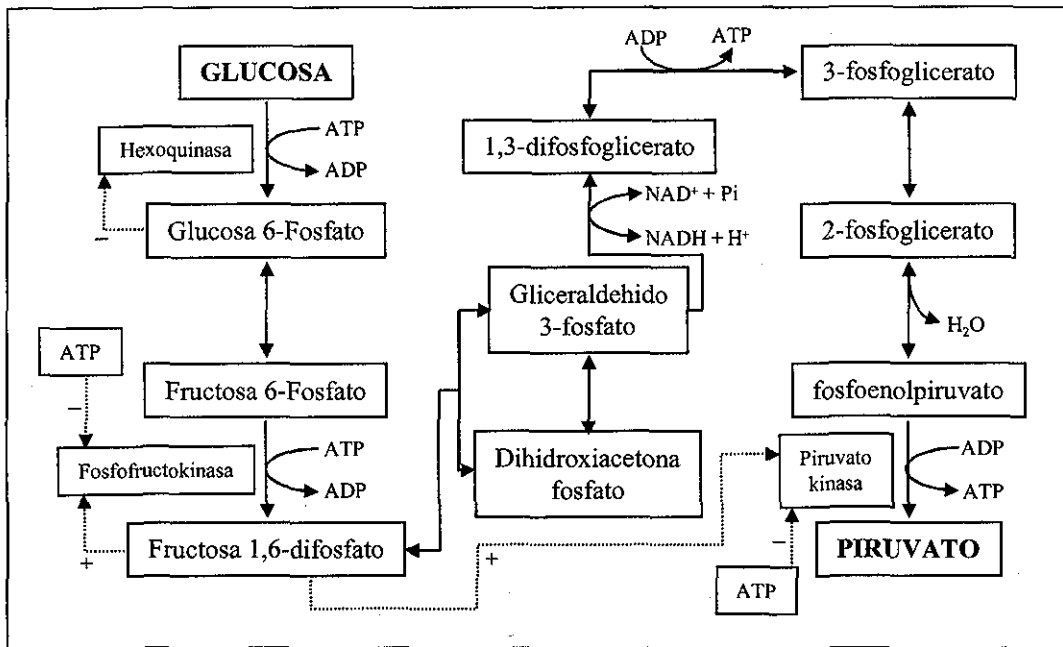


Figura 2.3. Esquema de la ruta glicolítica y su regulación en hibridomas (adaptado de Miller *et al.*, 1988).

La producción de acetil-CoA por glicólisis para la producción de energía en estas células, está regulada mediante la inhibición de la fosfofructoquinasa (PFK) por exceso de ATP. Si la PFK es inhibida, entonces habrá una acumulación de glucosa 6-fosfato (G6-P), que provocará a su vez la inhibición de la hexoquinasa, con lo que se bloquea la glicólisis. Véase Figura 2.3. Bajas concentraciones de oxígeno ocasionan que la producción de ATP mitocondrial se vea reducida, con lo cual la PFK es reactivada, generando una alta concentración de fructosa 1,6-difosfato (fructosa 1,6-P) que a su vez estimula a la PFK y a la piruvato quinasa (PK). El agotamiento resultante de glucosa 6-P promueve la actividad de la hexoquinasa, con lo que se producen grandes cantidades de piruvato. Debido a la baja velocidad en la fosforilación oxidativa, la gran cantidad de piruvato que se ha formado es convertido a lactato para reoxidar el NADH generado en la glicólisis (Miller *et al.*, 1988).

En el caso de células que crecen en cultivo, células tumorales y otras células proliferantes como los hibridomas, se presentan altas velocidades de glicólisis aerobia (producción de altas concentraciones de lactato incluso a altas concentraciones de oxígeno) que son similares a las encontradas en células normales bajo limitaciones de oxígeno. Este fenómeno puede deberse a que muchas células transformadas presentan un incremento de los niveles de las enzimas glicolíticas, a que algunas isozimas glicolíticas presentan diferentes propiedades cinéticas y regulatorias o tienen una afinidad menor por el inhibidor.

Influencia del oxígeno en el metabolismo de glutamina

Junto con los carbohidratos, los aminoácidos son la fuente de carbono reducido más abundante en el plasma de los mamíferos y se puede disponer de ellos para el metabolismo oxidativo. La glutamina, por sí sola, es el aminoácido más abundante. La mayoría de las células normales producen glutamina *in vivo* (Nelson y Cox, 2000). En contraste, las células tumorales o células normales que proliferan en cultivo, en general exhiben altas velocidades de consumo de glutamina (glutaminólisis). Durante la glutaminólisis, la mayoría del esqueleto de carbón de la glutamina entra al CAT como α -cetoglutarato (ver Figura 2.2) para ser oxidado hasta CO_2 y agua o para la generación de lactato, lo que contribuye a elevar de manera muy significativa los niveles de éste último en el medio de cultivo. La glutaminólisis es una secuencia de reacciones catalizadas por siete enzimas de las cuales cinco son del CAT. Ocurre entre dos compartimentos, inicia y finaliza en el citosol y los pasos intermedios ocurren en la mitocondria. Los valores reportados para la fracción de átomos de carbono de glutamina convertidos a CO_2 van de un 35 % a un 55 %. Otros productos de la glutaminólisis incluyen lactato, glutamato, citrato y alanina, tomando en cuenta que el nivel de oxidación de la glutamina depende importantemente de la línea celular (McKeehan, 1982).

Miller *et al.* (1987) reportaron, para hibridomas en cultivo continuo, que la concentración celular viable en el estado estacionario fue aumentando conforme la TOD disminuía: partiendo de 2.8×10^6 cel/mL a un 100 % de TOD, alcanzando un máximo de 3.8×10^6 cel/mL a 0.5 % de TOD. Por debajo de 0.5 % de TOD, observaron que la concentración celular comenzó a disminuir como consecuencia de la falta de oxígeno para poder oxidar la

glutamina. Los resultados de Miller *et al.* muestran una alta concentración de glutamina residual así como un cambio mínimo en la concentración de glutamato por debajo de 0.5 % de TOD, lo que refuerza la suposición de que la glutaminasa está indirectamente regulada por oxígeno, siendo la enzima que limita la entrada de la glutamina al CAT (Miller y Blanch, 1991).

Influencia del oxígeno en el potencial redox del cultivo (PRC)

La concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo es uno de los principales determinantes del PRC y éste, en consecuencia, tiene un marcado efecto en el crecimiento y metabolismo de las células animales. Se ha observado que el potencial redox del cultivo tiene efectos en los niveles enzimáticos del CAT, niveles de citocromos, concentraciones de ATP, así como en los niveles de hidrogenasas. Se ha reportado, por ejemplo, que a PRC reductores, el crecimiento y la producción de AcM por hibridomas se ve favorecida (Hwang y Sinskey, 1991). Meneses (2001) realizó un estudio del efecto del PRC sobre el cultivo en lote de hibridomas; encontró que la TOD presenta un comportamiento logarítmico con respecto al PRC. Es decir, en el caso de cultivos reductores, un cambio en la TOD es proporcional a un cambio en el PRC y en el caso de cultivos oxidantes, se necesitaron grandes cambios de TOD para lograr pequeñas variaciones del PRC. Sus resultados muestran un aumento en los rendimientos de glucosa y glutamina, así como un aumento en la velocidad específica de producción de AcM a valores reductivos de PRC (alrededor de 0 mV). También determinó que, bajo ambientes altamente oxidantes (90 mV), las velocidades específicas de consumo de nutrientes aumentaron y la velocidad específica de producción de AcM disminuyó. Asimismo, observó que ante un ambiente oxidativo se presenta apoptosis prematura, aún en presencia de nutrimentos.

Medición de la concentración de oxígeno disuelto

La concentración de oxígeno disuelto (C_L) en el medio de cultivo en biorreactores se mide mediante un electrodo o sensor de oxígeno disuelto. Existen dos tipos que son de uso común:

los electrodos galvánicos y los electrodos polarográficos (Atkinson y Mavituna, 1987; Johnson *et al.*, 1964). En ambos casos existe una membrana semipermeable al oxígeno que separa el fluido de cultivo del electrodo. El oxígeno difunde a través de la membrana hacia el cátodo, donde reacciona y produce una corriente entre el ánodo y el cátodo, que es proporcional a la presión parcial de oxígeno presente en el medio de cultivo. Tanto los electrodos galvánicos como los polarográficos miden la presión parcial de oxígeno disuelto (pO_2) llamada también tensión de oxígeno disuelto (TOD) en el medio y no la concentración de oxígeno disuelto. Para convertir la respuesta del electrodo a concentración de oxígeno es necesario conocer la solubilidad del oxígeno en el líquido a la temperatura y presión de la medida (Lee y Tsao, 1979; Doran, 1998).

Tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno disuelto

El suministro de moléculas de oxígeno del medio de cultivo al cátodo del electrodo es, en sí mismo, un proceso de transferencia de materia. Puesto que no existe movimiento del fluido en la membrana y la solución electrolítica del electrodo así como escaso movimiento en la película líquida existente en la interfase de la membrana, la operación del electrodo se debe a la difusión del oxígeno a través de éstas resistencias. Esto requiere tiempo, por lo que la respuesta del electrodo a cambios repentinos en el nivel de oxígeno disuelto está sujeto siempre a un cierto retraso.

El tiempo de respuesta del electrodo puede medirse fácilmente pasando el electrodo de un recipiente saturado con nitrógeno a otro saturado con aire. El tiempo de respuesta se define como el tiempo que tarda el electrodo en indicar el 63.2 % (porcentaje de respuesta en el cual se alcanza la constante de tiempo para cualquier proceso modelado por un sistema de primer orden y que es una medida del tiempo necesario para que un proceso se ajuste a un cambio en la variable de entrada) del cambio total en el nivel de oxígeno disuelto (Stephanopoulos, 1987). Para los electrodos comerciales esterilizables con vapor, los tiempos de respuesta varían entre 10 y 100 segundos (De León, 1996; Doran, 1998).

Suministro de oxígeno

Independientemente del tipo de organismo, el biorreactor debe permitir un contacto tan bueno como sea posible entre la fase biótica (organismo) y abiótica del sistema. El crecimiento adecuado de un organismo está asociado íntimamente a los fenómenos de transferencia de masa entre células y el medio de cultivo. En este punto, la transferencia de nutrientes al interior de la célula depende en gran medida de la capacidad del biorreactor para mantener homogéneo el medio de cultivo. En vista de que el oxígeno es un nutriente muy poco soluble en medios acuosos, debe suministrarse continuamente mediante la aireación. La agitación por su parte interviene de dos maneras: mediante la operación de micromezclado, que consiste en el rompimiento de las burbujas y la disminución del espesor de la capa de líquido estática (capa límite) que las recubre contribuyendo a la transferencia de oxígeno y mediante el macromezclado, que consiste en la transferencia de momentum al medio de cultivo. Con la agitación se pretende homogenizar el medio de cultivo y en consecuencia, evitar la formación de gradientes (Doran, 1998).

Para tener una idea de la dificultad que representa la transferencia de oxígeno hacia el medio de cultivo y de éste hacia las células, hay que mencionar que es un proceso en el cual se deben superar una serie de resistencias al transporte, antes de que el oxígeno pueda ser utilizado por las células. Cuando las células se encuentran dispersas en el líquido y el caldo de fermentación se encuentra mezclado perfectamente, la mayor resistencia a la transferencia de oxígeno al medio de cultivo corresponde a la película líquida que rodea las burbujas de gas, por lo tanto, se le considera el paso limitante del proceso y controla la velocidad global de transferencia de materia (Bailey y Ollis, 1986).

La ecuación de transferencia de oxígeno (Ec. 2.1) muestra que la velocidad de transferencia depende de un gradiente de concentración que actúa como fuerza impulsora ($C_g^* - C_L$) y de la capacidad del fermentador para transferir oxígeno, representado por el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$):

$$Na = k_L a (C_g^* - C_L) \quad (2.1)$$

Dentro de las estrategias utilizadas para mejorar la velocidad de transferencia de oxígeno al medio de cultivo, se encuentran las que afectan al k_La , como puede ser aumentar la agitación o incrementar el flujo de gases por unidad de volumen de biorreactor. En el caso de los cultivos de células animales, donde no es recomendable utilizar altas velocidades de agitación o aireación debido a la fragilidad que presentan las células, la estrategia es manipular la fuerza impulsora, cambiando el nivel de C_g^* mediante el aumento de la solubilidad del oxígeno o introduciendo al reactor mezclas de gases con alto contenido de oxígeno, en vez de utilizar solamente aire (Bailey y Ollis, 1986).

El k_La es un parámetro que se utiliza para caracterizar la capacidad de transferencia de oxígeno de los fermentadores. Si el k_La para un determinado sistema es pequeño, su capacidad para suministrar oxígeno será también limitada. En la Tabla 2.2 se muestran algunos valores representativos de k_La para reactores de células animales, así como para reactores de procariotes.

Tabla 2.2. Valores de k_La representativos para un reactor bacterianos y de células animales.

Línea celular	Tipo de reactor	k_La (h ⁻¹)	Fuente
Células animales	Columna burbujeada (10 m ³)	9	Tramper, 1995
Bacteriano	Reactor agitado (25 m ³)	45-98	Oosterhuis y Kossen, 1984
Células animales	Reactor agitado (8 m ³)	1-10	Langheinrich y Nienow, 1996

Una consecuencia de las bajas velocidades de agitación y aireación que se utilizan en los cultivos de células animales a gran escala -con la finalidad de evitar el daño celular- es que los valores de k_La son bajos en comparación con los alcanzados en otros sistemas de cultivos más dinámicos como los bacterianos (ver Tabla 2.2). Lo anterior representa un problema ya que una de las estrategias para poder alcanzar altas concentraciones de producto y hacer

rentables a éstos sistemas de expresión es mediante cultivos que alcancen altas densidades celulares. Es decir, se necesita pasar de las concentraciones celulares actualmente obtenidas - del orden de 0.5×10^6 - 5×10^6 cel /mL- a concentraciones de 0.5×10^8 - 5×10^8 cel /mL (Sauer *et al.*, 2000; Elias *et al.*, 2000). El alcanzar tales concentraciones celulares ocasionaría que los sistemas de cultivo convencionales no tendrían la capacidad para satisfacer las altas demandas de oxígeno que se generarían. Esto a su vez provocaría la formación de gradientes de oxígeno y la exposición de las células a concentraciones de oxígeno por debajo de las críticas (Langheinrich *et al.*, 1998; Tramper *et al.*, 1996).

Consumo de oxígeno

La demanda específica de oxígeno de un organismo (qO_2) depende, en primer lugar, de la naturaleza bioquímica de la célula y de su medioambiente nutricional. En la Tabla 2.3 se muestran los valores de qO_2 para diferentes líneas celulares animales.

Tabla 2.3. Valores de qO_2 representativos para células animales.

Línea celular	qO_2 (mol O_2 / cel h x 10^{-13})	Fuente
Células de insecto	1.26 - 3.56 0.70 - 3.82	Agathos, 1996 Palomares y Ramírez, 1996
Hibridomas	0.5 - 5.0 3.0 - 4.0	Miller <i>et al.</i> , 1987 Higareda, 1994
BHK 21	3.18	Leist, 2001
HeLa	1.0 - 5.0	Leist, 2001
Células hematopoyéticas	0.57 - 4.1	De León, 1999

Cuando la concentración de oxígeno disuelto en el medio (C_L) se sitúa por debajo de cierto nivel (denominado concentración crítica, C_{crit}), la velocidad específica de consumo de oxígeno (qO_2) depende también de la concentración de oxígeno en el medio (C_L), siguiendo

por lo general una cinética de tipo Monod (Doran, 1998). Si C_L es superior a la concentración de oxígeno crítica (C_{crit}), entonces q_{O_2} adquirirá un valor constante, máximo e independiente de C_L . Si C_L es menor a C_{crit} , entonces q_{O_2} mostrará una fuerte dependencia con la concentración de oxígeno. Para eliminar las limitaciones ocasionadas por falta de oxígeno y permitir al metabolismo celular funcionar a su mayor velocidad, la concentración de oxígeno disuelto en cada punto del biorreactor debe ser mayor a la crítica.

Miller *et al.* (1987) realizaron un barrido de TOD en el intervalo de 0.1 % a 100 % (respecto a la saturación con aire), para evaluar el efecto de la concentración de oxígeno disuelto en el crecimiento y metabolismo de hibridomas en cultivo continuo. Ellos reportan que la TOD óptima para el crecimiento fue de 0.5 % y por debajo de esta se vuelve crítica. También reportan que la TOD óptima para la producción del AcM fue de 50% y la disminución de la q_{O_2} solo se presentó por debajo de 10 %. Los resultados del estudio de Miller *et al.* son interesantes porque muestran que no existe una sola concentración óptima ni una crítica para todos los parámetros del cultivo.

Más recientemente, Heidemann *et al.* (1998) reportaron para cultivos continuos de hibridomas y células CHO, que solo a concentraciones por debajo de 5 % de TOD se empieza a observar una ligera disminución de las velocidades de producción de proteína y un aumento en la velocidad de producción de lactato y de consumo de glucosa. También reportaron una C_{crit} de TOD para el crecimiento, por debajo de 1 %.

Palomares y Ramírez (1996) realizaron un barrido de TOD en el intervalo de 0 % a 30 % (respecto a la saturación con aire) para evaluar el efecto de la concentración de oxígeno disuelto en el crecimiento y metabolismo de células de insecto, en cultivos por lote sin infectar. Ellos encontraron que solo por debajo de 10 % de TOD, el metabolismo celular comenzó a verse afectado. Reportaron que las velocidades específicas de crecimiento y de consumo de oxígeno mostraron un comportamiento tipo Monod con respecto a la TOD. La μ_{Max} y $q_{O_2,Max}$ calculadas fueron 0.033 h^{-1} y $3.82 \times 10^{-13} \text{ molO}_2 \text{ cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y sus correspondientes constantes de saturación (K_{O_2}) fueron 1.91% y 1.57% de TOD.

La velocidad de consumo de oxígeno (VCO) depende del número de células en el medio de cultivo y, por consiguiente, aumenta en forma exponencial durante un cultivo por lote. En cualquier punto de la curva de crecimiento celular, la VCO viene dada por la ecuación 2.2.

$$VCO = q_{O_2} X \quad (2.2)$$

En la Tabla 2.4 se muestran los valores de VCO representativos para tres clases diferentes de células (en el caso de células animales, los valores están estimados a una concentración celular de 2×10^6 cel/mL). Como podemos observar en dicha tabla, las demandas volumétricas de oxígeno para células de mamífero que se alcanzan bajo los procedimientos convencionales de cultivo, son mucho más bajas que las observadas para hongos, levaduras o bacterias. Sin embargo, la situación se complica con las nuevas tecnologías de cultivo, en donde a través de cultivos alimentados o en perfusión, se pretende obtener altas concentraciones celulares (en el orden de $0.5 - 5.0 \times 10^8$ cel/mL) y las demandas volumétricas de oxígeno alcanzan dimensiones comparables ($0.025 - 0.25$ mol O_2 / L h) a las de las mismas bacterias, hongos o levaduras.

Tabla 2.4. Valores de VCO representativos para procariotes y eucariotes.

Organismo	VCO (mol O_2 / L h)	Referencia
Bacteria (<i>E. Coli</i>)	± 0.46	Konz <i>et al.</i> , 1998
Hongos y Levaduras	0.013 – 0.19	Miller y Blanch, 1991
Células animales	$0.1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-3}$	Miller y Blanch, 1991
Híbridomas	$0.1 \times 10^{-3} - 0.4 \times 10^{-3}$	Higareda, 1994
Células de insecto	$0.1 \times 10^{-3} - 0.6 \times 10^{-3}$	Palomares y Ramírez, 1996
Células hematopoyéticas	$0.9 \times 10^{-5} - 6.0 \times 10^{-5}$	De Leon, 1999

Dados los bajos coeficientes de transferencia de oxígeno para reactores de cultivo de células animales, tales demandas de oxígeno son difíciles de satisfacer y la presencia de gradientes de TOD se torna inevitable. Lo anterior es una razón más de la importancia de entender el

efecto que puede tener la presencia de gradientes de oxígeno disuelto en los cultivos de células animales, para anticiparse a esta problemática.

Escalamiento

El escalamiento se define como el traslado de cualquier proceso (de fermentación, purificación, cultivo, etc.) de una escala de operación a otra de mayor o menor magnitud.

El escalamiento ascendente (*scale-up*) del proceso de cultivo de células animales se refiere al escalamiento de un cierto volumen de operación a otro mayor. Bajo este contexto se dice que existen tres escalas de operación: escala laboratorio, escala piloto y escala industrial. Durante el proceso de escalamiento ascendente se desea mantener constantes la mayor cantidad posible de parámetros operacionales, con la finalidad de que el desempeño del cultivo a gran escala no se vea afectado en cuanto a rendimientos o productividades.

El escalamiento descendente (*scale-down*) del proceso de cultivo de células animales se refiere al escalamiento desde un cierto volumen de operación a otro menor, generalmente de escala industrial a escala laboratorio. En el escalamiento descendente, lo que se desea, es conocer y entender los fenómenos que están afectando los rendimientos y/o productividades de los reactores a gran escala, con la finalidad de mejorar el proceso.

Escalamiento ascendente (scale-up)

La escala de operación de los cultivos de células animales se ha incrementado considerablemente con la finalidad de poder satisfacer las demandas de los productos terapéuticos recombinantes actuales y es muy probable que este incremento continúe. En la actualidad, el tipo de reactor más comúnmente utilizado es el reactor agitado (los reactores tipo *air-lift* son también usados, pero en menor proporción). Sin embargo, hasta el momento, no existe o no se ha publicado una metodología o lineamiento específico para el cultivo de células animales a gran escala en reactores de 10,000 litros o superiores, por lo que el diseño

de reactores a gran escala se basa en las metodologías utilizadas para reactores microbianos (Varley y Birch, 1999).

La metodología clásica y más utilizada para el escalamiento de los procesos de fermentación se basa en mantener la similitud geométrica durante el escalamiento. Sin embargo, esta metodología tiene el inconveniente de que solamente una variable fundamental se puede mantener constante, mientras que las demás varían (Einsele, 1978). Entre los parámetros más comúnmente utilizadas se encuentran la potencia por unidad de volumen (P/V), el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$), la velocidad en la punta del impulsor (ND) y el número de Reynolds (Re), entre otros. Como se observa en la Tabla 2.5, el resultado de utilizar algunos de estos parámetros (P/V , Re , ND) como criterio de escalamiento, da como resultado, bajas velocidades de agitación que sean a su vez la causa de un ambiente heterogéneo y mal mezclado, en donde la formación de gradientes se torna inevitable. Otra consecuencia del mal mezclado es la reducción en la transferencia de oxígeno, lo que resulta considerablemente crítico en los procesos aerobios, donde el oxígeno interviene de forma directa sobre la síntesis de producto o indirectamente afectando la velocidad específica de crecimiento (Oldshue, 1966).

Tabla 2.5. Efecto del escalamiento de un reactor de 40 L a 10,000 L, sobre las principales variables de cultivo, utilizando diferentes criterios de escalamiento.

Parámetro	Escala Piloto (80 L)	Escala Industrial (10,000 L)			
		125	3125	25	0.2
P	1.0	125	3125	25	0.2
P/V	1.0	1.0	25	0.2	0.0016
N	1.0	0.34	1.0	0.2	0.04
D	1.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Q	1.0	42.5	125	25	5.0
Q/V	1.0	0.34	1.0	0.2	0.04
ND	1.0	1.7	5.0	1.0	0.2
Re ($ND^2 \rho / \mu$)	1.0	8.5	25.0	5.0	1.0

(Oldshue, 1966)

El problema fundamental del escalamiento de un proceso de cultivo, y por el cual no se alcanzan los rendimientos o productividades que se observan en el reactor de laboratorio, es que el parámetro que se desea mantener constante durante el escalamiento depende de otros parámetros que, siendo diferentes entre sí (P, ND, Q, N, D, P/V, Re, etc.), se encuentran interrelacionados, obteniéndose como resultado un sistema de mayor volumen pero con características hidrodinámicas muy diferentes a las del reactor de laboratorio (Oldshue, 1966).

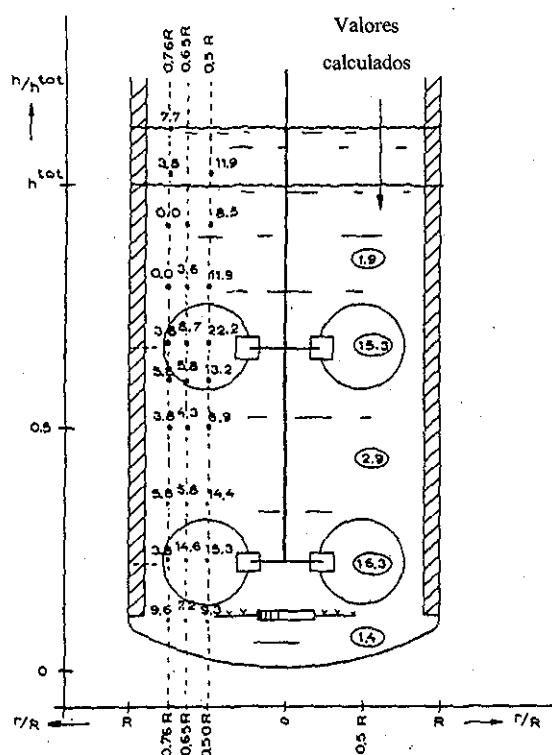
Evidencia de gradientes de oxígeno disuelto en reactores a gran escala

En los biorreactores agitados de gran escala utilizados para procesos microbianos de producción, la deficiencia en el mezclado de la fase líquida puede afectar fuertemente la transferencia global de oxígeno, lo cual puede resultar en la presencia de gradientes de concentración de oxígeno disuelto, especialmente en caldos de cultivo de alta viscosidad. Sin embargo, en medios de cultivo de baja viscosidad, como en cultivos de células animales, en donde las velocidades de agitación son bajas, la presencia de gradientes de oxígeno disuelto también es posible que ocurra. Estos gradientes son causados por los relativamente altos tiempos de circulación de la fase líquida, comparados con los tiempos característicos para el consumo y la transferencia de oxígeno (como se verá en detalle en la sección de análisis de régimen).

Manfredini *et al.* (1983) monitorearon la tensión de oxígeno disuelto en diferentes zonas de un biorreactor de 112 m³ utilizado en la producción de tetraciclinas por *Streptomyces aureofaciens*. Encontraron la presencia de gradientes axiales y radiales de TOD en las zonas monitoreadas. Con sus resultados, propusieron un modelo simple con el que fue posible predecir la distribución de TOD en todo el biorreactor.

Oosterhuis y Kossen, (1984) demostraron la presencia de gradientes de TOD en biorreactores de gran escala (20 m³) para cultivos bacterianos mediante el monitoreo con sensores de TOD colocados a lo largo del tanque. Como se puede apreciar en la Figura 2.4, ellos encontraron que, en los alrededores del impulsor, se presentaban valores de TOD de 22 a 14 % (con

respecto a la saturación con aire) y que al moverse en forma radial, las tensiones de oxígeno decrecían a valores de 3 % a la altura de los impulsores y hasta de cero en las lejanías de éstos. Concluyeron que la presencia de los gradientes se debe a que el tiempo característico de mezclado es relativamente más grande que el tiempo característico de transferencia de oxígeno.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2.4. Valores medidos y calculados de TOD para un reactor bacteriano de 20 m³ (adaptado de Oosterhuis y Kossen, 1984).

El insuficiente mezclado en tanques agitados para el cultivo de células animales, es causante de significativos problemas en cultivos de mielomas, hibridomas, células CHO y células de insecto, sobre todo cuando se alcanzan altas densidades celulares. Ejemplos de lo anterior son la acumulación de altas concentraciones de CO₂, gradientes de pH, limitaciones de oxígeno, e incluso segregación de la concentración de microacarreadores. Hasta la fecha no existen reportes en la literatura de estudios hechos en reactores de células animales a gran escala, donde se realicen mediciones de TOD en diferentes puntos del biorreactor para determinar si existe la formación de gradientes de TOD. Sin embargo, sí existen reportes en donde se realizan determinaciones teóricas y experimentales de tiempos característicos y en base a

análisis de régimen (como veremos en detalle más adelante) se estima la posibilidad de formación de gradientes o de limitación de oxígeno disuelto.

Escalamiento descendente (scale-down)

El concepto de escalamiento descendente surgió de la necesidad de conocer el efecto que pueden tener los problemas que se presentan en los biorreactores de gran escala sobre determinado proceso. La metodología clásica del escalamiento descendente consiste en detectar el o los mecanismos limitantes del proceso y poderlos reproducir de manera independiente en simuladores de pequeña escala, manteniendo constantes todas las demás variables de cultivo y sin la necesidad de mantener similitud geométrica. En la Figura 2.5 se muestra el procedimiento de escalamiento descendente propuesto por Oosterhuis y Kossen, (1987). En este procedimiento se distinguen cuatro etapas: (1) análisis de régimen del proceso en escala de producción; (2) simulación -en escala laboratorio- del mecanismo limitante del proceso; (3) optimización y modelamiento del proceso -en escala laboratorio-; (4) optimización del proceso -a escala de producción- mediante la traslación de las condiciones optimizadas a escala laboratorio.

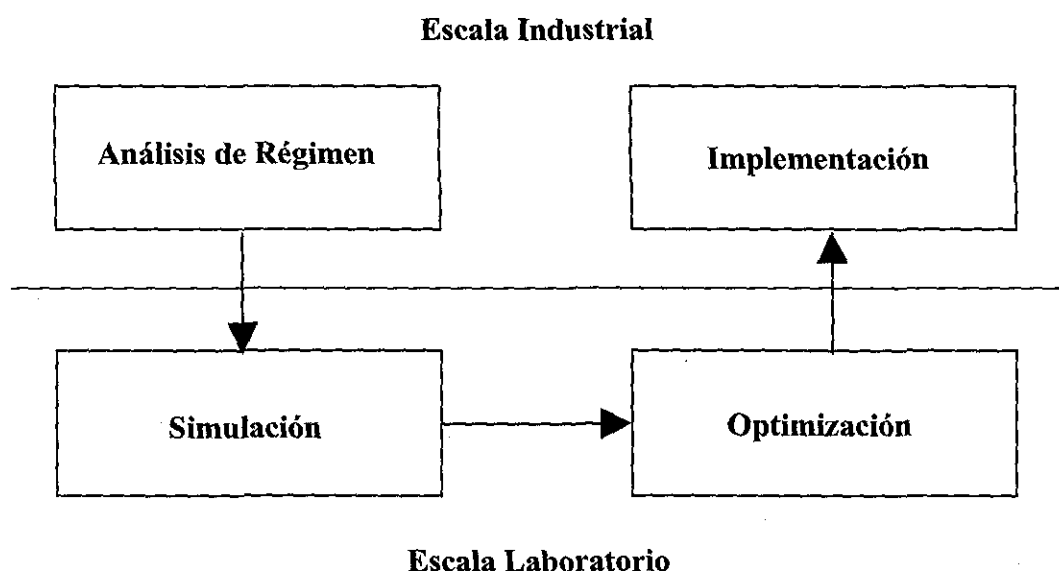


Figura 2.5. Etapas del escalamiento descendente.

El análisis de régimen debe de dar respuestas a preguntas tales como: ¿Cuáles son los mecanismos limitantes del proceso?. En otras palabras: ¿Cuál es el régimen gobernante en el proceso?, ¿Son los mecanismos de los fenómenos de transporte (transferencia de masa y calor) los que gobiernan el proceso?, o son los procesos catalíticos (consumo de oxígeno, crecimiento o producción de calor). Del conocimiento generado a través del análisis de régimen se puede concluir cuales son los mecanismos que deben ser simulados en pequeña escala. Durante la simulación, el requerimiento más importante para llevar a cabo los experimentos en escala laboratorio es que deben ser representativos de las condiciones prevalecientes en el reactor de gran escala. Esto determinará las posibilidades y los límites de los experimentos en pequeña escala, así como el éxito del estudio. La optimización del proceso en pequeña escala es la tercera etapa del escalamiento descendente. En esta etapa se debe tener en cuenta que los parámetros optimizados se van a trasladar al proceso a gran escala. En consecuencia, no todos los resultados de la optimización se utilizan. En la última etapa, las condiciones optimizadas en el reactor de laboratorio, son trasladadas al reactor industrial.

Análisis de régimen y tiempos característicos

El análisis de régimen nos permite determinar cuál es el paso limitante de nuestro proceso. Se realiza mediante la comparación de parámetros característicos de los principales subprocesos del sistema. Dependiendo del sistema que se estudie, se seleccionará el parámetro característico idóneo de comparación, como pueden ser: presiones características, alturas características, tiempos característicos, etc.

Para la comparación de la velocidad de los procesos, el tiempo (t) es el mejor parámetro característico. Así, los tiempos característicos (t_{ca}) son una medida de la velocidad de los procesos dentro del biorreactor. Un valor pequeño en un t_{ca} nos indica un proceso que se lleva a cabo rápidamente, mientras que un valor alto, refleja un proceso lento. Los tiempos característicos pueden ser determinados teóricamente, a partir de correlaciones existentes en la literatura o bien ser determinados experimentalmente (Sweere *et al.*, 1987).

Los tiempos característicos para la formación de producto o consumo de sustrato pueden ser determinados experimentalmente en reactores de laboratorio y, los tiempos característicos de mezclado, circulación, de transferencia de masa, etc., pueden ser calculados experimentalmente en los reactores a gran escala o ser estimados mediante correlaciones de la literatura.

El tiempo característico de mezclado de un biorreactor (t_m) es un parámetro útil para valorar la efectividad del mezclado y se define como el tiempo necesario para alcanzar un cierto grado de homogeneidad (generalmente cuando se alcanza del 90 al 95 % de la respuesta total) en el medio de cultivo, partiendo de un estado completamente segregado. Su determinación se hace inyectando un pulso de trazador en el biorreactor y midiendo su concentración en un determinado punto a diferentes tiempos. Los trazadores pueden ser: ácidos, bases, soluciones salinas concentradas, agua caliente, colorantes, etc. y los detectores pueden ser electrodos de pH, termómetros, celdas de conductividad, etc. En la Figura 2.6 se muestra una grafica típica del perfil de concentraciones contra tiempo durante la determinación experimental del tiempo de mezclado (Doran, 1998).

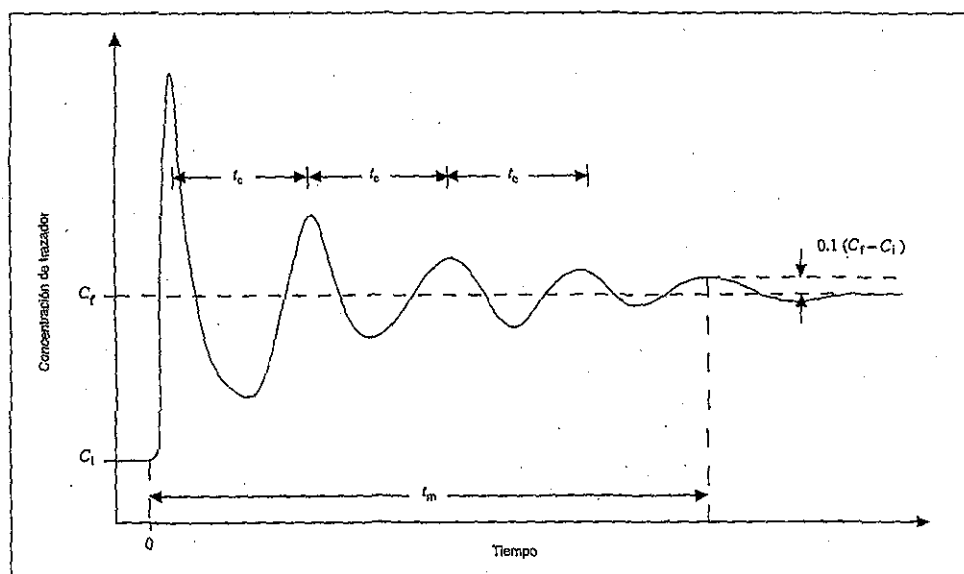


Figura 2.6. Gráfica de la determinación del tiempo característico de mezclado (tomado de Doran, 1998).

Como se observa en la Figura 2.6, el t_m es el tiempo necesario para pasar de una concentración (C) en el momento que se adiciona el trazador, hasta alcanzar el 90 % de la respuesta total $C_f [0.1(C_f - C_i)]$. Se puede observar también en la figura que, antes de que la mezcla del biorreactor sea completa y se alcance la homogeneidad, se detecta una concentración relativamente alta cada vez que el flujo de líquido acerca al trazador al punto de medición. Tales picos en la concentración se encuentran separados por un período de tiempo aproximadamente igual al tiempo medio que requiere el fluido para recorrer una vuelta al tanque. Para los tanques agitados, éste período de tiempo se denomina tiempo característico de circulación (t_c) (Doran, 1998). Si bien el t_m es de gran utilidad, es más común referirse al t_c , definido como el tiempo necesario para que una partícula discreta de fluido realice un ciclo a través de las regiones que definen al biorreactor. En otras palabras, los t_c nos dan información sobre la frecuencia con la que pasan las células a través de una región determinada dentro del biorreactor.

Con base en los experimentos que se han realizado para el cálculo de t_m (como se ilustró en la Figura. 2.6), se estableció una de las correlaciones para calcular el tiempo de circulación, en donde, para un líquido de una fase, en un tanque agitado con varios deflectores y un impulsor estándar, existe una relación entre el tiempo de mezclado y el tiempo de circulación (Ec. 2.3).

$$t_M = 4 t_c \quad (2.3)$$

Anderson *et al.* (1982) reportaron que los t_c para tanques agitados pueden ser estimados a partir de la capacidad de bombeo de los impulsores (Q_i). Los autores estimaron los t_c para fluidos Newtonianos con diferentes viscosidades, así como el posible t_c de un fluido pseudoplástico (suponiendo la ley de la potencia) a diferentes escalas de operación. La capacidad de bombeo fue estimada mediante la correlación de Norwood y Metzner (1960) para turbinas Rushton estándar de acuerdo a:

$$Q_i = 1.98 \times 10^{-2} N D_i^2 W \left[\frac{D_i^{0.4} \rho}{\eta} \right]^{0.5} (1 - q^2)^{0.5} \quad (2.4)$$

El t_c es estimado como la relación entre el volumen del tanque y la capacidad de bombeo por los impulsores (Ec. 2.5).

$$t_c = \frac{V}{Q_i} \quad (2.5)$$

Sweere *et al.* (1987) citaron una correlación para estimar el t_c como una función de las dimensiones del tanque y de la velocidad de agitación (Ec. 2.6).

$$t_c = \frac{V}{2H\pi^2ND_i^2} \quad (2.6)$$

En la Tabla 2.6 se muestran algunas correlaciones de la literatura para la determinación de algunos tiempos característicos.

Tabla 2.6 Correlaciones de la literatura para determinar algunos tiempos característicos.

Tiempo característico	Abreviatura	Correlación	Referencia
Mezclado	t_M	$V/2.6ND^3$	Solà y Gòdia, 1994
Mezclado (columna burbujeada)	t_M	$L^2/0.36(gD^4v^s)^{1/3}$	Sweere <i>et al.</i> , 1987
Circulación	t_c	$t_M/4$	Feijen y Hofmeester, 1991
Transferencia de masa	t_{mt}	$1/k_L a$	Feijen y Hofmeester, 1991
Crecimiento	t_μ	$1/\mu$	Solà y Gòdia, 1994
Transferencia de calor	t_{ht}	$V\rho C_p/UA$	Sweere <i>et al.</i> , 1987
Difusión	t_D	L^2/D_{eff}	Solà y Gòdia, 1994
Consumo de oxígeno	t_{oc}	$C_{O_2}/q_{O_2} X$	Sweere <i>et al.</i> , 1987
Consumo de sustrato	t_{sc}	$C_{s_0}/q_s X$	Sweere <i>et al.</i> , 1987
Residencia del líquido	τ	V/F	Solà y Gòdia, 1994
Residencia del gas	τ_G	$\epsilon(V/F)$	Solà y Gòdia, 1994

Por comparación de los t_{ca} de los fenómenos de transporte del biorreactor (t_{nt} , t_c , t_M , t_{ht} , etc.) con los t_{ca} de los procesos realizados por el ente biológico (t_{sc} , t_μ , t_{oc} , etc.) se establece si el desempeño del biorreactor está controlado por los fenómenos de transporte o por los fenómenos biológicos. Es importante mencionar que las correlaciones utilizadas únicamente nos dan una estimación burda de los tiempos característicos, por lo que solamente los órdenes de magnitud deben ser considerados y comparados en el análisis de régimen. En la Figura 2.7 se muestra un esquema general tanto del orden de magnitud de los tiempos característicos de los fenómenos de transporte, como de los fenómenos biológicos.

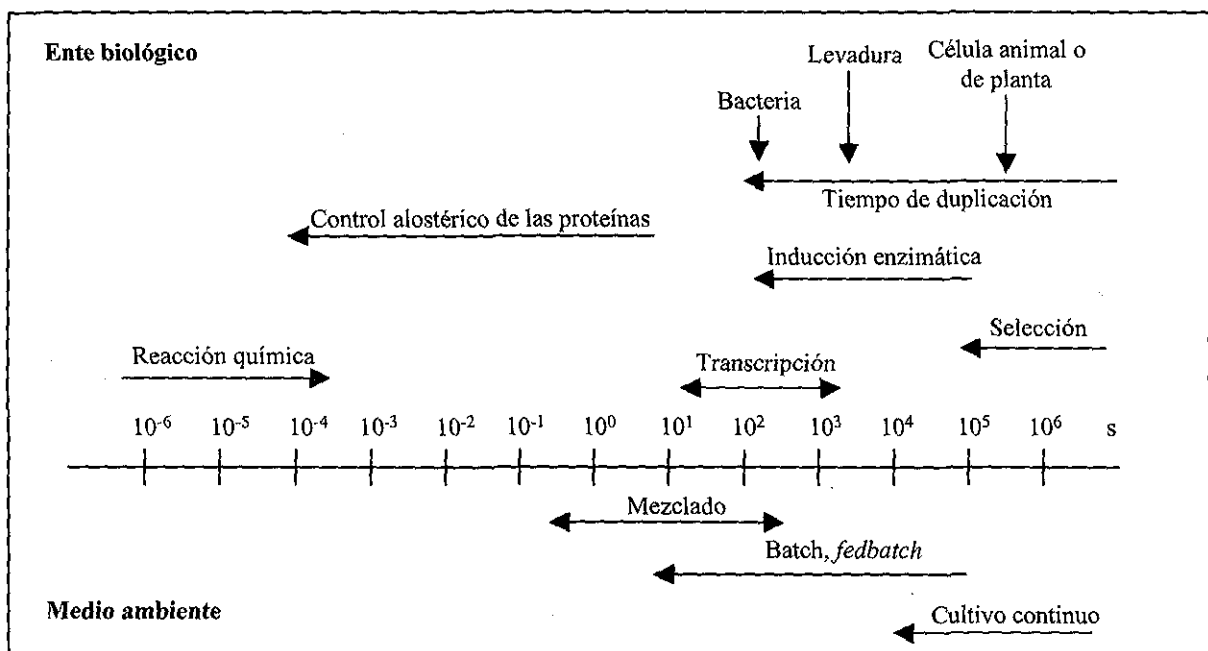


Figura 2.7. Orden de magnitud de los tiempos característicos (adaptado de Palomares y Ramírez, 2000)

Estudios de análisis de régimen reportados en la literatura

Diferentes estudios de análisis de régimen se encuentran reportados en la literatura. La mayoría se han realizado para procariotes y solo recientemente unos cuantos para el análisis de cultivos de células de eucariotes superiores. La falta de datos para células animales se debe probablemente a que hace dos décadas no existían muchos reactores a gran escala para este tipo de cultivos o porque no se pensaba que en estos reactores se presentarían condiciones de heterogeneidad o de limitación, dadas las bajas velocidades de crecimiento, de consumo de sustrato y de consumo de oxígeno de las células animales.

Oosterhuis *et al.* (1985) realizaron un análisis de régimen para la fermentación del ácido glucónico por *Gluconobacter oxidans* en un tanque agitado de 25 m³ con una velocidad de consumo de oxígeno máxima de 30 mmol O₂/L h. Encontraron que el tiempo de transferencia de masa (t_{mt}) era del mismo orden de magnitud que el tiempo de consumo de oxígeno (t_{oc}). Adicionalmente, encontraron que t_{oc} era comparable con el tiempo de circulación (t_c). Por ser estos procesos del mismo orden de magnitud, ellos concluyen que la existencia de gradientes de oxígeno pudieran estar afectando su proceso.

Sweere *et al.*, (1987) llevaron a cabo un sofisticado análisis de régimen del proceso de producción de levadura de pan para un reactor de columna burbujeadada de 120 m³. Encontraron que el orden de magnitud del t_{oc} (10⁰) era menor que el orden de magnitud del t_{mt} (10¹-10²), por lo que, era muy probable el agotamiento de oxígeno. También observaron que el tiempo de mezclado (t_M) (10¹-10³) era de orden de magnitud mayor al t_{mt} , por lo cual la presencia de gradientes de oxígeno disuelto era muy probable también.

Kristiansen *et al.* (1987) llevaron a cabo el análisis de régimen de la fermentación de *Aspergillus niger* en reactores tanto de escala laboratorio como industrial. Encontraron que, en el reactor de escala laboratorio, el t_M era comparable (10 s) al t_{mt} (10 s). Sin embargo, en el reactor de escala industrial, el t_M era un orden de magnitud más grande (100 s) que el t_{mt} (18 s), por lo que los microorganismos pudieran estar pasando de zonas con altas concentraciones de oxígeno -cerca del impulsor- a bajas concentraciones de oxígeno -en las paredes del biorreactor-.

Pocos reportes existen con respecto a análisis de régimen para cultivos de células de eucariotes superiores, de entre los cuales el de Doran (1993) fue reportado para el cultivo de células de plantas. Ella comparó los tiempos característicos para un reactor tipo "air-lift" y un tanque agitado, ambos reactores con un volumen de 10 m³. Reporto que a concentraciones celulares de 5 kg m⁻³ -al inicio del cultivo-, el t_M y t_{mt} , son del mismo orden de magnitud y menores a t_{oc} , por lo cual no era probable que existiera limitación o gradientes de oxígeno para ambos reactores. La situación se torna diferente en las etapas finales del cultivo, cuando se alcanzan concentraciones celulares de 30 kg m⁻³ donde, para el reactor tipo "air-lift" los tres tiempos característicos (t_M , t_{mt} , y t_{oc}) son del mismo orden de magnitud, por lo que el

mezclado se vuelve ineficiente y la formación de gradientes de oxígeno puede ocurrir. En el caso del reactor agitado, t_M se mantiene en un valor bajo, por lo cual el mezclado sigue siendo eficiente; sin embargo, a bajas velocidades de agitación, t_{mt} fue mayor que t_{oc} , por lo que, las limitaciones de oxígeno pudieran presentarse.

El reporte de Tramper *et al.* (1996) es el primer reporte en donde se hacen estimaciones -del tipo de análisis de régimen- para predecir si pudiera darse la formación de gradientes de oxígeno disuelto en el cultivo de células animales (células de insecto) a altas densidades celulares y en tres tipos de reactores hipotéticos de 0.01 m^3 y 10 m^3 : un tanque agitado, una columna burbujeada y un "air-lift" de recirculación externa. Se asume un consumo de oxígeno de $10^{-16} \text{ molO}_2 \text{ cel}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y tres concentraciones celulares máximas: 10^{12} cel/m^3 (típico de un cultivo continuo), 10^{13} cel/m^3 (típico para cultivos por lote y en perfusión) y 10^{14} cel/m^3 (concentraciones celulares que no se han alcanzado todavía). Calcularon los t_c para los tres tipos de reactores y los compararon con los t_{oc} a las tres concentraciones celulares. Encontraron que los t_c y t_{oc} eran del mismo orden de magnitud a concentraciones celulares de 10^{13} cel/m^3 y más aún a 10^{14} cel/m^3 , por lo que la presencia de gradientes -e incluso el agotamiento de oxígeno- podía ocurrir. Dadas sus estimaciones, concluyen que, la presencia de gradientes es muy probable que ocurra. Sin embargo, la pregunta a responder es si la presencia de gradientes debe ser evitada, si debe ser tolerada hasta cierto nivel, o incluso creada con la finalidad de obtener un beneficio. El estudio de Tramper (1996) es un reflejo de la creciente preocupación por la presencia de gradientes de oxígeno disuelto en cultivos de células animales a gran escala y a altas densidades celulares.

Nienow *et al.* (1996) y Langheinrich *et al.* (1998) realizaron estudios extensivos en la caracterización de un reactor de 8 m^3 para el cultivo de células de mamífero a gran escala y simulan -en reactores de escala laboratorio- los tiempos característicos del reactor a gran escala. En ambos reportes concluyen que dados los tiempos característicos encontrados, es muy probable la formación de gradientes de pH y de oxígeno disuelto en el reactor de gran escala. Recientemente, Langheinrich y Nienow (1999) reportaron la simulación de tales gradientes de pH en reactores de laboratorio.

Simulación de gradientes de oxígeno disuelto

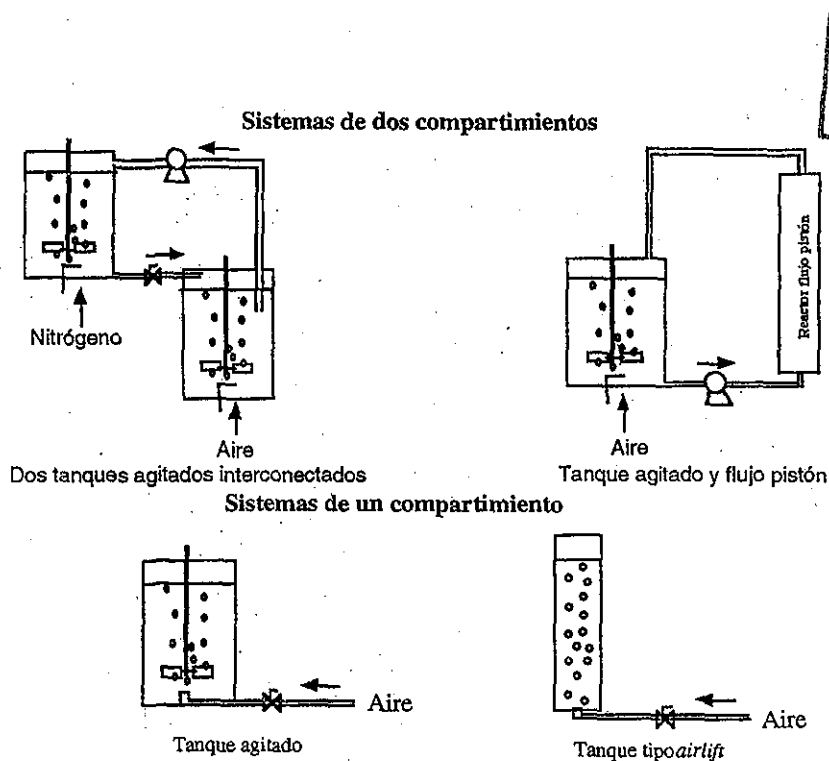
Una vez que se conocen las condiciones limitantes del proceso (gradientes en variables ambientales, falta de nutrientes, estrés hidrodinámico, etc.) el siguiente paso consiste en simular tales condiciones en biorreactores de laboratorio. Con base en el conocimiento generado en la etapa de simulación, es posible optimizar el proceso y después trasladarlo a una escala mayor.

En la literatura se encuentran reportados una buena cantidad de estudios de escalamiento descendente en donde se evalúa el efecto de las heterogeneidades ambientales presentes en cultivos de gran escala. Gradientes de glucosa y acetato (Neubauer *et al.*, 1995), de pH (Davison y Stephanopoulos, 1986) y más comúnmente, gradientes de TOD (Oosterhuis *et al.*, 1985; Kataoka *et al.*, 1986; Träger *et al.*, 1991; Buse *et al.*, 1992; Trujillo-Roldán *et al.*, 2001). Cabe mencionar que todos los estudios arriba mencionados se han realizado para cultivos bacterianos, de hongos o levadura y la mayoría solamente realizan la etapa de simulación.

Con respecto a la simulación de gradientes de oxígeno disuelto para cultivos de células animales, solamente se encuentra un trabajo reportado hasta el momento en la literatura. Rhiel y Murhammer (1995) realizaron oscilaciones de oxígeno disuelto y evaluaron su efecto en el crecimiento y metabolismo de células de insecto. Ellos reportaron un efecto negativo en el crecimiento y la producción de proteína recombinante cuando oscilaron la TOD entre 0 % y 15 %, con períodos de oscilación de 1800 s. El estudio de Rhiel y Murhammer (1995) no estuvo fundamentado en datos arrojados por un análisis de régimen, por lo que, las oscilaciones que simularon son varias veces e incluso un orden de magnitud mas grandes que los gradientes que pueden presentarse en un biorreactor de células animales gran escala. Sin embargo sus experimentos muestran el efecto que los gradientes de TOD pueden ocasionar.

Los sistemas de cultivo utilizados como simuladores de gradientes de TOD consisten en tanques agitados, que pueden ser de uno o dos compartimientos. Los simuladores de dos compartimientos funcionan mediante la circulación del medio de cultivo entre dos tanques agitados e interconectados. A uno de ellos se le suministra aire para simular la región

denominada como bien mezclada y el otro se mantiene en condiciones anaerobias mediante burbujeo de nitrógeno -simulando las zonas deficientes de oxígeno-. Los tiempos de circulación en estos simuladores, se manipulan mediante la velocidad de circulación del medio de cultivo entre los dos tanques (Oosterhuis *et al.*, 1985). Una variante consiste en un sistema formado por un tanque agitado (aerobio) y un reactor de flujo pistón (RFP). En estos sistemas, los gradientes se logran mediante el consumo de oxígeno a lo largo del RFP (Larsson y Enfors, 1988). Los sistemas de un compartimento pueden estar formados por un biorreactor tipo airlift (Träger *et al.*, 1991) o por un tanque agitado (Abel *et al.*, 1994). En estos sistemas, las oscilaciones de oxígeno disuelto se logran mediante cambios al azar (Namdev *et al.*, 1993) o bien cambios periódicos (Kataoka *et al.*, 1986) en la presión parcial de oxígeno a la entrada del biorreactor. Dichos cambios pueden ser en forma de ondas cuadradas, triangulares o sinusoidales. Con lo anterior se pretende simular el tránsito de los organismos de la zona bien mezclada (cresta de la onda) a las zonas deficientes de oxígeno (valle de la onda). En la Figura 2.8 se pueden observar las diferentes configuraciones de simuladores de gradientes de concentración de oxígeno disuelto que se han utilizado.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2.8. Tipos de simuladores de gradientes de TOD (tomado de De León, 1996).

¿Existe la necesidad de realizar estudios de escalamiento descendente en cultivos de hibridomas?

Dada la efectividad terapéutica que han mostrando en pruebas clínicas las proteínas derivadas de células animales, en especial los AcM, existe la necesidad de producirlas con altos estándares de calidad y en grandes cantidades para satisfacer las demandas del futuro mercado. Las dosis que se requieren de un AcM para uso terapéutico en algunos casos van de 150 a 1,125 mg/dosis y además se requiere de múltiples dosis para observar beneficio terapéutico. Tales dosis son mucho más grandes que las necesarias (0.1 a 100 mg/dosis) para el tratamiento de otros padecimientos, con otras glicoproteínas terapéuticas (Schmelzer y Miller, 2002). Por lo tanto, tales necesidades no se podrán satisfacer con cultivos tradicionales como “roller bottles”, frascos T o biorreactores con volúmenes menores a 10 m³ (Ernst y Young, 2001).

Mediante el cultivo de células animales a gran escala y logrando altas densidades celulares será posible alcanzar las expectativas del mercado, siendo los biorreactores agitados (operados en forma de lote alimentado o en perfusión) los candidatos ideales. En la Figura 2.9 se muestra como cambia la magnitud de los tiempos característicos para un reactor “air lift” de 10 m³ utilizado en el cultivo de células vegetales, al cambiar la concentración celular de 5 a 30 kg m⁻³. Se puede ver que a 30 kg m⁻³, el tiempo característico de consumo de oxígeno se vuelve igual o menor que los tiempos característicos de mezclado o transferencia de oxígeno. Ello indica que los procesos de los fenómenos de transporte se convierten en los mecanismos limitantes del proceso, sugiriendo la probable presencia de gradientes de oxígeno e incluso limitaciones de éste (Doran, 1993).

Con lo anteriormente expuesto es evidente que la presencia de gradientes de las variables de proceso en cultivos de células animales a gran escala puede ocurrir y puede afectar los rendimientos o productividades. Por lo tanto, es necesario realizar estudios de escalamiento descendente que arrojen información acerca del desempeño de los cultivos de células animales en condiciones de heterogeneidad. También es importante realizarlos como una medida para llevar a cabo -en el futuro- un escalamiento ascendente con bases más racionales

que contribuyan a que la ingeniería del cultivo de células animales pase a ser más una ciencia exacta que un arte.

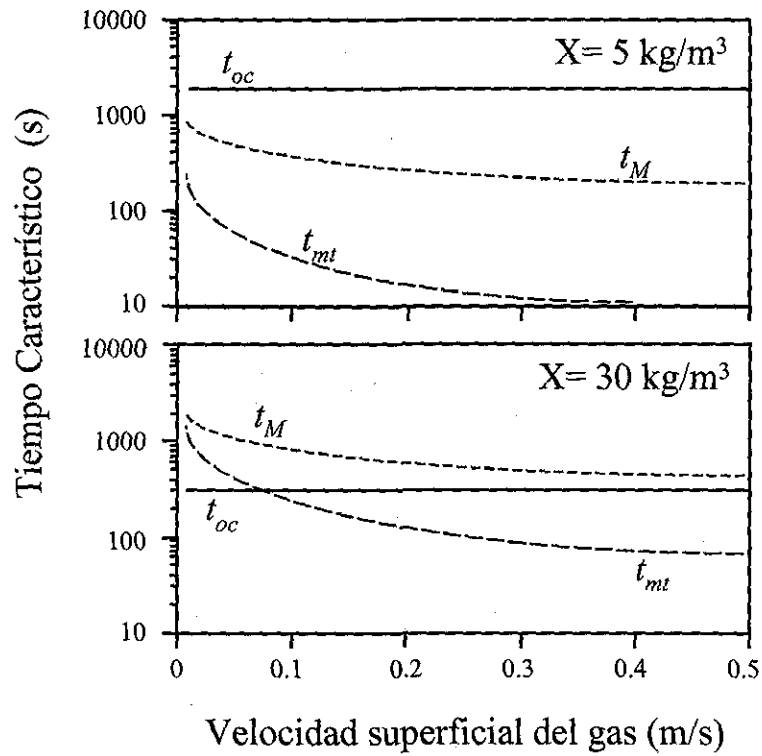


Figura 2.9. Comparación de tiempos característicos a dos densidades celulares diferentes (adaptado de Doran, 1993).

Capítulo 3 Objetivos

Objetivo general

Diseño, caracterización y aplicación de un sistema de un compartimento para simular gradientes de concentración de oxígeno disuelto en cultivos suspendidos de células de mamífero.

Objetivos específicos

Diseñar un biorreactor agitado con un alto coeficiente de transferencia de masa para la producción de anticuerpos monoclonales por cultivo de hibridomas murinos.

Desarrollar un programa de control computarizado que permita realizar cultivos de hibridomas bajo condiciones oscilatorias de la concentración de oxígeno disuelto.

Realizar cultivos de hibridomas a condiciones de TOD constante (como control) y oscilante.

Evaluar el efecto de las fluctuaciones de la concentración de oxígeno disuelto sobre los principales parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos de hibridomas.

Capítulo 4 Materiales y Métodos

Modelo biológico

Para este estudio se utilizó el hibridoma murino BCF2, el cual secreta un anticuerpo monoclonal (AcM) de clase G (IgG2a), neutralizante y específico contra la toxina 2, que es el péptido más tóxico del conjunto de toxinas del veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann. Este AcM inhibe la unión de la toxina con las membranas sinaptosomales del cerebro de ratón, mostrando así una actividad neutralizante *in vivo* (Zamudio *et al.*, 1992; Selisko *et al.*, 1999). La línea de hibridomas fue amablemente proporcionada por el Dr. Lourival Posan, del Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M.

Medio de cultivo.

El medio de cultivo empleado para el mantenimiento y los cultivos de hibridomas fue Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma, Cat. D-3656, Lot. 97H83181) conteniendo entre los componentes principales: 4.5 g/L de glucosa, 4 mM de glutamina y rojo de fenol como indicador de pH; además fue suplementado con 3.7 g/L de bicarbonato de sodio (para que en conjunto con el CO₂ gaseoso se controlara el pH a través de un *buffer* de carbonatos), 13.2 mg/L de ácido oxalacético, 0.8 mg/L de insulina cristalina, 115 mg/L de piruvato de sodio, 1 % de solución 100X de aminoácidos no-esenciales (Sigma, Cat. M-7145, Lot. 98H2308) y 10 % v/v de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Cat. 16000-044, Lot. 1024905). Después de la adición del SFB, el medio de cultivo fue esterilizado por filtración a través de membranas Millipore de 0.22 µm y conservado en refrigeración a 4°C por períodos de tiempo no mayores a un mes.

Mantenimiento de las células

Congelación de células

- 1.-Centrifugar las células a 700 g durante 10 minutos y resuspender el botón celular formado con medio de cultivo DMEM (suplementado con 40 % de SFB) para obtener una concentración de 5 a 10×10^6 células viables/mL.
- 2.-Etiquetar y colocar los crioviales estériles de 2 mL en hielo seco.
- 3.-Agregar 900 μ L de la suspensión celular a los crioviales.
- 4.-Adicionar 100 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO) como crioprotector (10 % del volumen total del vial) a cada vial e inmediatamente colocar en el hielo seco.
- 5.-Envolver el vial en un aislante.
- 6.-Congelar a -70°C por 24 h.
- 7.-Finalmente, pasar rápidamente de -70°C , a nitrógeno líquido para preservar a -170°C .

Descongelación de células

- 1.- Colocar 30 mL de medio DMEM frío sin SFB pH 7.2-7.4 en un tubo de centrifuga de 50 mL.
- 2.-Descongelar a temperatura ambiente el vial procedente del nitrógeno líquido.
- 3.-Extraer la suspensión celular del vial y resuspender en el medio frío.
- 4.-Centrifugar a 700 g por 10 min.
- 5.-Eliminar el sobrenadante pipeteando por las paredes del tubo (en este paso se elimina el dimetil sulfóxido).
- 6.-Resuspender el botón celular en 10 mL de medio DMEM con 20% de SFB.
- 7.-Incubar a 37°C durante 24 h.
- 8.-Pasado ese tiempo, agregar medio DMEM con 10% de SFB y subcultivar normalmente.

Inóculo

Los inóculos para los cultivos experimentales partieron de células subcultivadas en frascos T de 25 cm² de área superficial con 10 mL de medio de cultivo (con un número de pases no mayor a 25) y mantenidas en incubadora de ambiente controlado a 37°C, con 5 % de concentración de CO₂. Las células se subcultivaron una vez alcanzada una concentración celular viable de 0.6x10⁶ cel/mL con la finalidad de mantenerlas siempre en crecimiento. Para alcanzar el volumen final (20 mL) y la concentración celular del inóculo (1.1x10⁶ cel/mL) dichas células fueron luego subcultivadas a frascos T de 75 cm². A todos los inóculos se le siguió la cinética de crecimiento con la finalidad de utilizar células que estuvieran en la fase exponencial de crecimiento. Todos los experimentos se iniciaron con una viabilidad celular mayor del 90 % y a una concentración inicial de 0.1x10⁶ células viables/mL, para evitar variaciones por el tamaño y condición del inóculo.

Sistema de cultivo

Biorreactor

El biorreactor está constituido por una jarra de 500 mL de volumen nominal, operado a un volumen de 220 mL, estableciéndose así una relación altura del líquido/diámetro del tanque (H/D) de 1/3. Con ello se obtiene -en comparación a los diseños convencionales- una mayor área superficial para la transferencia de gases hacia el seno del líquido. Con este diseño de biorreactor se logró un aumento del coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$) del sistema ya que, con la finalidad de evitar el daño por burbujeo, la aireación en este tipo de sistemas es exclusivamente superficial. Adicionalmente se colocó un aireador superficial de acero inoxidable, el cual consiste de una paleta plana que se ubica al nivel de la superficie del líquido, sumergido a la mitad, con lo cual se genera una remoción constante de la superficie, aumentando la difusión de los gases hacia el seno del líquido (Hu *et al.*, 1986).

No se utilizaron *baffles* ni serpentín de enfriamiento. El diagrama del biorreactor, así como los demás elementos del sistema de cultivo se muestran en el Apéndice A.

Agitación y temperatura

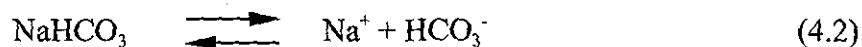
La velocidad de agitación se aplicó mediante una barra magnética cilíndrica suspendida y sujeta a la flecha del biorreactor. La agitación se mantuvo constante en 120 rpm en todos los cultivos. La temperatura se controló mediante una resistencia de calentamiento -recubierta de una capa aislante para evitar un gradiente alto de temperatura- y un termopar, ambos inmersos en el medio de cultivo a través de sendos termopozos. Ambos parámetros se aplicaron y controlaron a través de una unidad de control independiente (Virtis Omni-Culture).

Sistema computarizado de control, despliegue y adquisición de datos para oxígeno disuelto y pH

La composición de oxígeno, nitrógeno y bióxido de carbono en la corriente gaseosa de entrada al biorreactor así como los valores de pH y el OD fueron adquiridos, controlados y graficados a través de un programa de control retroalimentado de tipo proporcional, escrito en Microsoft QuickBasic. Este sistema controla el pH mediante la manipulación del flujo de bióxido de carbono a la entrada del biorreactor, el cual, al disolverse en el medio de cultivo, es hidratado, convertido en ácido carbónico y, como consecuencia, el pH disminuye:



Este efecto es amortiguado por el bicarbonato de sodio que se adicionó al medio de cultivo durante su preparación, el cual se encuentra disociado en sus iones:



y debido a la baja constante de disociación del ion bicarbonato ($K_{a_2} = 4.8 \times 10^{-11}$), el equilibrio de la reacción (4.1) es desplazado hacia la izquierda, elevando el pH. Así, mediante la adición de una concentración conocida de bicarbonato de sodio (44 mM) y variando el flujo de bióxido de carbono, es posible controlar el pH del cultivo en un valor determinado, el cual fue de 7.20 para todos los cultivos realizados.

El oxígeno disuelto se controló mediante la manipulación del flujo de oxígeno y nitrógeno a la entrada del biorreactor, el cual se difunde a través de la superficie del líquido, hacia el seno del medio de cultivo. El flujo total de gases (oxígeno, bióxido de carbono y nitrógeno) se mantuvo de manera constante en 600 cm³/min. El oxígeno disuelto se midió con un electrodo polarográfico (Ingold) y el pH a través de un electrodo de vidrio desechable (Mettler Toledo), ambos esterilizables. El oxígeno disuelto fue reportado como porcentaje de saturación con respecto al aire en agua a 37 °C y 0.85 atm de presión.

Las señales de los electrodos se amplificaron en un intervalo de 0 a 5 VCC (amplificadores Ingold) y se adquirieron en una computadora Macintosh II SI a través de los convertidores análogos/digitales (A/D) de una tarjeta de interfase Mac ADIOS (GW Instruments). Las acciones de control se tomaron mediante señales analógicas enviadas por la tarjeta de interfase a través de los convertidores digitales/analógicos (D/A) a tres controladores de flujo másico (Brooks): uno para nitrógeno, uno para oxígeno y uno para CO₂. Los dos primeros controladores de flujo másico tenían una capacidad de 1000 ccpm y el tercero de 100 ccpm.

En los estudios de Palomares (1996), De León (1996), Trujillo-Roldán *et al.* (2001) y Meneses (2001) se pueden encontrar diferentes configuraciones de sistemas de control y adquisición de datos utilizadas en el laboratorio con anterioridad. El diagrama del sistema utilizado en este estudio se muestra en el Apéndice B.

Programas de control

En este proyecto se utilizaron dos programas de control. Uno de ellos tiene la posibilidad de controlar el oxígeno disuelto y el pH de manera constante además de monitorear el potencial

redox. El segundo programa controla la concentración de oxígeno disuelto en forma oscilatoria, manteniendo constante el pH y monitoreando el potencial redox. Estos programas son una adaptación del desarrollado originalmente por Aguilar-Águila *et al.* (1993) y modificado por Meneses (2001) para mantener el pH y la TOD en valores constantes y predeterminados.

A través del algoritmo de control, las señales adquiridas se almacenan en disco duro y se despliegan en línea sobre la pantalla de la computadora, tanto en forma gráfica como en forma numérica. Los valores así adquiridos son procesados y las acciones de control son tomadas para mantener la TOD y el pH en el valor deseado.

Las subrutinas de control de pH y TOD, tanto constante como oscilante se basan en un algoritmo retroalimentado proporcional. De esta forma, en la computadora se compara el valor de TOD y pH deseado (*setpoint* o punto de control) con la lectura proporcionada por el sensor (elemento de medición). De acuerdo a la diferencia o “error” se establece la acción de control sobre el cultivo. De esta manera, los controladores de flujo másico actúan aumentando o disminuyendo los flujos de oxígeno, nitrógeno y bióxido de carbono (variables manipuladas), para cambiar la composición de los gases de alimentación pero manteniendo el flujo total constante. La ecuación bajo la cual se ejerce la acción de control proporcional es la siguiente:

$$\%G_n = \%G_{n-1} + (E_n * K_c) \quad (4.3)$$

donde:

$$E_n = \textit{setpoint} - \text{valor medido} \quad (4.4)$$

La constante de control proporcional se determinó con base en la curva de respuesta del simulador, de acuerdo al criterio de Ziegler-Nichols (Court, 1988). Para los cultivos a TOD constante se empleó una K_c de 0.9 a lo largo de todo el cultivo. En el caso de los cultivos a TOD oscilante, iniciaron con una K_c de 0.9 y se aumentó manualmente a lo largo del cultivo,

según se necesitara. El listado del programa de control para conseguir oscilaciones de TOD se muestra en el Apéndice C.

Caracterización dinámica del sistema

Determinación de la constante de tiempo del electrodo de TOD

Para determinar la constante de tiempo del electrodo de TOD, se midió la respuesta transitoria en función del tiempo, al pasar rápidamente el electrodo de un matraz con agua a 0 % de TOD (mediante el burbujeo de nitrógeno y con agitación), a otro con agua a 100 % de TOD (burbujeando aire y con agitación). A partir de la curva de respuesta, la constante de tiempo se tomó como el tiempo necesario para alcanzar el 63.2 % de la respuesta total del electrodo (Lavery y Nienow, 1987).

Determinación de la constante de tiempo del sistema de cultivo

Para determinar la constante de tiempo del simulador, se colocó el sistema a 100 % de TOD y se midió la respuesta transitoria en función del tiempo al aplicar un cambio escalonado en el flujo de gases, mediante el cierre de la válvula de oxígeno y la apertura total de la válvula de nitrógeno, hasta alcanzar 0 % de TOD. A partir de la curva de respuesta, la constante de tiempo del sistema (t_{mt}) se tomó como el tiempo necesario para alcanzar el 63.2 % de la respuesta total del simulador (Lavery y Nienow, 1987). Se realizó también el cambio escalonado de 0 % a 100 % de TOD para comparar ambas constantes de tiempo. El resultado obtenido en ambas curvas fue el mismo. En la sección de resultados se presentan ambas curvas de respuesta, así como la constante de tiempo obtenida.

Cultivos con control de oxígeno disuelto y pH constante

Se realizaron tres cultivos por lote, controlando a 10 ± 1 % de TOD constante y pH 7.2 ± 0.20 , los cuales sirvieron como control para representar a los cultivos bajo condiciones de homogeneidad. Se procedió a tomar muestra cada 12 horas, hasta finalizar el cultivo. Inmediatamente después de la toma de muestra, se procedió a hacer las determinaciones de concentración celular y viabilidad, así como la preparación de la muestra para posteriormente realizar el análisis de metabolitos y producto. El volumen total de todos los muestreos nunca excedió el 10 % del volumen total del biorreactor, tomándose alrededor de 1 mL de medio de cultivo por muestreo.

Se realizaron 12 cultivos a TOD oscilante, evaluando 4 condiciones por triplicado. Se mantuvieron constantes tanto el eje de oscilación ($7 \pm 2\%$) como la amplitud de la onda ($7 \pm 2\%$) y se experimentaron cuatro diferentes períodos de oscilación: 800, 1600, 6400 y 12800 segundos, esto con la finalidad de aumentar cada vez mas el período de exposición de las células a condiciones de hipoxia. Todos los demás parámetros de cultivo se mantuvieron igual que en los cultivos constantes.

Métodos analíticos

Cuantificación de la concentración celular

La concentración celular se midió con un contador electrónico de partículas (Coulter Multisizer II, Coulter Electronics) utilizando un tubo de apertura de $100 \mu\text{m}$ y aspirando para cada muestra un volumen de $500 \mu\text{L}$. Para diluir las muestras y con la finalidad de no tener variaciones de tamaño debido a cambios en la osmolaridad, se utilizó una solución isotónica (Isotón II, Coulter, 7546719). El número de células arrojado por el aparato está expresado en células por $500 \mu\text{L}$, para lo cual se multiplicaron los valores por dos para tenerlo en cel/mL y finalmente se multiplicó por la dilución realizada. Es importante realizar diluciones de la muestra para que el error de lectura del aparato no rebase un 10 %.

Cuantificación de la viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó utilizando la técnica de exclusión (Freshney, 1983) por medio del colorante azul de tripano -20 % en PBS de la solución Sigma T-8154-, el cual es un indicador de la integridad de la membrana citoplasmática. Mediante esta tinción, las células muertas son permeables al colorante y se tiñen de azul, mientras que las vivas permanecen refringentes. La cuantificación se hace en un hemacitómetro a través de un microscopio óptico (Fisher Micromaster), utilizando el objetivo y ocular de 10X.

Determinación de la concentración de Anticuerpo Monoclonal (AcM)

La concentración de AcM se determinó mediante la capacidad de unión antigénica del AcM a través de un ensayo inmunoenzimático ELISA (Meneses, 2001). En placas de 96 pozos (Costar®3590, Flat bottom, No lid, Polystyrene high binding):

1. Colocar en cada pozo 100 μ L de AcM de conejo anti-ratón [2ml Zymed Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L) Cat. 61-6500, Lot. 80642239] a una concentración de 0.01 mg/mL en amortiguador de fosfatos (PBS pH 7.2-7.3) y dejar incubando de 16 a 18 horas a 4°C. La composición del PBS es 8.75 g NaCl/L, 2.25 g Na₂HPO₄/L, 0.20 g KH₂PO₄/L y 0.20 g KCl/L. En este paso el AcM se adhiere al fondo del pozo.

2. Lavar cada pozo dos veces con 150 μ L de PBS/Tween 20. Esta solución de lavado se prepara disolviendo 0.50 mL de Tween 20 en un litro de PBS.

3. Colocar a cada pozo 125 μ L de albúmina de suero bovino (BSA) [Sigma A-7638], a una concentración de 10 mg/mL en PBS y dejar incubando dos horas a temperatura ambiente. En este paso se bloquean los sitios activos remanentes.

4. Repetir el paso número 2.

5. Colocar en cada pozo 100 μ L de PBS en la primera hilera (blanco 1) y 100 μ L de solución estándar en las siguientes dos hileras (controles internos 2 y 3). Como estándar se utilizó AcM de ratón anti-rata [2 mL AffiniPure Mouse Anti-Rat IgG (H+L) Jackson ImmunoResearch Labs. Inc., Cat. 212-005-082, Lot. 35972] preparados con PBS a 25 ng/mL y 50 ng/mL, respectivamente. En las hileras restantes (4 a 12), colocar a cada pozo 100 μ L

de las muestras problema a determinar en una dilución 1/200 con PBS, de manera que las concentraciones de AcM determinadas sean menores a 100 ng/mL. Dejar incubando a temperatura ambiente durante dos horas. En este paso se une el primer ligando al AcM a determinar.

6. Repetir el paso 2, pero ahora tres veces en lugar de dos.

7. Colocar en cada pozo y a toda la placa 100 μ L de AcM de borrego anti-ratón conjugado con alcalino fosfatasa [Alkaline phosphatase-conjugated Affinipure sheep anti-mouse IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch Labs., Inc., Cat. 515-055-003, Lot. 33748.] y dejar incubando a temperatura ambiente durante dos horas. Este AcM se prepara a 0.12 μ g/mL con PBS. En este paso se une el ligando detector al ligando problema.

8. Repetir el paso 6

9. Colocar en cada pozo y a toda la placa 100 μ L de PNPP (Paranitrofenol fosfato) [Sigma 104 Phosphatase Substrate] en solución de DEA (Dietanolamina) [Sigma 2286] a una concentración de 120 μ g/mL y a los 20 min exactos agregar 100 μ L de NaOH 2N para detener la reacción enzimática. La DEA se prepara disolviendo 10 mL de DEA, 0.20 g de $MgCl_2(6H_2O)$ y 0.29 g de azida de sodio (NaN_3) en 890 mL de agua destilada; el pH se ajusta a 9.8 con HCl y se afora a un litro. En este paso se revela la actividad enzimática, la cual se percibe por la coloración amarilla generada en este paso.

10. Leer absorbancia a 405 nm y determinar las concentraciones de AcM, considerando las diluciones realizadas. Los platos de ELISA fueron leídos en un lector Elx-800 UV [Bio Tek Instruments, Inc.] y las concentraciones de AcM obtenidas fueron el promedio de 8 pozos.

Reconocimiento de la toxina 2 de alacrán por el AcM producido en BCF2

El procedimiento que convencionalmente se ha utilizado para cuantificar la concentración de AcM producido por los hibridomas ha sido mediante la técnica de ELISA (*sandwich*); técnica en la que se cuantifica todo el AcM producido que sea atrapado por un AcM anti-ratón que se fija en el fondo de la placa de ELISA, el cual es correlacionado en una curva de absorbancia contra concentración conocida de AcM de ratón utilizado como estándar. De tal manera se

cuantifica la totalidad del AcM de ratón y no solamente aquel que es afín por la toxina 2 del alacrán.

Con la finalidad de conocer si el AcM que producen los hibridomas utilizados en este estudio, conserva su afinidad por la toxina 2 y en que magnitud, se realizó un ensayo de ELISA (la metodología que se siguió fue igual a la descrita en el inciso anterior) en el cual en vez de colocar un AcM anti-ratón en el fondo de la placa, ahora se colocó toxina 2 purificada (amablemente proporcionada por el laboratorio del Dr. Possani). Adicionalmente se realizó una curva de absorbancia contra concentración conocida del AcM BCF2 purificado (el cual fue proporcionado también por el laboratorio del Dr. L. Possani) con la finalidad de cuantificar el AcM anti-toxina 2.

Cuantificación de glucosa, lactato y glutamina

Estos cuatro metabolitos se determinaron enzimáticamente en un multianalizador YSI modelo 2700 (Yellow Spring Instruments, Co). Este analizador utiliza membranas con enzimas inmovilizadas: glucosa oxidasa para determinar glucosa, L-lactato oxidasa para lactato, glutaminasa/ L-glutamato oxidasa para glutamina y L-glutamato oxidasa para glutamato. Las enzimas catalizan la reacción oxidativa entre la muestra a determinar y el oxígeno, formando un derivado y peróxido de hidrógeno, este último es oxidado en el ánodo de platino de una sonda, generándose una corriente eléctrica que es linealmente proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno y ésta -a su vez- de la concentración del metabolito medido. Finalmente, utilizando un estándar de concentración conocida que producirá una corriente eléctrica determinada, es posible conocer la concentración de la muestra problema.

Consideraciones matemáticas

Determinación de la velocidad específica de crecimiento, velocidad específica de producción de AcM y coeficientes metabólicos de glucosa, lactato y glutamina

Todos los cálculos se realizaron utilizando la velocidad específica de crecimiento aparente (μ). Dicha velocidad es el resultado de restarle -a la tasa de crecimiento real- la tasa de muerte. La μ fue determinada en la fase de crecimiento exponencial, donde:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (4.5)$$

Integrando:

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu t \quad (4.6)$$

donde X y X_0 son la concentración de células viables al tiempo t y al inicio del cultivo, respectivamente. La μ se calculó a través de la regresión lineal obtenida de la gráfica de $\ln(X/X_0)$ contra tiempo.

Los coeficientes metabólicos de glucosa, lactato, y glutamina se determinaron mediante la ecuación:

$$q_i = \frac{\mu}{Y} \quad (4.7)$$

donde Y es el rendimiento de células viables con respecto al metabolito o nutrimento de interés y se calculó como la pendiente de la regresión lineal (en la fase exponencial de crecimiento) entre la concentración de células viables y el nutrimento o metabolito "i".

La velocidad específica de producción de AcM fue determinada mediante la pendiente de la regresión lineal generada de la gráfica de concentración de AcM y el índice de viabilidad. El índice de viabilidad ($\int x dt$) se determinó como el área bajo la curva de concentración de células viables contra tiempo, usando el método integral de los trapecios, de acuerdo a lo reportado anteriormente por Luan *et al.* (1987) y Ramírez y Mutharasan (1990).

Capítulo 5 Resultados y Discusión

Caracterización dinámica del simulador

Constante de tiempo del sistema de cultivo

Como se observa en la Figura 5.1, para determinar la constante de tiempo del simulador, se realizó un cambio escalonado de un 99.5 % hasta 1 % de TOD. Para alcanzar el 99.5 % de TOD al inicio se abrieron las válvulas de N_2 a 7.8 % y la de O_2 a 2.2 % y -al momento de hacer el cambio- se cerró la válvula de O_2 a cero y la de N_2 se abrió al 100 %. Las condiciones en las que se llevó a cabo el experimento fueron las mismas con las que se realizarían todos los cultivos. Se determinó el tiempo de respuesta del sistema (t_{mt}) al alcanzarse el 63.2 % (al llegar a 37.5 % de TOD) de la respuesta total, el cual fue de 468 segundos.

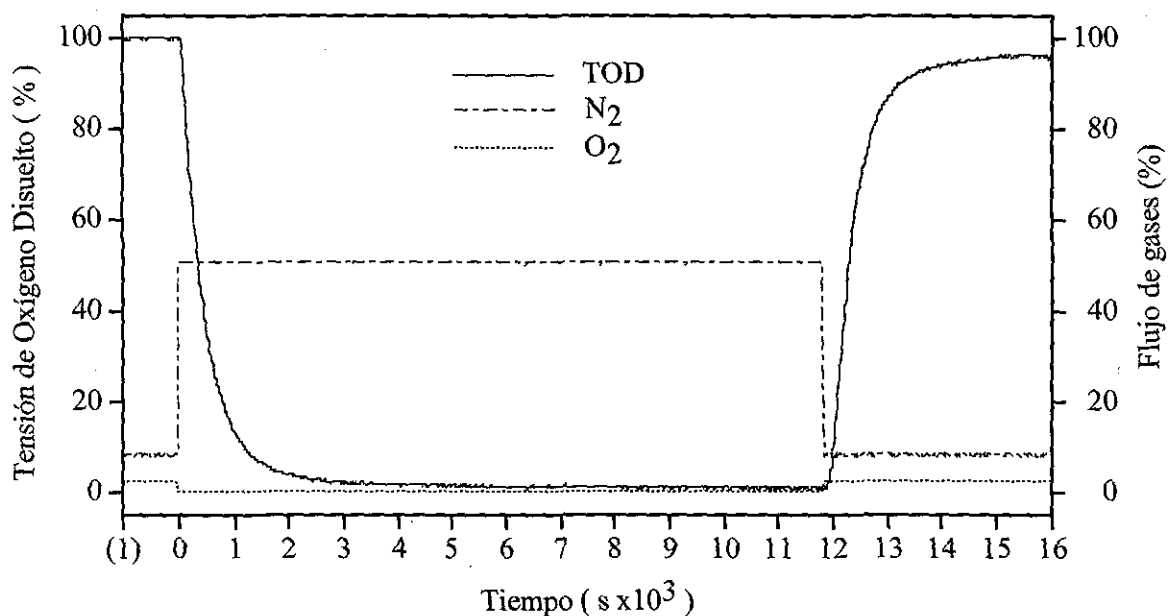


Figura 5.1. Curva para determinar la constante de tiempo del sistema de cultivo.

Adicionalmente se realizó un cambio escalonado de 0 % a 100 % de TOD, mediante la apertura -al mismo tiempo- de la válvula de O_2 a 2.2 % y la de N_2 a 7.8 %, con la finalidad de

conocer si el tiempo de respuesta que se obtiene es el mismo al desorber oxígeno, o al solubilizarlo. El tiempo de respuesta que se obtuvo para las dos curvas fue el mismo.

El resultado de la t_m fue un indicador del período de tiempo más corto al que se podrían realizar los cultivos con un perfil oscilatorio de TOD, ya que, si para pasar de 0 % a 63 % de TOD se necesitaron 468 s, entonces para conseguir una onda completa, por lo menos se requerirán 900 seg. Debido a que el perfil oscilatorio que se definió para los cultivos a TOD oscilante fue una onda de 0 % a 14 % de TOD, el período de oscilación más corto que se consiguió fue de 800 segundos.

A partir del tiempo de respuesta (t_m) se determinó el coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$) del sistema de acuerdo a la Ecuación 5.1

$$k_L a = 1/t_m \quad (5.1)$$

El $k_L a$ determinado para este sistema fue de 7.69 h^{-1} . Aunque el $k_L a$ se logró aumentar (mediante el aumento del área superficial) en comparación con el que originalmente tenía el sistema (1 h^{-1}), es necesario trabajar aún más en el mejoramiento de la dinámica del sistema. Una alternativa es la aireación burbujeada (Spier y Whiteside, 1990) en niveles que no causen daño a las células -en vez de la aireación meramente superficial que se utilizó- o la difusión del oxígeno hacia el medio de cultivo a través de manguera de silicón, membranas permeables a gases, entre otras.

Tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno disuelto

Como se observa en la Figura 5.2, se realizó un cambio escalonado de 0 a 100 % de TOD para calcular el tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno disuelto. Esto se hizo cambiando rápidamente el electrodo de TOD, de un recipiente conteniendo agua saturada con nitrógeno (0 % de TOD) a un recipiente conteniendo agua saturada con aire (100 % de TOD). Finalmente, se contó el tiempo acumulado para alcanzar el 63.2 % de la respuesta total, el cual fue de 25 s. El valor obtenido se encuentra en el intervalo de los valores calculados y referenciados por De León (1996) para electrodos polarográficos.

El tener un tiempo de respuesta del electrodo tan corto -en comparación con el tiempo de respuesta del sistema- indicó que el tiempo de retardo que tiene el electrodo de TOD no controló la dinámica del sistema.

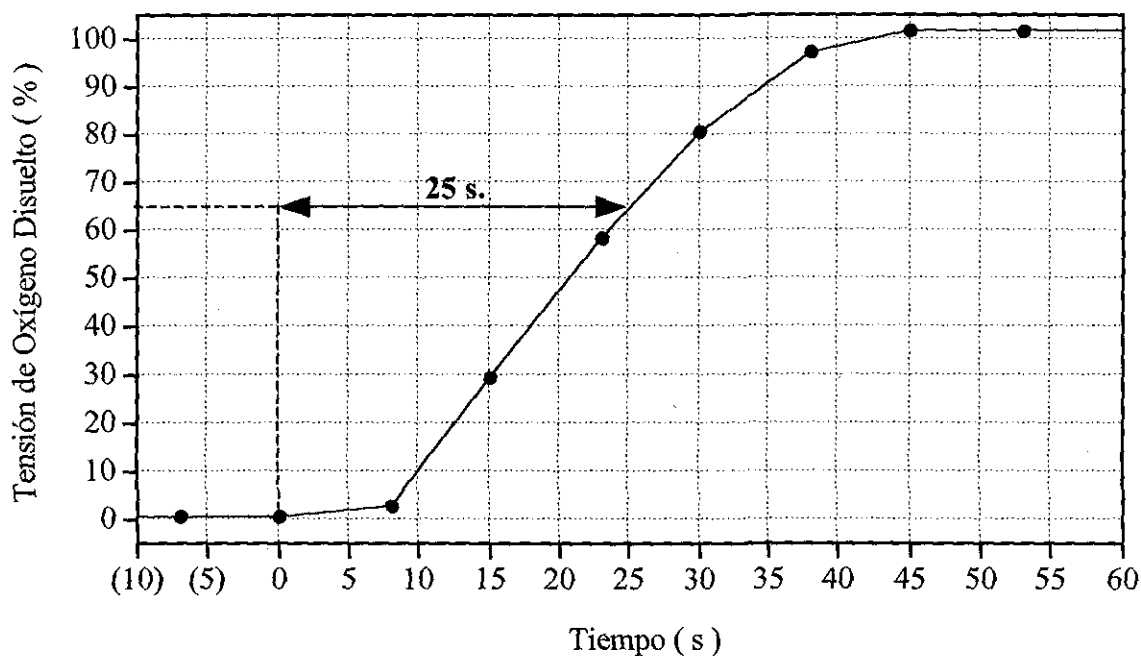


Figura 5.2. Curva del tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno disuelto.

Selección de las condiciones de operación del sistema de cultivo

Generación de perfiles oscilantes de TOD

Dado que el sistema de cultivo desarrollado presentó un t_{mt} elevado (468 s) en comparación con los t_{mt} de los sistemas de cultivo bacterianos (25 - 50 s); se diseñó una estrategia para conseguir oscilaciones de TOD lo más cercano al t_{mt} del sistema, consistente en, hacer fluctuar la composición de los gases de entrada (O_2 y N_2) mediante cambios escalonados, para que, la mitad del período de oscilación se introdujera una mezcla de gases predeterminada, que permitiera alcanzar el *setpoint* máximo de la onda en el menor tiempo posible y, la otra mitad del período, se introdujera otra mezcla de gases predeterminada para alcanzar el *setpoint* mínimo.

Con tal estrategia fue posible generar perfiles oscilatorios de TOD con períodos de oscilación desde 800 s, amplitudes de $\pm 7\%$ de TOD y a un eje de oscilación de 7%. A períodos de oscilación mayores a 800 s, si se desea, es posible programar amplitudes de onda más grandes gracias a que, el tiempo para introducir las composiciones de gases correspondientes al *setpoint* máximo y mínimo son mayores, con lo que se consigue solubilizar o desorber el oxígeno del sistema, por un período de tiempo más largo, generando una oscilación de TOD de mayor amplitud.

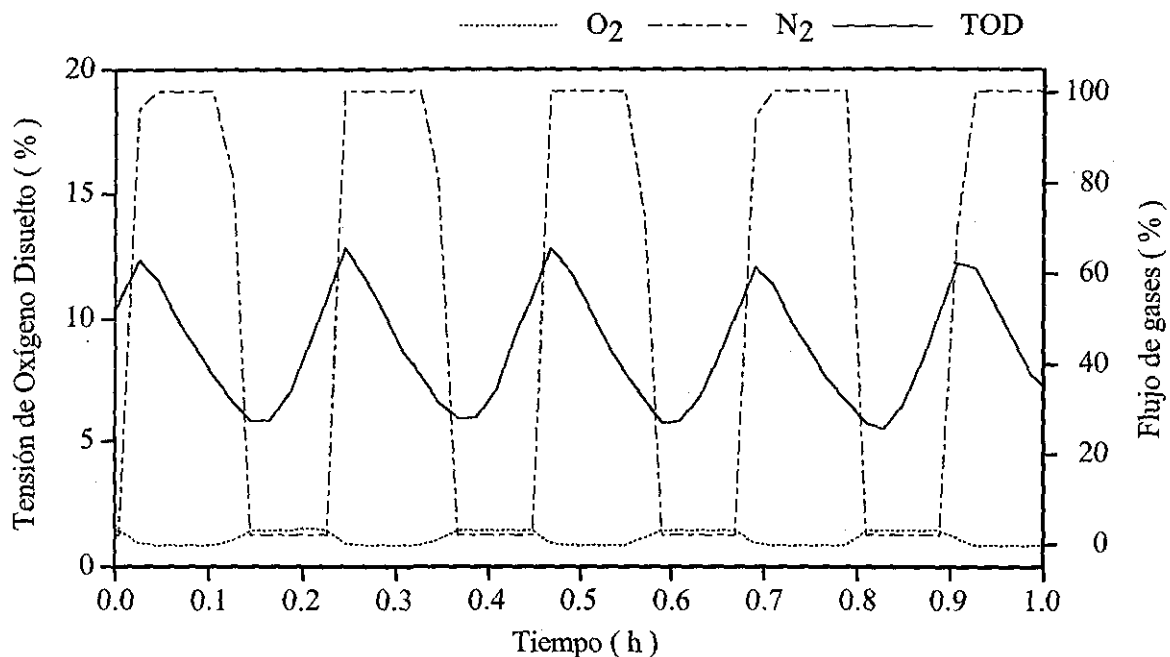


Figura 5.3. Gráfica del perfil oscilatorio de TOD ante un *setpoint* cuadrado de oxígeno.

Como se muestra en la Figura 5.3, para un sistema de cultivo que no es suficientemente dinámico ($k_L a = 7.69 \text{ h}^{-1}$), el resultado de aplicar un *setpoint* cuadrado en los flujos de gases (O_2/N_2), da como resultado un perfil oscilatorio sinusoidal de TOD.

Finalmente, para compensar el consumo de oxígeno de las células, conforme transcurre el cultivo, se adicionó una rutina de control proporcional. Esta rutina establece como los puntos de control, el *setpoint* máximo y mínimo entre los cuales la TOD debe oscilar. Cuando el *setpoint* de TOD no es alcanzado, la ecuación de control (ver ec. 4.3) calcula un porcentaje de apertura de la válvula de oxígeno que es proporcional a la diferencia entre el *setpoint* deseado y el valor medido. Finalmente ese porcentaje de apertura se adiciona al flujo de oxígeno

preestablecido, para así alcanzar el *setpoint* de TOD deseado. Esta estrategia novedosa de realizar oscilaciones de oxígeno disuelto, programando de manera independiente los eventos de, generación de la onda y control del proceso, nos permitió conseguir oscilaciones de TOD con períodos de 800 s y mayores. Como se puede ver en la Figura 5.4, el programa desarrollado tiene la capacidad para conseguir oscilaciones de TOD con períodos de oscilación mucho más cortos. Sin embargo para conseguirlos es necesario utilizar mayores velocidades de agitación (700 rpm) y aireación burbujeadada (1 vvm).

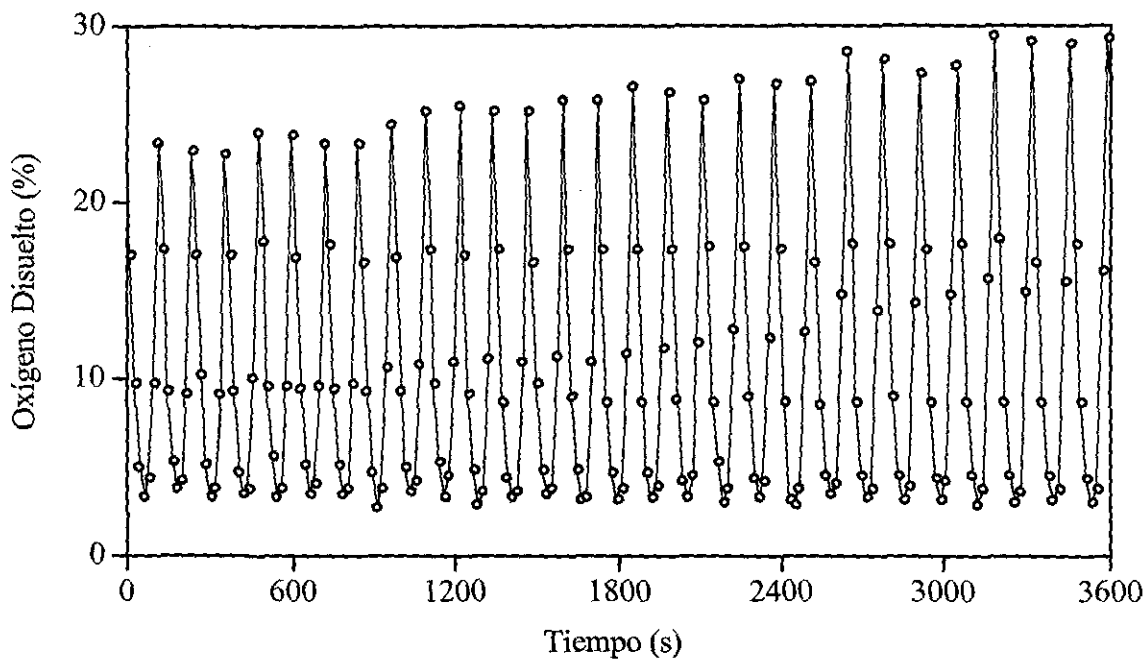


Figura 5.4. Fluctuaciones de TOD con un período de oscilación de 125 s, para un sistema de cultivo con un $k_L a$ aprox. de 130 h^{-1} , utilizando el programa de control desarrollado.

Cálculo de la constante de control proporcional

En la Figura 5.5 se muestra la curva de reacción para el sistema de cultivo. Al hacer un cambio escalonado de 0 a 21 % de O_2 (variable de entrada), se obtuvo un cambio de 0 a 100 % de TOD (variable de salida). Con los datos obtenidos de tal curva y empleando el método de Ziegler y Nichols (Court, 1988), es posible calcular la constante proporcional (K_c) del sistema de cultivo sabiendo el valor de la pendiente (S) en el punto de inflexión, el tiempo muerto (T_d) y las magnitudes de las variables de entrada y de salida. Para este sistema, el

tiempo muerto y la constante proporcional fueron de 180 s y 0.83, respectivamente. Tal constante proporcional se utilizó a lo largo de los cultivos a TOD constante. En el caso de los cultivos a TOD oscilante, arrancaron con una K_c de 0.9 y se aumentó manualmente a lo largo del cultivo, según se necesitara.

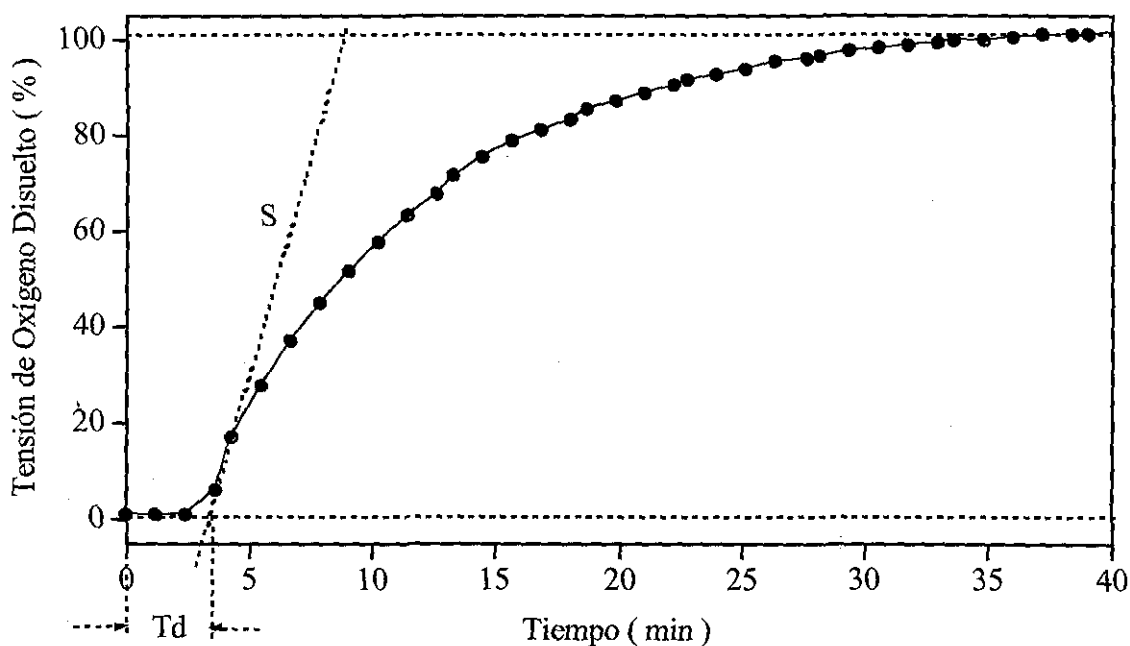


Figura 5.5. Curva para la determinación de la constante de control proporcional (K_c).

Cultivos a TOD constante

Los cultivos a TOD constante se llevaron a cabo para establecer los parámetros de cultivo bajo condiciones homogéneas y así posteriormente comparar con los cultivos en condiciones oscilatorias y evaluar el efecto de los gradientes de TOD en los cultivos de híbridomas.

Cultivos a 10 % de TOD

Se realizaron tres cultivos al 10 % de TOD constante -representativos de los cultivos bajo condiciones homogéneas-, pH 7.20, 120 rpm y 37 °C en un volumen de 220 mL. En la Figura 5.6 se muestra uno de los cultivos a 10 % de TOD. Resultados de los otros dos cultivos se resumen en el Apéndice D.

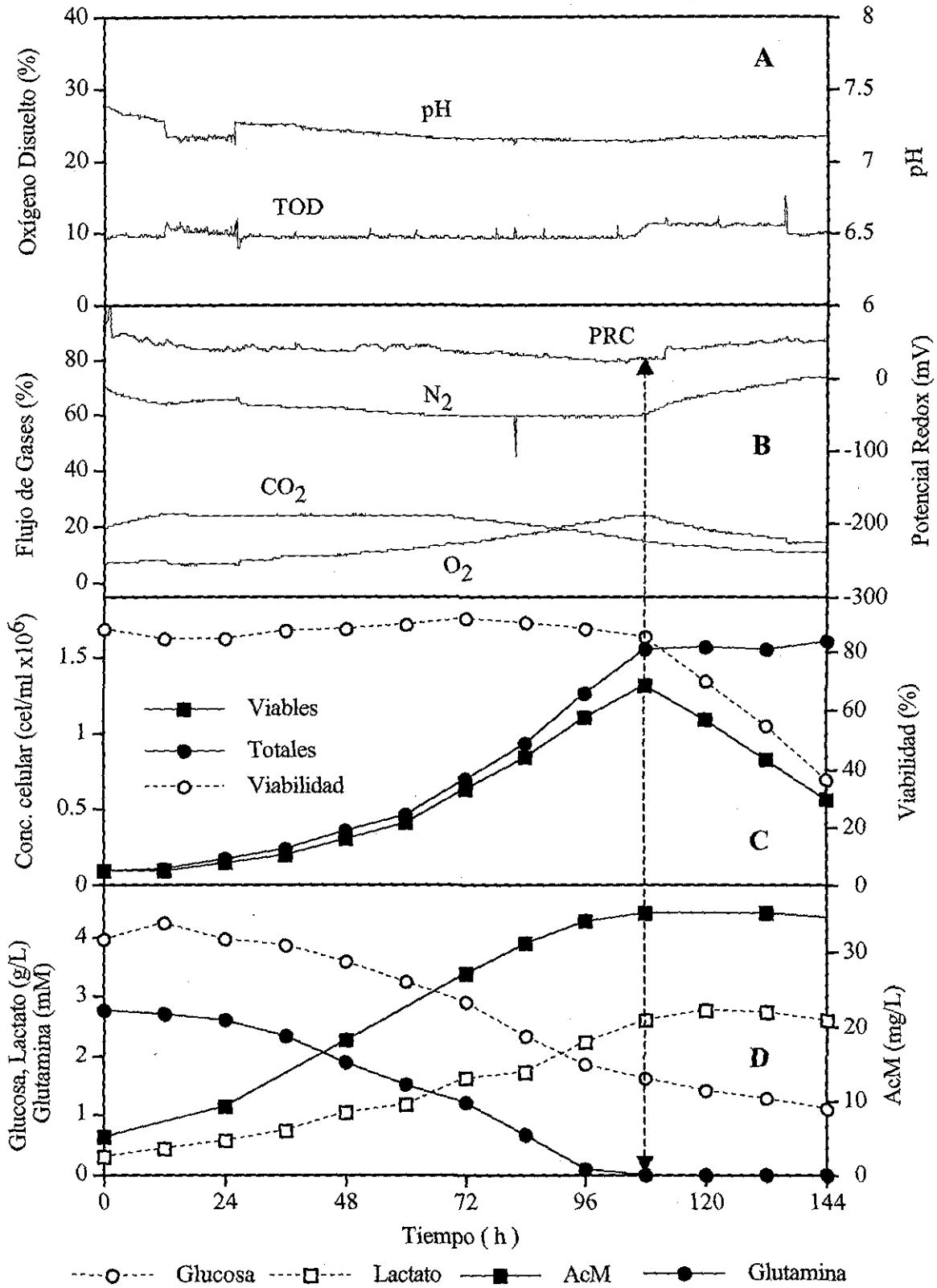


Figura 5.6. Cultivo típico al 10 % de TOD constante.

En la Figura 5.6A se observa el comportamiento del oxígeno disuelto y el pH a lo largo del cultivo. En la Figura 5.6B se muestra el comportamiento en los flujos de los gases de entrada (N_2 , CO_2 y O_2) para poder controlar el cultivo a TOD y pH constantes. Se ve como el porcentaje del flujo de oxígeno aumenta a lo largo del cultivo, siguiendo un perfil exponencial, para finalmente disminuir. De tal forma, el flujo de oxígeno es un indicador del estado metabólico de las células. Si se considera que el $k_L a$ permanece constante a lo largo del cultivo (Lavery y Nienow, 1987), el porcentaje del flujo de oxígeno es directamente proporcional al consumo de oxígeno por las células. El porcentaje del flujo de nitrógeno muestra un comportamiento inverso al de la válvula de oxígeno; esto se debe a que el nitrógeno tiene una función compensatoria con la finalidad de mantener constante el flujo total de los gases. El flujo de CO_2 sirve para mantener constante el pH al inicio del cultivo, posteriormente va disminuyendo para compensar la producción de CO_2 y lactato por las propias células. También se muestra el comportamiento del potencial redox del cultivo (PRC) a lo largo del cultivo -el cual fue únicamente monitoreado-. Se observa un potencial reductor del medio de cultivo durante la etapa de crecimiento como consecuencia de la producción de especies reductoras -tioles- (Hwang y Sinskey, 1991), seguido de un potencial oxidante una vez que las células empiezan a morir. Este comportamiento del PRC tiene implicaciones operacionales importantes ya que permite identificar cuando empiezan a morir las células; en nuestros cultivos, coincide con el agotamiento de glutamina (línea punteada). Tal comportamiento ya ha sido reportado por Meneses (2001) e Higareda (1994) para cultivos por lote de la misma línea celular (BCF2) a 50 % de TOD constante. En la Figura 5.6C se muestra la concentración y viabilidad celular. La viabilidad se mantuvo relativamente constante y alta 90 % durante las primeras 96 h para después descender continuamente hasta 35 %, momento en el que se suspendió el cultivo. Se puede observar que la caída en la viabilidad coincide con el agotamiento de glutamina (línea punteada) y esto se debe a que la glutamina es la principal fuente de carbono para algunas líneas celulares de mamífero, como los hibridomas (Zielke *et al.*, 1976; Reitzer *et al.*, 1979). La máxima concentración de células viables y totales fue de 1.3×10^6 cel/mL y 1.5×10^6 cel/mL, respectivamente. Tales valores se presentaron a las 108 h de cultivo. En la Figura 5.6D se muestra que la máxima concentración de AcM alcanza 35 mg/L al cuarto día del cultivo. También se muestra el comportamiento del consumo de glucosa y la formación de lactato. Los cultivos arrancaron con una concentración inicial de glucosa de 4 g/L. La concentración de lactato final alcanza

aprox. 3 g/L. Esta producción de altas concentraciones de lactato en condiciones aerobias (glicólisis aerobia) es un comportamiento típico de los hibridomas y ha sido reportado anteriormente por Luan *et al.* (1987), Phillips *et al.* (1987) y Kobayashi *et al.* (1992).

Cultivos a TOD oscilante

Se realizaron 12 cultivos a TOD oscilante en donde se experimentaron cuatro diferentes períodos de oscilación: 800 s, 1,600 s, 6400 s, y 12,800 s. Cada una de estas condiciones se realizó por triplicado. Para todos los cultivos se estableció un eje de oscilación de 7 % de TOD y una amplitud de oscilación de ± 7 % de TOD. El objetivo de generar ondas que oscilaran entre 0 % y 14 % de TOD, fue para que las células experimentasen el cambio transitorio de concentraciones de oxígeno óptimas (≥ 10 % de TOD), a concentraciones de oxígeno limitantes (≤ 0.5 % de TOD). La temperatura, velocidad de agitación y pH, se controlaron en los mismos valores que en los cultivos a TOD constante.

Cultivos a TOD oscilante con un período de oscilación de 800 s

En la Figura 5.7 se muestra el comportamiento típico de un cultivo con un período de oscilación de 800 s. Los datos de los otros dos cultivos se resumen en el Apéndice E. En la Figura 5.7A se observa el comportamiento de la TOD y el pH a lo largo de la cinética. El pH en este cultivo muestra una delgada banda de oscilaciones, la cual no salió de la tolerancia establecida (0.2). Tal comportamiento oscilatorio comprobó, que es posible establecer una estrategia novedosa para conseguir oscilaciones de pH (manteniendo la TOD cte.) mediante la manipulación del flujo de CO₂ a la entrada del sistema de cultivo, y poder evaluar en un estudio posterior (como perspectiva), el efecto de los gradientes de pH presentes en cultivos de células animales a gran escala. Solamente existe reportado en la literatura el trabajo de Langheinrich y Nienow (1999) para la simulación (en un reactor de escala laboratorio) de los gradientes de pH presentes en cultivos de células animales a gran escala. Sin embargo, no evaluaron el efecto que pueden tener dichos gradientes en el crecimiento y metabolismo de las células. Ellos controlaron el pH mediante la adición de carbonato de sodio (Na₂CO₃), por lo que una evaluación del efecto de las fluctuaciones de pH causadas por cambios en la concentración de CO₂ (situación real) complementaría sus resultados.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

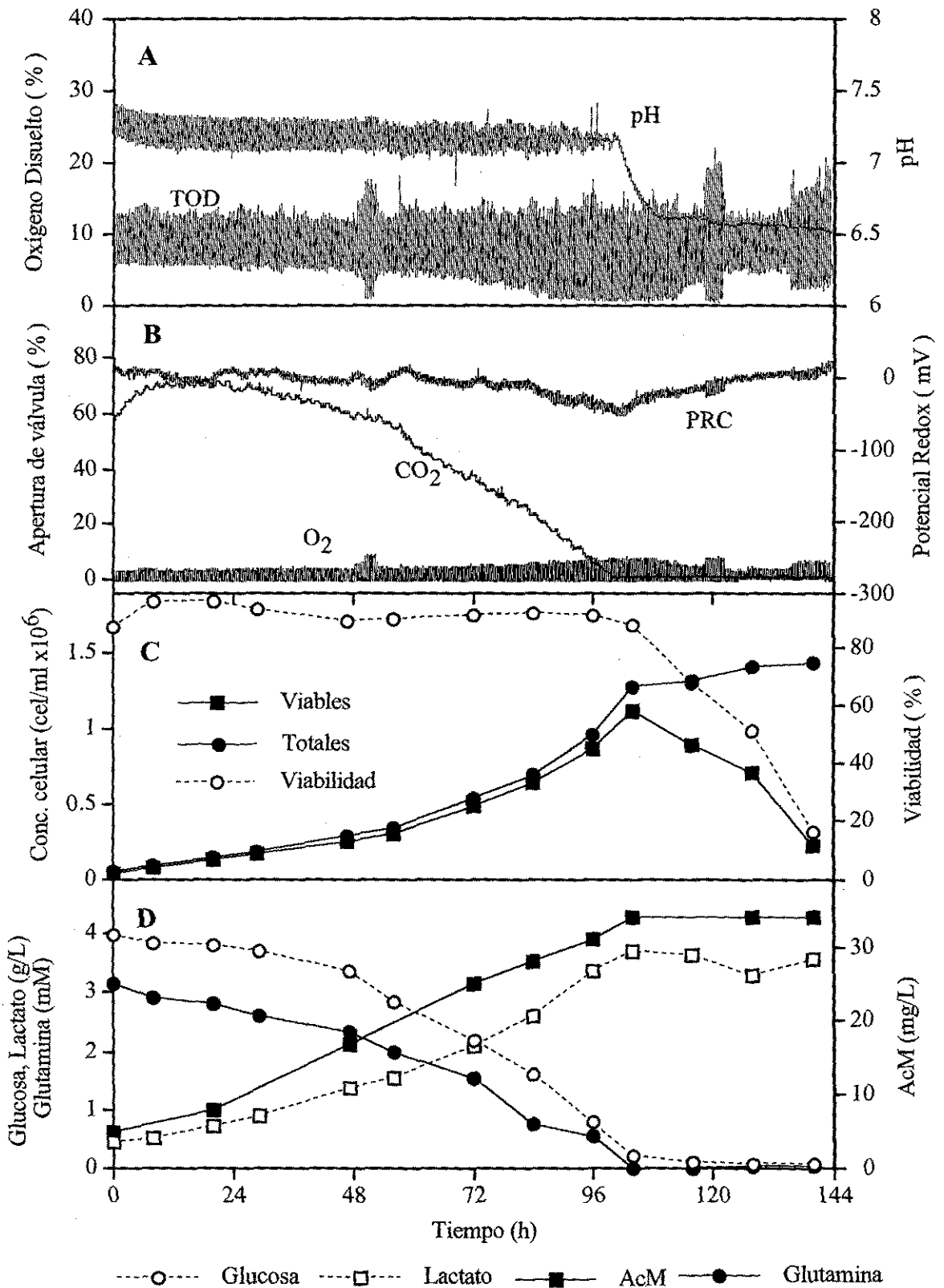


Figura 5.7. Cultivo a TOD oscilante con un período de oscilación de 800 s.

En la Figura 5.7A también se observó que el consumo de oxígeno de las células ayudó a que las oscilaciones de TOD alcanzaran la amplitud de onda deseada, llegando hasta el punto más bajo (0 % de TOD) ya que, al inicio del cultivo, la oscilación no alcanzó tal nivel. En el duplicado y triplicado (Apéndice E) se consiguió mejorar el control de las oscilaciones para que llegaran a 0 %.

En la Figura 5.7B se aprecia el porcentaje de apertura de las válvulas de N₂, CO₂ y O₂ que fueron utilizados para poder controlar el cultivo a TOD oscilante y pH constante en los valores deseados. Aunque el flujo de O₂ que se introdujo al simulador presenta un perfil oscilatorio, es evidente un aumento progresivo en el flujo del gas. Este comportamiento, al igual que en los cultivos a TOD constante, es un indicador del consumo de oxígeno y por ende del estado metabólico de las células. En esta misma figura se observa la disminución en el flujo de CO₂, que ya se explicó para el cultivo a TOD constante. También se presenta el comportamiento del PRC, para el cual se vio una disminución a medida que avanzó el cultivo y un aumento drástico de potencial aproximadamente a las 96 horas. Este cambio del PRC coincide también (como se explicó para el cultivo a TOD constante) con el momento en que las células dejan de respirar y comienzan a morir. La tendencia del PRC que se observó, fue similar al mostrado para los cultivos a TOD constante, con la diferencia de que, en vez de ser una línea constante, presentó un perfil oscilatorio debido al comportamiento oscilatorio en la TOD.

En la Figura 5.7C se muestran la concentración y la viabilidad celular, alcanzándose una concentración de alrededor de 1.4×10^6 cel/mL y 1.0×10^6 cel/mL células totales y viables, respectivamente. En comparación con los cultivos a TOD constante, en estos cultivos se observó una ligera disminución en la concentración de células totales y viables máximas. También se muestra que la viabilidad se mantuvo por encima del 90 % hasta las 96 horas de cultivo aproximadamente, momento en el que la concentración de células viables decrece repentinamente, como consecuencia del agotamiento del nutriente limitante (glutamina).

La concentración de AcM máxima alcanzó aproximadamente 35 mg/L (Figura 5.7D). Esta concentración de AcM es prácticamente igual a la alcanzada en los cultivos a TOD constante, así como a la reportada por Meneses (2001) para cultivos al 50 % de TOD constante con el

mismo hibridoma. Esto es, no se observó un efecto negativo de las oscilaciones de TOD con período de oscilación de 800 s sobre la producción máxima de AcM. También se muestra como se comportó el consumo de glucosa y la formación de lactato. A diferencia de los cultivos a TOD constante (donde la concentración de lactato que se alcanza es de por sí alta a condiciones de TOD no limitantes -glucólisis aerobia-), en los cultivos a TOD oscilante se observó un aumento en el consumo de glucosa, llegando la concentración de esta a niveles cercanos a cero en las etapas finales del cultivo. La concentración de lactato aumentó, alcanzando concentraciones máximas de 4 g/L, es decir un 100 % de conversión de glucosa a lactato. Kobayashi *et al.* (1992) reportaron para cultivos por lote de 3 tipos diferentes de hibridomas, una conversión de glucosa a lactato del 100 %, en un medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino (SFB) y a diferentes TOD, tanto óptimas (más de 1 ppm de O₂) como limitantes (por debajo de 0.5 ppm de O₂). Sin embargo, al utilizar un medio de cultivo libre de suero, observaron un 85 % de conversión a TOD no limitantes, y un 100 % de conversión a TOD limitantes. Lo anterior se explica por el hecho de que al encontrarse las células en períodos de anaerobiosis, la manera de generar poder reductor -y a su vez energía-, es mediante la vía ácido-láctica (Miller y Blanch, 1991). En cuanto al consumo de glutamina, podemos apreciar que se agotó casi completamente alrededor de las 96 h del cultivo, originando la disminución en la viabilidad del cultivo, y la muerte de las células.

Cultivos a TOD oscilante con periodos de oscilación de 1,600, 6,400 y 12,800 s

Desde el punto de vista del escalamiento descendente, las oscilaciones de TOD con un período de 800 s, son varias veces e incluso un orden de magnitud más grande que los valores de tiempos de circulación reportados en la literatura para reactores a gran escala utilizados en el cultivo de células animales. Por ejemplo, Nienow *et al.* (1996) determinan experimentalmente tiempos de mezclado entre 100 y 250 s para un reactor agitado de 8 m³ utilizado en el cultivo de células animales. Por su parte, Kiss *et al.* (1994) determinaron experimentalmente tiempos de mezclado entre 120 y 360 s para un reactor de 12 m³ utilizado en el cultivo de células animales. Sin embargo, en algunos casos, los períodos de 800 s que se simularon en este estudio se encuentran dentro del mismo orden de magnitud a los reportados por otros autores. Por ejemplo, Doran (1993) reporta tiempos de mezclado calculados con base en correlaciones de la literatura, entre 200 y 1000 s para un reactor tipo air-lift de 10 m³

utilizado en el cultivo de células vegetales. A su vez, Tramper (1995) reporta -con base en correlaciones de la literatura- tiempos de circulación calculados que van de 6 a 140 s para un tanque agitado utilizado en el cultivo de células animales.

Ante la sorprendente carencia de efectos negativos significativos a períodos de oscilación de 800 s, se realizaron tres series más de cultivos, a períodos de oscilación más grandes (1,600 s, 6,400 s y 12,800 s) con la finalidad de conocer la magnitud de las condiciones oscilatorias a las que los hibridomas experimentasen efectos negativos en el crecimiento, metabolismo y producción de AcM. Si bien estos períodos de oscilación ya no representan a los gradientes que se pueden encontrar en reactores a gran escala, si tiene implicaciones tecnológicas importantes en el diseño de estrategias de cultivo novedosas -en condiciones limitantes de oxígeno- orientadas a reducir el daño celular y los costos de producción,.

En las Figuras 5.8, 5.9 y 5.10, que corresponden a los cultivos representativos para 1,600 s, 6400 s y 12,800 s se presenta: en el primer panel (A), los controles de las oscilaciones de TOD así como los controles de pH. En el segundo panel (B), se puede observar el porcentaje de apertura de las válvulas de N₂, CO₂ y O₂ que fueron utilizados para mantener el pH y la TOD oscilante en los valores deseados, así como el comportamiento del PRC. Debido a un desperfecto del electrodo, no se midió el PRC para el cultivo mostrado en la Fig. 5.9. En el tercer panel (C) se presentan los resultados de concentración de células totales y viables, así como la viabilidad. En el último panel (D) se muestran los resultados de concentración de glucosa, glutamina, lactato y AcM. Los duplicados y triplicados para estas tres condiciones se resumen en los apéndices F, G y H.

De los resultados aquí mostrados se observa que a medida que aumenta el período de oscilación, la producción de lactato, que de hecho es alta en los cultivos constantes, es cada vez mayor, resultando en la incapacidad para poder controlar el pH en su valor óptimo en las últimas etapas del cultivo. En comparación con los cultivos a TOD constante se observa que el consumo de glucosa aumenta significativamente a medida que el período de oscilación aumenta, siendo el aumento más considerable entre los cultivos a TOD constante y los que se realizaron con un período de oscilación de 800 s, ya que el aumento observado entre los cultivos con un período de oscilación de 1600, 6400 y 12800, con los de 800 s no fue grande.

de aumento en el consumo de glucosa y en la producción de lactato -a medida que aumento el período de oscilación- se explica por el hecho de que, las células se encuentran expuestas a períodos de anoxia más prolongados, siendo obligadas a satisfacer sus necesidades energéticas bajo un metabolismo anaerobio por medio de la vía ácido-láctica (ante la carencia de oxígeno, necesario para oxidar el piruvato generado por oxidación de glucosa en la vía glicolítica)(Nelson y Cox, 2000). Miller y Blanch (1991) reportan que en cultivos de células animales a bajas TOD, el aumento en la concentración de lactato también se debe a la oxidación incompleta de la glutamina, ya que no es metabolizada a través de fosforilación oxidativa y cadena respiratoria debido a la limitación por oxígeno. El porcentaje de conversión de glucosa a lactato en estas condiciones de cultivo alcanzó el 100 % de conversión y concuerda con el porcentaje obtenido por Kobayashi *et al.* (1992) para tres tipos diferentes de hibridomas cultivados por lote en medio con suero fetal bovino a diferentes concentraciones (0.2, 0.5, 2, 5 y 10 %) de TOD constante.

En cuanto a crecimiento celular, se puede observar que a medida que aumenta el período de oscilación, las concentraciones celulares viable y total disminuyen. Sin embargo, las concentraciones de AcM máximas que se determinaron, no se vieron disminuidas en comparación a las obtenidas en los cultivos a TOD constante. Phillips *et al.*(1987) reportan un comportamiento similar al realizar cultivos por lote de hibridomas a 50, 30 y 10% de TOD constante, obteniendo una disminución en la concentración celular viable al disminuir el porcentaje de TOD. Sin embargo, ellos observan un aumento en la velocidad específica de producción de AcM a medida que disminuye el % de TOD, situación que no se presentó en nuestro estudio (ver Fig. 5.14). Kilburn *et al.* (1969) reportaron también una disminución en la concentración celular viable de células LS de ratón al realizar cultivos por lote en condiciones extremas de TOD, tanto altas (90 y 200 %) como bajas (1 %). Adicionalmente observaron un aumento en la concentración de lactato producido en los cultivos a bajas concentraciones de oxígeno disuelto.

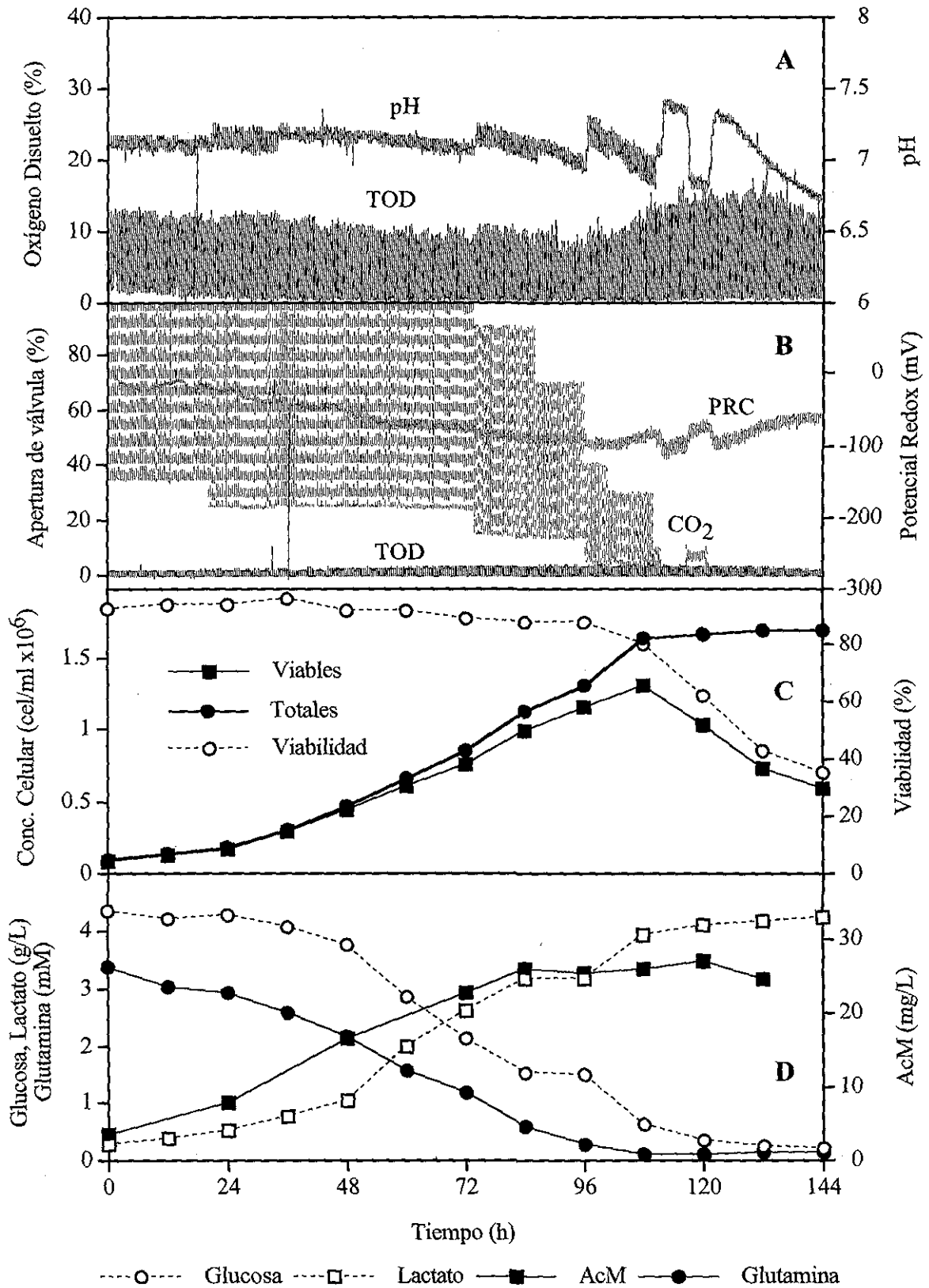


Figura 5.8. Cultivo a TOD oscilante con un período de oscilación de 1,600 s.

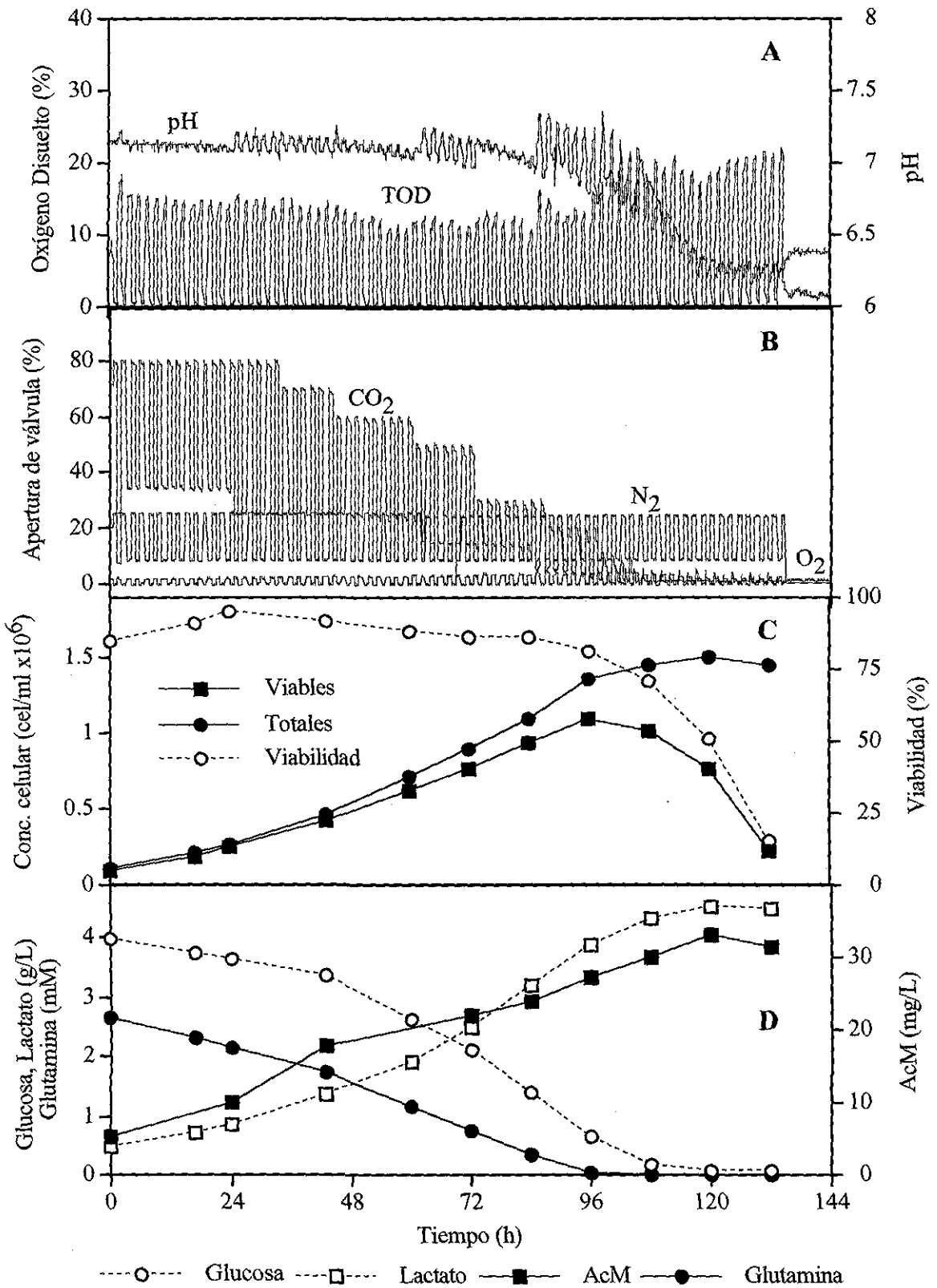


Figura 5.9. Cultivo a TOD oscilante con un período de oscilación de 6,400 s.

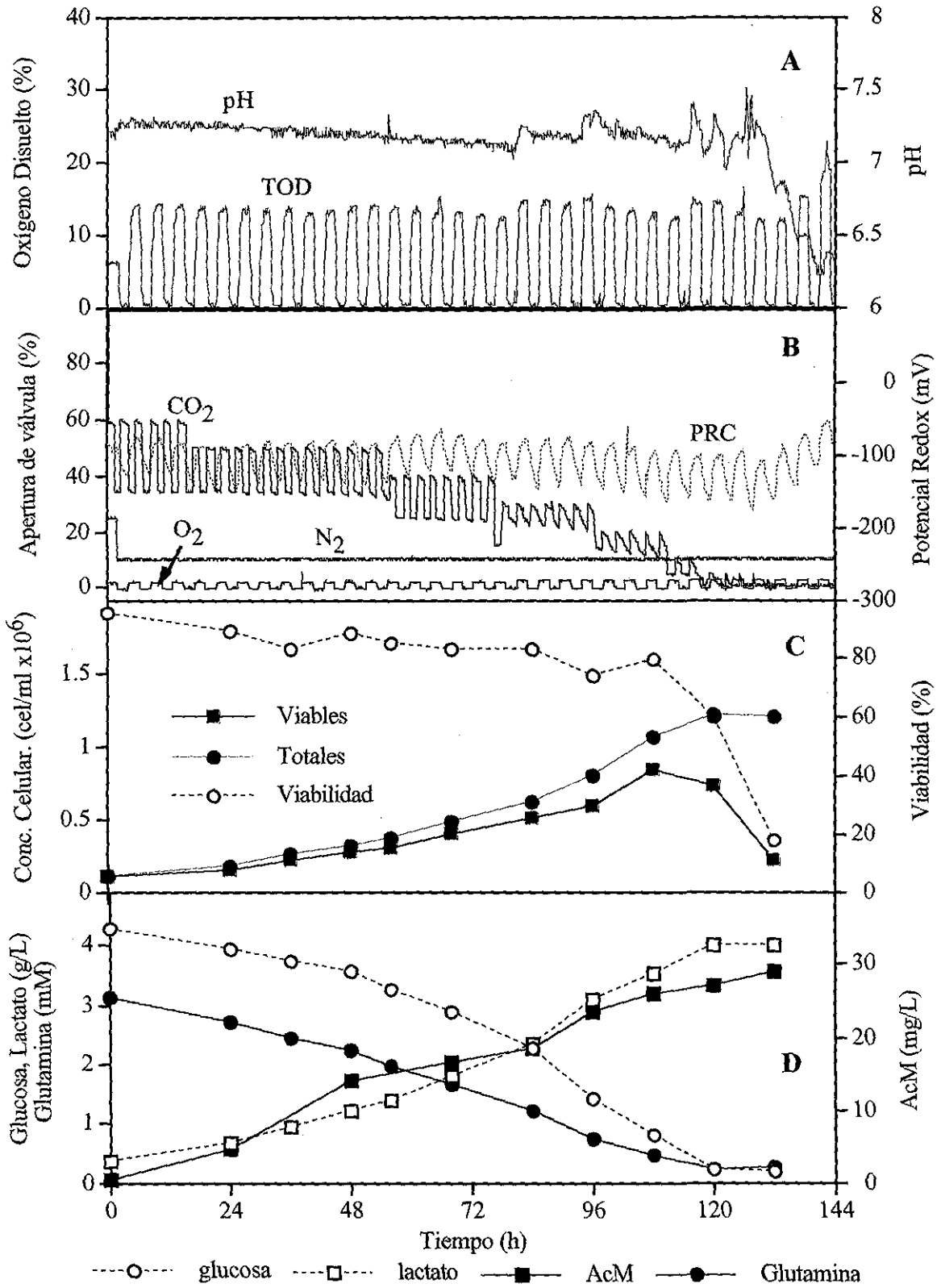


Figura 5.10. Cultivo a TOD oscilante con un período de oscilación de 12,800 s.

En las Figuras 5.11 a 5.15 se presenta, el análisis global de los principales coeficientes de cultivo determinados. Se graficó el valor promedio de los tres cultivos realizados para cada una de las condiciones oscilatorias evaluadas y las barras de error son su desviación estandar.

Rendimiento de lactato producido por célula y de células por glucosa consumida

En cuanto al rendimiento de lactato producido por célula (ver Figura 5.11) se observó un incremento drástico (de 1.5×10^{-9} a 4.0×10^{-9} gLac/cel) a medida que el período de oscilación aumenta. Esto se explica porque a medida que el período de oscilación aumenta, el tiempo de exposición a períodos de anoxia se hace más largos, lo que ocasiona que las células modifiquen sus mecanismos de oxidación de glucosa y glutamina para la producción de energía, mediante la producción de lactato (Glacken *et al.*, 1985). En cuanto al rendimiento de células por glucosa consumida (Fig. 5.11) se observó una disminución de 0.4×10^9 a 0.2×10^9 cel/gGlc a medida que el período de oscilación aumenta. Esto se explica porque la glucosa, en vez de generar biomasa, se utilizó para producir energía mediante glucólisis aerobia (Kilburn *et al.*, 1969; Phillips *et al.*, 1987). Los dos comportamientos mostrados en la Fig 5.11 concuerdan con los reportados por Ozturk y Palsson, (1990) y Miller *et al.* (1988) para cultivos en continuo de hibridomas sometidos a diferentes concentraciones de TOD en el intervalo de 0.1% a 100 % de TOD.

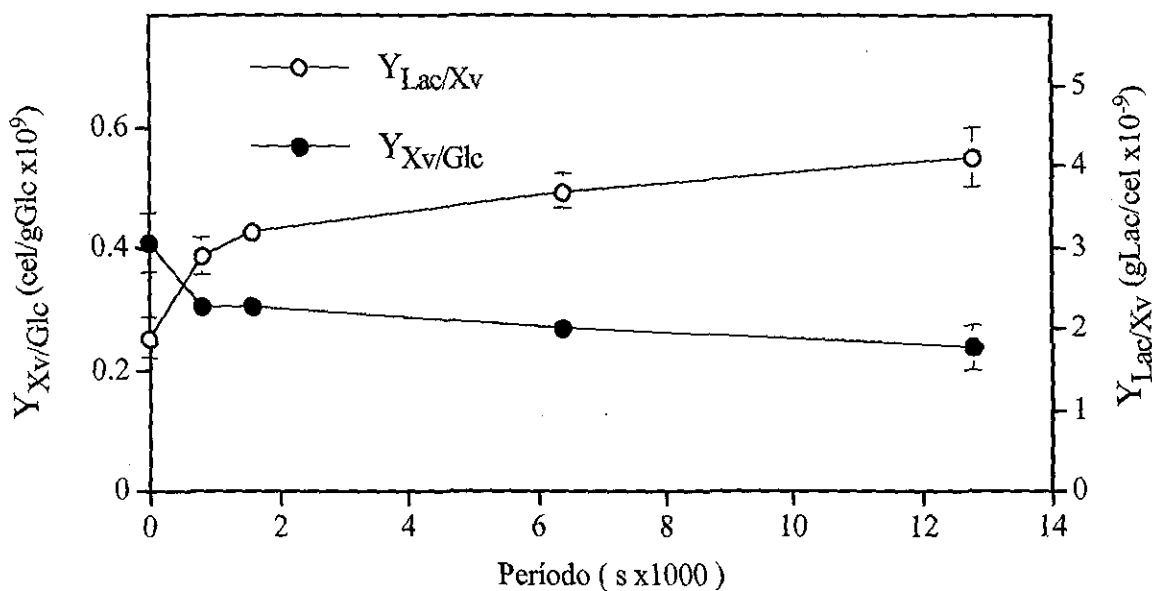


Figura 5.11. Rendimiento de lactato por célula y de células por glucosa consumida.

Rendimiento de AcM producido por célula y de células por glutamina consumida

Como se observa en la Figura 5.12, el rendimiento de anticuerpo monoclonal producido por célula mostró un aumento muy ligero de 0.05×10^{-6} a 0.07×10^{-6} mgAcM/cel, al pasar de los cultivos a TOD constante, a los cultivos con el período de oscilación más grande (12,800 s), por lo que no se consideró un aumento significativo. Phillips *et al.* (1987) y Reuveny *et al.* (1986) reportaron que los valores de oxígeno disuelto óptimos para la producción de AcM se encuentran por debajo de 10 % de TOD y son sub-óptimas para el crecimiento (50 % de TOD). Por el contrario, más recientemente, Miller *et al.* (1987 y 1988) y Ozturk y Palsson (1990 y 1991) concluyeron que los valores óptimos de TOD para producción de AcM son de 50 y 35 % respectivamente y que los óptimos para el mejor crecimiento son de 0.05 y 1 %, respectivamente. Sin embargo, en nuestro estudio encontramos que el rendimiento de AcM es independiente de las fluctuaciones de TOD. En cuanto al rendimiento de células generadas por glutamina consumida, se observó una ligera disminución a medida que el período de oscilación aumentó, de 0.4×10^9 a 0.3×10^9 cel/mmolGln entre los cultivos a TOD constante y los cultivos con un período de oscilación de 12,800 s. Este resultado concuerda con los de disminución en el rendimiento de células generadas por glucosa consumida, y se explica por el hecho de que la glutamina fue oxidada para producir energía, mas que para generar biomasa (Glacken *et al.*, 1985).

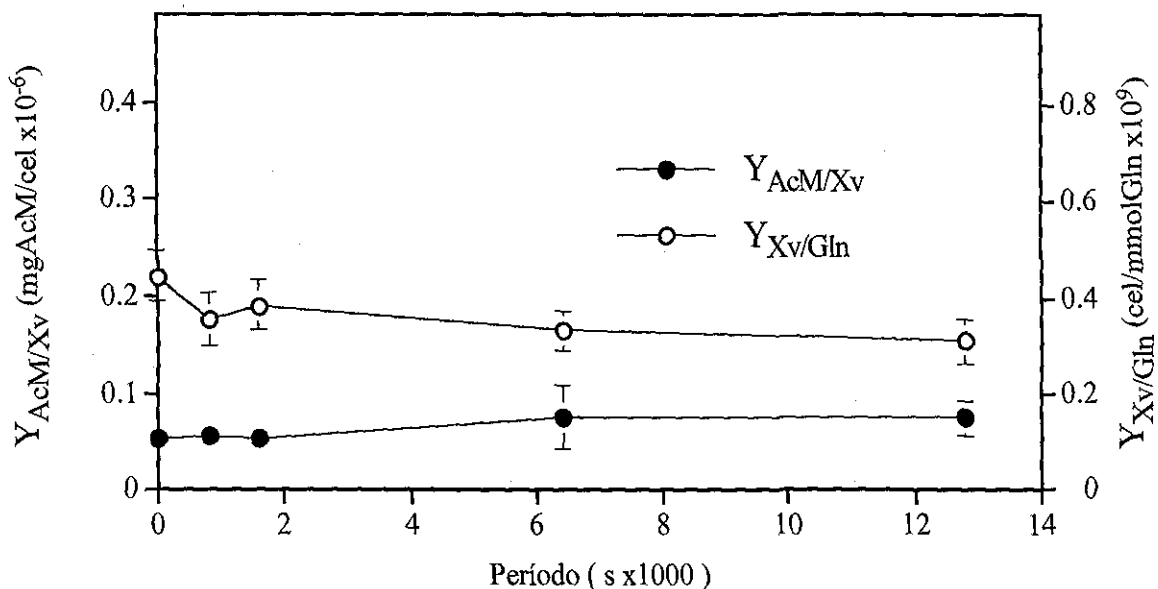


Figura 5.12. Rendimiento de AcM producido por célula y de células por glutamina.

Velocidades específicas de producción de lactato y de consumo de glucosa

Como puede verse en la Figura 5.13, las velocidades específicas de producción de lactato y de consumo de glucosa aumentaron al aumentar el período de oscilación de cero a 800 s, para mantenerse en esos valores en los cultivos a períodos de oscilación mayores (1,600, 6,400 y 12,800 s). El aumento que se obtuvo en q_{Lac} fue de 0.06×10^{-9} a 0.09×10^{-9} gLac/cel h, y el aumento en q_{Glc} fue de 0.08×10^{-9} a 0.1×10^{-9} gGlc/cel h. Miller *et al.* (1987) realizaron -en cultivos continuos de hibridomas- un barrido a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto (0.1 a 100% de TOD) y reportaron un incremento en la velocidad específica de producción de lactato cuando las células fueron sometidas a TOD por debajo de 10 %, lo cual concuerda con nuestros resultados. Este aumento en q_{Lac} y q_{Glc} se debe a la necesidad para compensar los requerimientos de energéticos, debido la incompleta oxidación de la glutamina. Estos resultados también explican porqué el control del pH fue muy eficiente en los cultivos a TOD constante, mientras que a partir de los cultivos con período de oscilación de 800 s, el pH ya no se controló tan fácilmente, debido al aumento en la concentración de lactato.

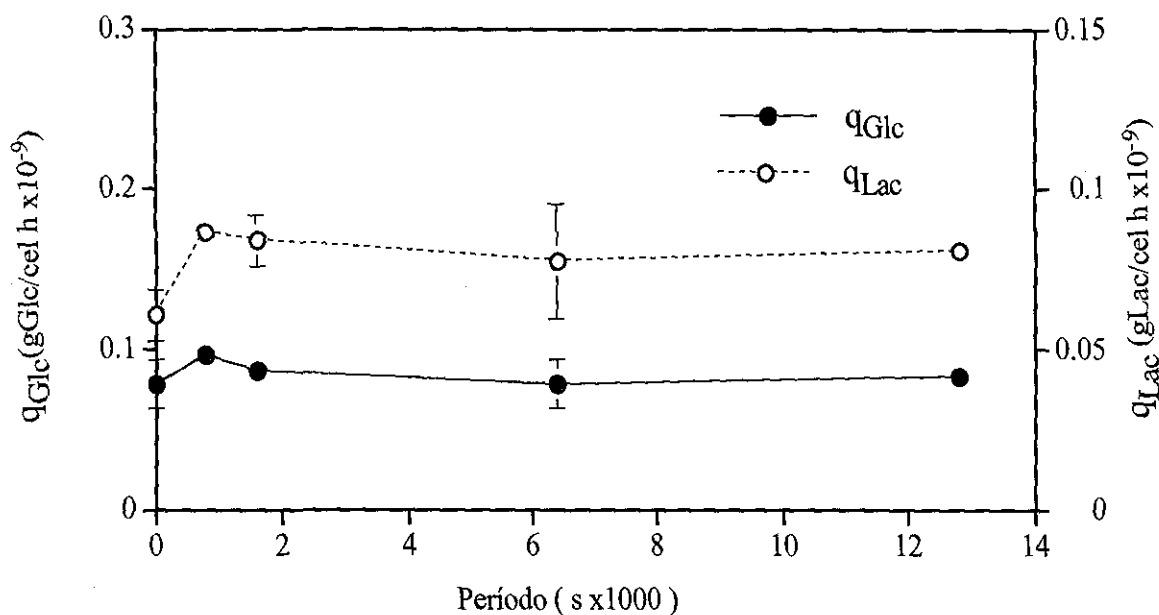


Figura 5.13. Velocidades específicas de producción de lactato (q_{Lac}) y de consumo de glucosa (q_{Glc}).

Velocidades específicas de producción de AcM y de consumo de glutamina

En la Figura 5.14 podemos observar que la velocidad específica de producción de AcM fue independiente de la magnitud del período de oscilación, con un valor aproximado de 1.5×10^{-9} mgAcM/Xv h. Este resultado concuerda con los reportados por Ozturk y Palsson (1990) para cultivos continuos de hibridomas a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto. Ellos reportaron que las máximas concentraciones de AcM se obtuvieron a 35 % de TOD. Sin embargo, la velocidad específica de producción de AcM fue independiente de la concentración de oxígeno disuelto, con un valor aproximado de 2.5×10^{-9} mgAcM/cel h. En la Figura 5.14 podemos observar también que la velocidad específica de consumo de glutamina se mantuvo relativamente constante a medida que aumentó el período de oscilación (en aproximadamente 0.070×10^{-9} mmolGln/cel h) y no se observó una diferencia entre los cultivos a TOD constante y los oscilantes. Este resultado tiene el mismo comportamiento que el reportado por Ozturk y Palsson (1990). Ellos reportan una velocidad específica de consumo de glutamina de aproximadamente 0.030×10^{-9} mmolGln/cel h, la cual fue independiente de la concentración de oxígeno disuelto a la que fue sometido el cultivo continuo.

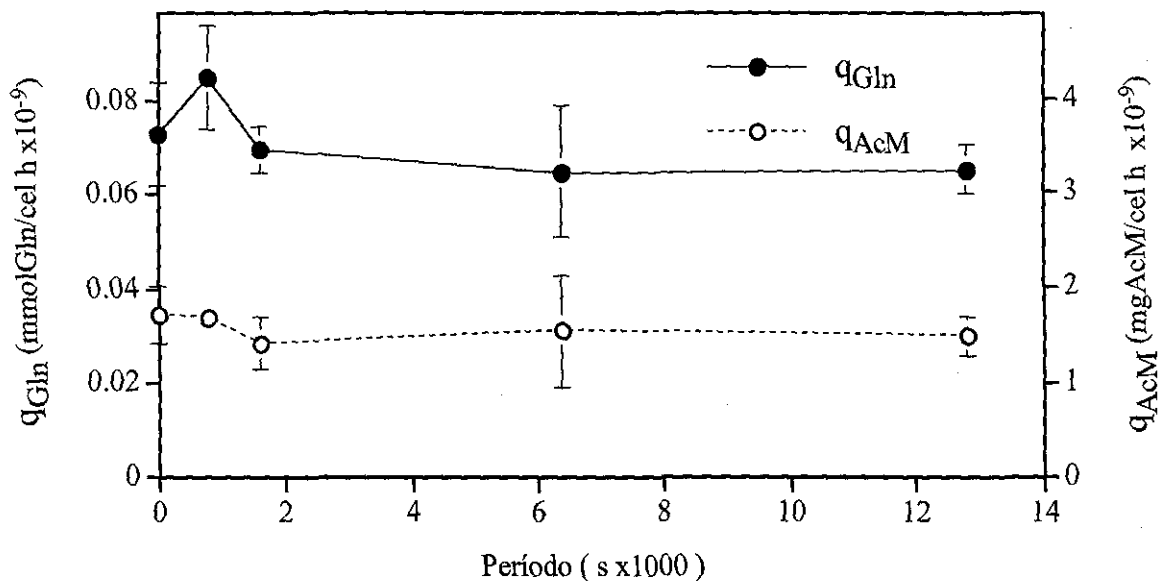


Figura 5.14. Velocidades específicas de producción de AcM (q_{AcM}) y de consumo de glutamina (q_{Gln}).

Velocidad específica de crecimiento vs período de oscilación

En la Figura 5.15 se observa un decremento en cuanto a la velocidad específica de crecimiento a medida que el período de oscilación aumenta. La μ disminuyó desde 0.032 h^{-1} en los cultivos constantes, hasta 0.020 h^{-1} en el extremo de los cultivos oscilantes (12,800 s). Es decir que, células con un tiempo de duplicación de 21 horas (bajo oxígeno disuelto constante), debido a las fluctuaciones de oxígeno disuelto, aumentaron su tiempo de duplicación a 34 horas en la condición oscilatoria extrema. Es importante notar que a períodos de oscilación de 800 s ó menores, ésta disminución de la velocidad específica de crecimiento no es significativa. Lo cual muestra la confiabilidad para llevar a cabo procedimientos de escalamiento ascendente sin la preocupación por el efecto sobre éste parámetro. Phillips *et al.* (1987) reportaron un comportamiento similar al realizar cultivos por lote de hibridomas a 50, 30 y 10 % de TOD constante, obteniendo una disminución desde 0.032 h^{-1} hasta 0.017 h^{-1} al bajar el % de TOD. Sin embargo, ellos observaron un aumento en la velocidad específica de producción de AcM a medida que disminuye el % de TOD, situación que no se presentó en nuestro estudio.

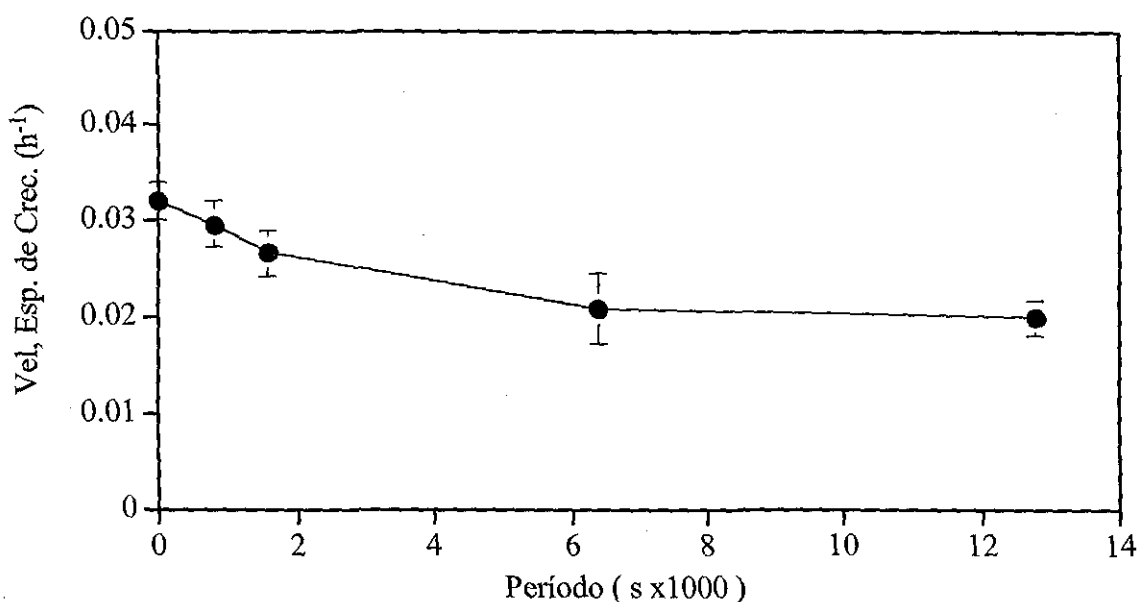


Figura 5.15. Velocidad específica de crecimiento (μ) vs período de oscilación.

Reconocimiento de la toxina 2 de alacrán por el AcM producido en BCF2

Atendiendo a la inquietud de conocer si el AcM producido por el hibridoma BCF2, conservaba su capacidad para reconocer la toxina 2 del veneno del alacrán, se procedió a realizar este ensayo. Se tomaron las muestras de dos cinéticas de crecimiento indistintas (círculos y cuadros) de hibridomas. Se les determinó la concentración de AcM producido utilizando, como primer ligando en la placa de ELISA, un AcM anti-ratón (círculos y cuadros abiertos) que cuantifica la totalidad del AcM de ratón presente. Se compararon contra las concentraciones de AcM determinadas, utilizando ahora como primer ligando en el fondo de la placa de ELISA, toxina 2 de alacrán que cuantifica, de todo el AcM de ratón, el que es afin por la toxina 2 de alacrán (círculos y cuadros abiertos). En la Figura 5.16. se puede observar que si hay un reconocimiento del AcM hacia la toxina 2. Dado que la finalidad del ensayo fue, conocer unicamente si existía reconocimiento del AcM producido por el hibridoma BCF2, hacia su antígeno (la toxina 2 del alacrán), el ensayo se diseño de una manera empírica, por lo que las concentraciones obtenidas entre los dos tipos de ensayos, no son comparables.

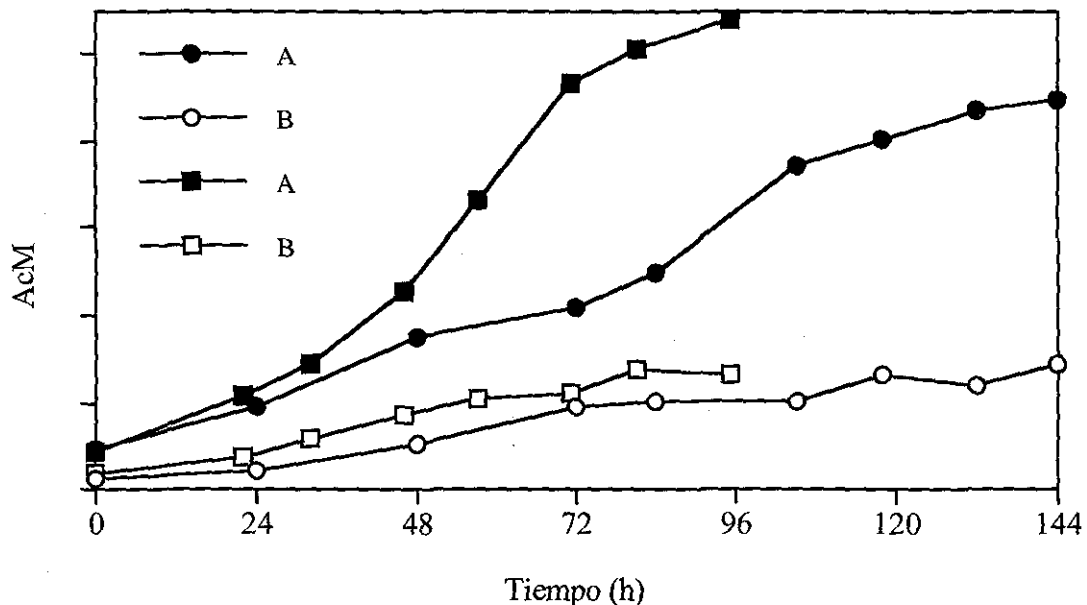


Figura 5.16. Reconocimiento del AcM de BCF2 utilizando: A) toxina de alacrán y B) un AcM anti-ratón.

Capítulo 6 Conclusiones

Los resultados de este estudio arrojaron conclusiones importantes tanto en el aspecto básico como el aplicado.

En este estudio se simularon los gradientes potenciales de las variables de cultivo presentes en los reactores a gran escala para el cultivo de células animales específicamente gradientes de oxígeno disuelto bajo un esquema de escalamiento descendente.

Se encontró que, el metabolismo de los hibridomas, como un modelo de estudio que represente a los cultivos de células animales, contrariamente a la idea que se tiene sobre estas células, no necesitan de condiciones constantes y óptimas de oxígeno disuelto para poder crecer y producir AcM como si estuvieran en condiciones óptimas de cultivo.

En este estudio se encontró que los hibridomas, pueden crecer y producir AcM en sistemas de cultivo que pudieran presentar gradientes de oxígeno disuelto e incluso limitaciones de oxígeno disuelto por periodos prolongados de tiempo, hasta del orden de horas.

Se encontró un aumento en la concentración y velocidad de producción de lactato a medida que los periodos de oscilación aumentaron. Sin embargo, a periodos de oscilación tan largos como 800 s, la producción de lactato no llega a ser un metabolito limitante del crecimiento ni de la producción de AcM.

Se encontró que existe una ligera influencia de los gradientes de concentración de oxígeno disuelto sobre la velocidad específica de crecimiento; sin embargo, periodos de oscilación tan grandes como 12,800 s solamente la redujeron en un 30 %

Se encontro también que, la velocidad específica de producción de AcM, así como de utilización de glutamina, son independientes de las oscilaciones de oxígeno disuelto, dentro de los periodos aquí evaluados.

Desde el punto de vista aplicado, este estudio indicó que existe un margen amplio de seguridad para el escalamiento de los cultivos de hibridomas. Es decir, cultivos a gran escala pueden presentar tiempos de circulación tan largos como 800 s sin presentarse efectos negativos en cuanto a los niveles de expresión del producto de interés. Podemos concluir entonces que la presencia de gradientes de oxígeno disuelto en reactores a gran escala ocasionados por cultivos a altas densidades celulares, o que utilicen líneas celulares con altas demandas de oxígeno, no representan un parámetro crítico que comprometa la productividad del proceso.

El desarrollo del sistema para la simulación de gradientes de oxígeno disuelto, si bien no logró simular los valores de tiempos de circulación reportados en la literatura para cultivos de células animales en reactores a gran escala, si logró simular gradientes de oxígeno dentro del mismo orden de magnitud que los tiempos de circulación reportados por algunos autores.

Durante el desarrollo de este estudio se abrió una línea de investigación para la realización de escalamiento descendente en células animales de manera más extensiva y profunda (evaluando gradientes de pH o CO₂), que se anticipe a los problemas que puedan presentarse durante el escalamiento de los procesos de cultivo de células animales

Capítulo 7 Perspectivas

Durante el desarrollo de este estudio, se vio la necesidad de realizar estudios de escalamiento descendente mas amplios y con mayor profundidad. Se plantea como una de las perspectivas, evaluar el efecto de los gradientes de pH que se presentan en los cultivos de células animales a gran escala (10 m^3). Se cuenta con un simulador que tiene la capacidad para simular gradientes de pH mediante la manipulación de la presión parcial de CO_2 . La realización de este estudio, en conjunto con los resultados presentados por Langheinrich y Nienow (1999), arrojarán información importante acerca del comportamiento de las células animales ante la presencia de estos gradientes.

Un problema que presentan los cultivos a gran escala de células animales, es la acumulación de altas concentraciones de bióxido de carbono, producto del metabolismo celular. Con el simulador que se diseñó, es posible (y es una buena perspectiva) evaluar el efecto de los gradientes de bióxido de carbono presentes en el medio de cultivo, sobre el metabolismo y la producción de AcM por los hibridomas.

El punto de partida si se desea realizar estudios de escalamiento descendente como los que se plantean, es trabajar más en el diseño de un simulador de mayor dinamismo que el actual. Es decir, un simulador que tenga la capacidad para simular los tiempos de circulación reportados en la literatura (50-300 s).

Dado que en los sistemas de cultivo para células animales no es posible aplicar altas velocidades de agitación o aireación, una estrategia sería diseñar sistemas de cultivo tipo intercambiador de placas (Spier, 1985), pero que en vez de placas metálicas, se utilicen membranas semipermeables a gases (N_2 , CO_2 y O_2), de manera que se tenga una área de transferencia de oxígeno muy grande y esta se realice por difusión para evitar el daño por burbujeo. Con este tipo de sistemas de cultivo se requeriría del bombeo para promover el mezclado del medio de cultivo, lo que permitiría ensamblar fácilmente simuladores de uno o dos compartimentos.

Se plantea también como perspectiva, que durante la evaluación del efecto de las variables medioambientales de cultivo (como son fluctuaciones de TOD, CO₂ y pH), se evalúe también la calidad del producto, no solamente su cantidad. Realizar los estudios de escalamiento descendente a un nivel mas fino en la expresión de los productos de interés como sería la evaluación de la macro y microheterogeneidad de la glicosilación de los anticuerpos monoclonales, teniendo bien presente que son las condiciones de cultivo las que determinan la estructura del oligosacárido y ésta a su vez, la calidad de la proteína.

La tendencia que se observa para los cultivos de células animales a gran escala, es emplear medios de cultivo libres de suero. Se plantea como perspectiva la adaptación de nuestra línea celular a crecer en medio de cultivo libre de SFB y de proteínas de origen animal. Existen reportes en la literatura (Kobayashi et al., 1992) en donde se muestra que, el efecto de las variaciones en las condiciones medioambientales, tiene efectos diferentes en el crecimiento y metabolismo de las células animales, si se cultivan en medio con suero o libre de él.

Referencias

Abel C., Hübner U. and Schügerl K. (1994) Transient behaviour of Baker's yeast during enforced periodical variation of dissolved oxygen concentration. *J. Biotechnol.* **32**:45-57.

Agathos S. N. (1996) Insect cell bioreactors. *Cytotechnol.* **20**:173-189.

Aguilar-Aguila A., Valentinotti S., Galindo E. y Ramírez O.T. (1993) Desarrollo de un sistema amigable y versátil para adquisición de datos y control de bioreactores. *Biotecnología* **3**:S130-S139.

Anderson C., LeGrys G.A. and Solomons G.L. (1982) Concepts in the design of large-scale fermenters for viscous culture broths. *The Chem. Eng.* February, pp.43-49.

Atkinson B. and Mavituna F. (1987) *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, Macmillan Publishers., New York, pp. 740-745.

Bailey J. E. and Ollis D. F. (1986) *Biochemical Engineering Fundamentals*, Mc Graw Hill., New York.

Buse R., Qazi G.N. and Onken U. (1992) Influence of constant and oscillating dissolved oxygen concentrations on keto acid production by *Gluconobacter oxydans* subsps. *Melanogenum*. *J. Biotechnol.* **26**:231-244.

Court J. R. (1988) Computers in fermentation control, In: *Progress in Industrial Microbiology, Vol 25, Computers in fermentation technology*, Bushell M.E. (Ed.), Elsevier Science, Amsterdam. pp.1-46.

Davison B.H. and Stephanopoulos G. (1986) Effect of pH oscillations on a competing mixed culture. *Biotechnol. Bioeng.* **28**:1127-1137.

De León A. (1996) Diseño y caracterización de un simulador de gradientes de oxígeno disuelto: Aplicación al proceso de producción de penicilino acilasa por *Escherichia coli* recombinante. *Tesis de Maestría*, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

De León A. (1999) Cultivo de células hematopoyéticas humanas suspendidas en reactores instrumentados: Utilidad de la velocidad de consumo de oxígeno y el potencial redox. *Tesis de Doctorado*, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Doran P.M. (1993) Design of reactors for plant cells and organs, In: *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, Fiechter A. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 115-168.

Doran P.M. (1998) *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*, Editorial Acribia., Zaragoza, pp. 214-218.

Einsele A. (1978) Scaling Up Bioreactors. *Process Biochem.* July, pp:13-14.

Elias C.B., Zeiser A., Bédard Ch. and Kamen A.A. (2000) Enhanced growth of Sf-9 cells to a maximum density of 5.2×10^7 cells per mL and production of β -galactosidase at high cell density by fed batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* **68**:381-388.

Ernst and Young (2001) Biotech drug approvals still owe success to big pharma partnerships, *Focus on Fundamentals, The Biotechnology Report*, 15th Annual Review, pp. 68-73.

Feijen J., Hofmeester J.J.M. (1991) Gradients in production scale bioreactors. *Bioreactor Engineering Course Workshops Notes*, Berovic M. and Koloini T. (Eds.), Boris Kidric Institute of Chemistry, Ljubljana, pp. 93-116.

Freshney R.I. (1983) *Culture of animal cells, A manual of basic technique*. Chap. 19, Quantitation and experimental design, Alan R. Liss, Inc., pp. 199-202.

Galindo E. (1996) Traslación de escala. Memorias del V Curso Latinoamericano de Biotecnología y XXII Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica, Universidad Católica de Valparaíso, Chile, pp. 1-20.

Gavilondo J.V. (1995) *Anticuerpos monoclonales*, Editorial Elfos, La Habana, Cuba, pp 39-51.

Glacken M. W., Fleischaker R. J. and Sinskey A. J. (1985) Reduction of waste product excretion via nutrient control: possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* **28**:1376-1389.

Glennie M.J. and Johnson P.W.M. (2000) Clinical trials of antibody therapy. *Immunology Today*, **21**,8:403-412

Heidemann R., Lütkemeyer D., Büntemeyer H. and Lehmann J. (1998) Effects of dissolved oxygen levels and the role of extra-and intracellular amino acid concentrations upon the metabolism of mammalian cell lines during batch and continuous cultures. *Cytotechnol.* **26**:185-197.

Higareda A. E. (1994) Estrategias para optimizar la producción de anticuerpos monoclonales por cultivos de hibridomas en suspensión. *Tesis de Maestría*, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Hu W.S., Mier J., and Wang D.I.C. (1986) Use of surface aerator to improve oxygen transfer in cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* **28**:122-125.

Hwang Ch. and Sinskey A. J. (1991) The role of oxidation-reduction potential in monitoring growth of cultured mammalian cells. In: Production of Biologicals from Animal Cells in Culture, Spier R. E., Griffiths J. B. and Meignier (Eds.), B. Halley Court, Oxford, pp. 548-567.

Johnson M.J., Borkowski J. and Engblom C. (1964) Steam sterilizable probes for dissolved oxygen measurement. *Biotechnol. Bioeng.* **6**:457-468.

Kataoka H., Sato S., Mukataka S., Namiki A., Yoshimura K. and Takahashi J. (1986) Effects of periodic change in pressure and dissolved-oxygen concentration on the incubation characteristics of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol. Bioeng.* **28**:663-667.

Kilburn D. G., Lilly M. D., Self D. A. and Webb F.C. (1969) The effect of dissolved oxygen partial pressure on the growth and carbohydrate metabolism of mouse LS cells. *J. Cell Sci.* **4**:25-37.

Kiss R., Croughan M., Trask J., Polastri G., Groenhout M., Banka A., Shurin S., Paul J. and Koning-Bastiaan H. (1994) Mixing time characterization in large scale mammalian cell bioreactors. Paper presented at AIChE Annual Meeting, November de 1994, San Francisco, Cal., U.S.A.

Kobayashi T., Ogawa T., Kamihira M., Yoshida H. and Iijima S. (1992) Effect of dissolved oxygen concentration on monoclonal antibody production in hybridoma cell cultures. *J. Ferment. Bioeng.* **74**:372-378.

Köhler G. and Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificities. *Nature*, **256**:495.

Konz J. O., King J. and Cooney Ch. L. (1998) Effects of oxygen on recombinant protein expression. *Biotechnol. Prog.*, **14**:393-409.

Kristiansen B. and McNeil B. (1987) The design of a tubular loop reactor for scale-up and scale-down of fermentation processes, In: *Proceedings of the International Conference on Bioreactors and Biotransformations*, Gleneagles, Scotland, pp. 321-334.

Langheinrich C., Nienow A.W., Eddleston T., Stevenson N.C., Emery A.N., Clayton T.M. and Slater N.K.H. (1998) Liquid homogenization studies in animal cell bioreactors of up to 8 m³ in volume. *Trans IChemE*. **76** (Part C):107-116.

Langheinrich C. and Nienow A.W. (1999) Control of pH in large-scale, free suspension animal cell bioreactors: alkaly addition and pH excursions. *Biotechnol. Bioeng.* **66**:171-179.

Larsson G. and Enfors S.-O. (1988) Studies of insufficient mixing in bioreactors: effects of limiting oxygen concentrations and short term oxygen starvation on *Penicillium chrysogenum*. *Biopr. Eng.* **3**:123-126.

Lavery M. and Nienow A.W. (1986) Oxygen transfer in animal cell culture medium. *Biotechnol. Bioeng.* **30**:368-373.

Lee Y.H. and Tsao G.T. (1979) Dissolved oxygen electrodes, In: *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 13, Ghose T.K., Fietcher A., Blakebrough N. (Eds.), Springer Verlag, Berlin, pp. 35-85.

Leist Ch. H. (2001) Animal cell culture technology: fields of application and investigation, In: *Bioprocess Engineering Course Notes*, The European Federation on Biotechnology, Kieran P. and Berovic M. (Eds.), Croasia, pp. 240-266.

Lodish H., Berk A., Zipurski S. L., Matsudaira P., Baltimore D. and Darnell J.E. (2000) *Molecular Cell Biology*, W.H. Freeman & CO., New York, pp. 618-664.

Luan Y.T., Mutharasan R. and Magee W.E. (1987) Strategies to extend longevity of hybridomas in culture and promote yield of monoclonal antibodies. *Biotechnol. Lett.* **9**:691-696.

Manfredini R., Caballera V., Marini L. and Donati G. (1983) Mixing and oxygen transfer in conventional stirred fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* **25**:3115-3131.

McKeehan W. L. (1982) Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. *Cell Biol. Int. Rep.* **6**:635-650.

Meneses A. A. (2001) El potencial de óxido-reducción: implicaciones y efectos en el cultivo de células de eucariotes superiores. *Tesis de Doctorado*, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Miller W. M. and Blanch H. W. (1991) Regulation of animal cell metabolism in bioreactors, In: Animal cell bioreactors, Ho C. S. and Wang D. I. C. (Eds.), *Butterworth-Heinemann*, MA, pp.119-159.

Miller W. M., Wilke Ch. R. and Blanch H. W. (1987) Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. *J. Cell. Physiol.*, **132**:524-530.

Miller W. M., Wilke Ch. R. and Blanch H. W. (1988) Transient responses of hybridoma metabolism to changes in the oxygen supply rate in continuous culture. *Bioprocess Eng.*, **3**:103-111.

Namdev P. K., Irwin N., Thompson B.G. and Gray M.R. (1993) Effect of oxygen fluctuations on recombinant *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **41**:666-670.

Nelson D. L. and Cox M.M. (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, New York, pp. 542-545.

Neubauer P., Häggström L. and Enfors S.-O. (1995) Influence of substrate oscillations on acetate formation and growth yield in *Escherichia coli* glucose limited fed-batch cultivations. *Biotechnol. Bioeng.* **47**:139-146.

Nienow A.W., Langheinrich Ch., Stevenson N.C., Emery A.N., Clayton T.M. and Slater N.K.H. (1996) Homogenization and oxygen transfer rates in large agitated and sparged animal cell bioreactors: some implications for growth and production. *Cytotechnol.* **22**:87-94.

Norwood K.W. and Metzner A.B (1960) *AIChE J.* **6**: 432-437

Oldshue J. Y. (1966) Fermentation mixing scale-up techniques. *Biotechnol. Bioeng.* **8**:3-24.

Oosterhuis N.M.G. and Kossen N.W.F. (1984) Dissolved oxygen concentration profiles in a production-scale bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **26**:546-550.

Oosterhuis N.M.G., Kossen N.W.F., Olivier A.P.C. and Schenk E.S. (1985) Scale-down and optimization studies of the gluconic acid fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol. Bioeng.* **27**:711-720.

Ozturk S. S. and Palsson B. O. (1990) Effect of dissolved oxygen on hybridoma cell growth, metabolism, and antibody production kinetics in continuous culture. *Biotechnol. Prog.* **6**:437-446.

Ozturk S. S. and Palsson B. O. (1991) Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor. *Biotechnol. Prog.* **7**:481-494.

Palomares L. A. and Ramírez O.T. (1996) The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. *Cytotechnol.* **22**:225-237.

Palomares L. and Ramírez O.T. (2000) Bioreactor Scale-Down, In: *Encyclopedia of Cell Technology*, Spier R.E. (Ed.), Wiley Interscience, New York, **2**.174-183.

Phillips H. A., Scharer J. M., Bols N. C. and Moo-Young M. (1987) Effect of oxygen on antibody productivity in hybridoma culture. *Biotechnol. Lett.* **9**(11):745-750.

Quintero R. (1993) *Ingeniería Bioquímica*, Editorial Alhambra., México D. F.

Ramírez O.T. and Mutharasan R. (1990) Cell cycle-and growth phase-dependent variation in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **36**:839-848.

Reitzer L. J., Wice B. M. and Kennell D. (1979) Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **254**(8):2669-2676.

Reuveny S., Velez D., Macmillan J.D. and Miller L. (1986) factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. *J. Immunol. Methods.* **86**:53-59.

Rhiel M. and Murhammer D.W. (1995) The effect of oscillating dissolved oxygen concentrations on the metabolism of a *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf21-AE clonal isolate. *Biotechnol. Bioeng.* **47**:640-650.

Sanders P.G. (1990) Protein production by genetically engineered mammalian cell lines, In: *Animal Cell Biotechnology*, Volume 4, Spiers R.E. and Griffiths J.B. (Eds.), Academic Press. London, pp. 16-51.

Sauer P.W., Burky J.E., Wesson M.C., Sternard H.D. and Qu L. (2000) A high-yielding, generic fed-batch cell culture process for production of recombinant antibodies. *Biotechnol. Bioeng.* **67**:585-597.

Schmelzer A.E. and Miller W. M. (2002) Hyperosmotic stress and elevated pCO₂ alter monoclonal antibody charge distribution and monosaccharide content. *Biotechnol. Prog.* **18**:346-353.

Selisko B., Licea A.F., Becerril B., Zamudio F., Possani L.D. and Horjales E. (1999) Antibody BCF2 against scorpion toxin Cn2 from *Centruroides noxius* Hoffmann: primary structure and three-dimensional model as free Fv fragment and complexed with Its antigen. *Proteins: Structure, Function and Genetics*. **37**:130-143.

Solà C. and Gòdia F. (1995) Scale-up, In: *Bioreactor System Design*, Asenjo J. A. and Merchuk J. C.(Eds.), Marcel Dekker, New York, Chap.14. 511-553.

Spier R.E. (1985) Monolayer Growth Systems: Heterogeneous Unit Processes, In: *Animal Cell Biotechnology*, Vol .1, Spier R.E. and Griffiths J.B. (Eds). Academic Press Limited. Orlando, Florida. pp. 243-260

Spier R.E. and Whiteside J.P. (1990) The Oxygenation of Animal Cell Cultures by Bubbles, In: *Animal Cell Biotechnology*, Vol. 4, Spier R.E. and Whiteside J.P. (Eds) Academic Press Limited. San Diego, CA. pp. 133-148.

Stephanopoulos G. (1987) *Chemical Process Control. An Introduction to Theory and Practice*, Prentice-Hall, Inc., New Jersey, pp. 173-185.

Sweere A.P.J., Luyben K.Ch.A.M. and Kossen N.W.F. (1987) Regime analysis and scale-down: tools to investigate the performance of bioreactors. *Enzyme Microb. Technol.* **9**:386-398.

Träger M., Hollman D., Buse R. and Onken U. (1991) Device for fermentations with oscillations of dissolved oxygen. *J. Ferment. Bioeng.* **72**:46-53.

Tramper J. (1995) Oxygen gradients in animal-cell bioreactors. *Cytotechnol.* **18**:27-34.

Tramper J., Vlak J.M. and De Gooijer C.D. (1996) Oxygen gradients in small and big sparged insect-cell bioreactors. *Cytotechnol.* **20**:231-238.

Trujillo-Roldán M.A., Peña C., Ramírez O.T. and Galindo E. (2001) Effect of oscillating dissolved oxygen tension on the production of alginate by *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnol. Prog.* **17**:1042-1048.

Varley J. and Birch J. (1999) Reactor design for large scale suspension animal cell culture. *Cytotechnol.* **29**:177-205.

Zamudio F., Saavedra R., Martin B.M., Gurrola-Briones G., Herion P. and Possani L.D. (1992) Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur. J. Biochem.* **204**:281-292.

Zielke H. R., Ozand P. T., Tildon J. T., Sevdalian D. A. and Cornblath M. (1976) Growth of human diploid fibroblast in the absence of glucose utilization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **73**(11):4110-4114.

Apéndice A:

Fotografía del biorreactor

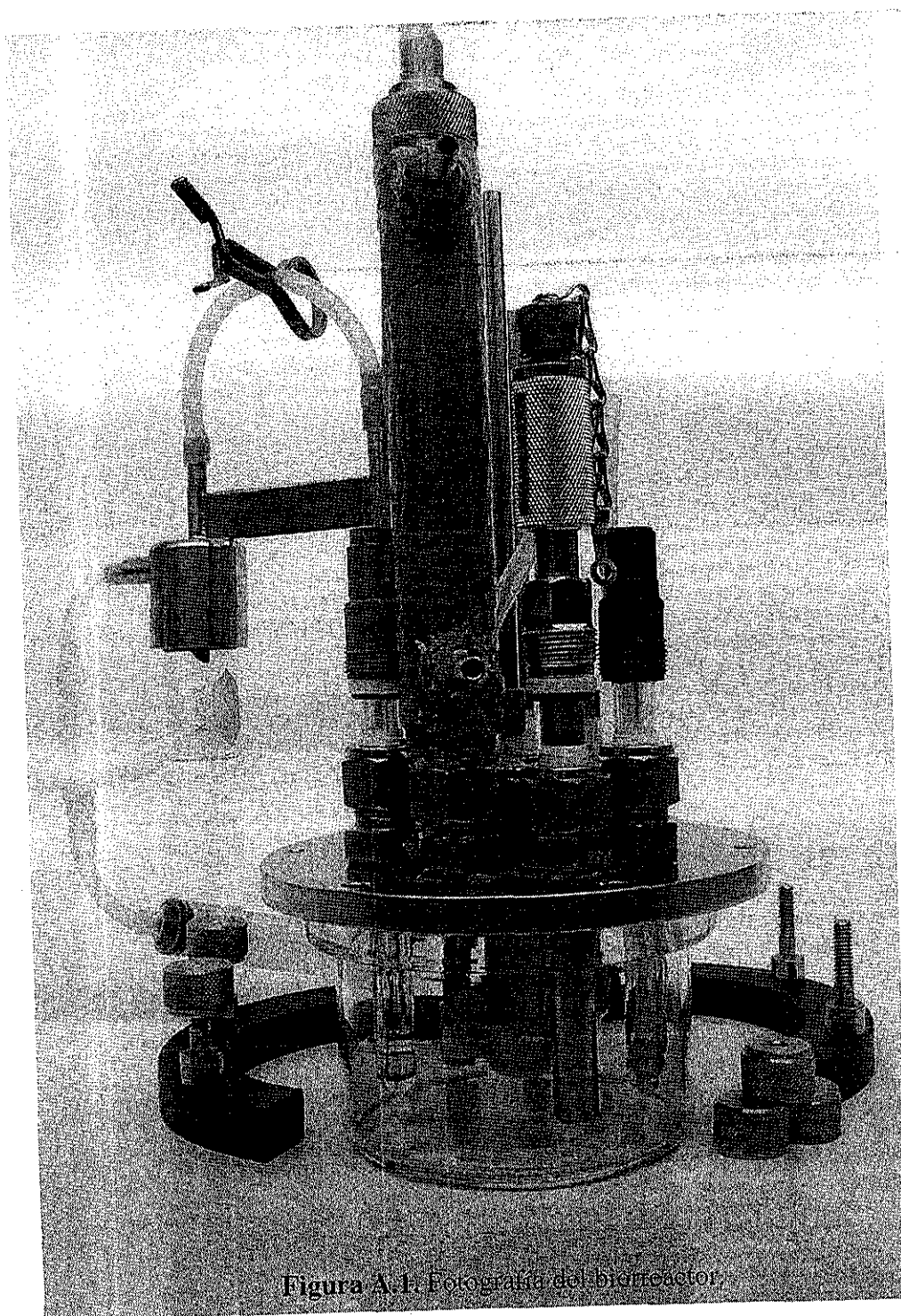


Figura A.1. Fotografía del biorreactor.

Apéndice B:

Diagrama del sistema de control y adquisición de datos

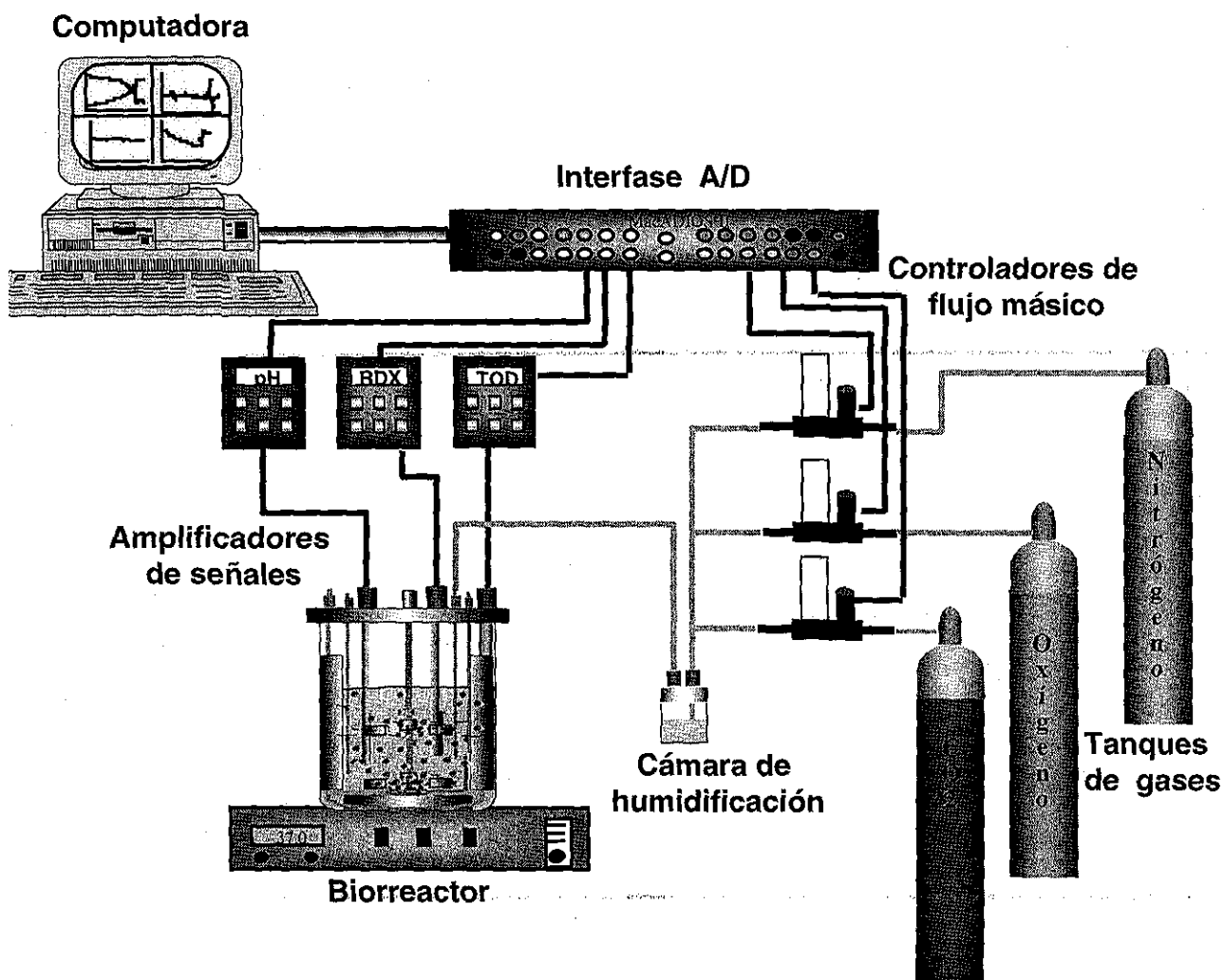


Figura B.1. Diagrama del sistema de control y adquisición de datos.

Apéndice C:

Programa de Control para la generación de ondas sinusoidales de TOD, escrito en lenguaje Quick Basic.

```

START:
LIBRARY "TurboDrivers INTERFACE"
LIBRARY "DATAMANIPULATION INTERFACE"
DIM ENT%(7): DIM EN!(7)
CLS
MENU 2,0,1,"":MENU OFF
MENU 1,0,1,"INTERACTUAR"
MENU 1,1,1,"CAMBIAR PARAMETROS":CMDKEY
1,1,"P"
MENU 1,2,1,"DETENER ":CMDKEY 1,2,"D"
MENU 1,3,1,"REINICIAR":CMDKEY 1,3,"R"
MENU 1,4,1,"TERMINAR":CMDKEY 1,4,"T"
ON MENU GOSUB INTERAC: MENU ON

PRINC:
REM"ENTRADA DE DATOS
WINDOW 2,"ARCHIVOS", (3,40)-(637,476),1
PRINT " Nombre del Archivo "
PRINT" (no repetir nombre ya usado)"
INPUT ARCHIVOS

START2:
REM"NO ABRE ARCHIVO NUEVO SINO QUE PERMITE
AGREGAR TIEMPO
REM"Y ALMACENA EN EL PROGRAMA ORIGINAL
WINDOW 2,"PARAMETROS", (3,40)-(637,476),1
TIEMADICIONAL=TIEMADICIONAL+1
INPUT "Intervalo de Adquisición de Datos (seg) ";TI!:PRINT
INPUT "Tiempo de la Fermentación (Hrs.);TFH:PRINT
PRINT "Apertura Inicial de las válvulas:"
INPUT "N2 (% de apertura de válvula inicial)"; N2I
INPUT "O2 (% de apertura de válvula inicial)"; O2I
INPUT "CO2 (% de apertura de válvula inicial)"; CO2I

ENTRADADO:
REM ENTRADA DE PARAMETROS PARA
OSCILACIONES TOD
INPUT "Setpoint de Oxígeno Disuelto"; SDO!
INPUT"Tolerancia para Oxígeno Disuelto";TOLDO
INPUT"Ganancia para Oxígeno Disuelto";GAINDO
INPUT "% de apertura de valvula de N2"; APVALN2!
INPUT "% de apertura de valvula de O2"; APVALO2!
INPUT "Periodo de Oscilacion";PER%
INPUT "% de Apertura de valv de N2 en ODUP"; N2ODUP!
PRINT "Tambien deseas controlar el pH?"
PRINT "Si (1)"
PRINT "No (2)"; INPUT OPCION:PRINT
IF OPCION>2 THEN GOTO ENTRADADO
IF OPCION=1 THEN GOTO ENTRADAPH
IF OPCION=2 THEN GAINPH=-1
GOTO CONSTANTES

ENTRADAPH:
INPUT "pH deseado"; SPH!
INPUT "Banda de Tolerancia para pH "; TOLPH
INPUT "Ganancia para control de pH ";GAINPH
INPUT "Tiempo de Control para el pH ( seg) ";
DELTA:PRINT
GOTO CONSTANTES

CONSTANTES:
PRINT "Factor de Corrección por Diferencia de Presión de las
Condiciones Estándar"
INPUT "= 1.225 para Cuernavaca"; ALFA
IF ALFA=0 THEN ALFA=1.225
PRINT ALFA
WINDOW CLOSE 2
TFS=TFH*3600
IF TI! <.001 THEN TI! =1
NP=TFS/TI!
DIM DO!(NP+10)
DIM PH!(NP+10)
DIM O2!(NP+10)
DIM N2!(NP+10)
DIM CO2!(NP+10)
DIM REDOX!(NP+10)
DIM TRH!(NP+10)
DIM TEM!(NP+10)

DIM value%(15)
DIM value!(15)
ER%=0
slot%=1
value%(0)=0
LSB=10000/4096
LSB2=.15258789062#
ER%=0
TIM1%=((N2I+O2I)*1000)/(((N2I+O2I)*10)+CO2I)
FOR bit%=0 TO 7
CALL setDoutbit (bit%,1,slot%,VARPTR(ER%))
NEXT bit%

ARCHIVO1$="CITLALI:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+AR
CHIVO$+".TR"
ARCHIVO2$="CITLALI:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+AR
CHIVO$+".PH"
ARCHIVO3$="CITLALI:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+AR
CHIVO$+".RDX"
ARCHIVO4$="CITLALI:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+AR
CHIVO$+".DO"
ARCHIVO5$="CITLALI:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+AR
CHIVO$+".O2"
ARCHIVO6$="CITLALI:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+AR
CHIVO$+".CO2"
ARCHIVO7$="CITLALI:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+AR
CHIVO$+".N2"
ARCHIVO8$="CITLALI:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+AR
CHIVO$+".TEM"

REM"SET POINT DE LOS GASES
VLT=(5000/ALFA/LSB)
VLT2=(5000/ALFA/LSB2)
FLUJOO2S!=(O2I)
FLUJON2S!=(N2I)
FLUJOCO2S!=(CO2I)
SPO2%=(FLUJOO2S!*20.30032986#)+72.43368937#
SPN2%=(FLUJON2S!*20.32695575#)+73.5293884#
SPCO2%=(FLUJOCO2S!*163.8766248#)-88.60994606#
REM"CONTADORES INICIALES PARA PROMEDIO
CON1=1
CON2=1
REM NP PUEDE SER UN NUMERO Z
COMPRESIBILIDAD
IF NP = 700 THEN COMP%=0
IF NP < 700 THEN COMP%=700/NP*(-1)
IF NP > 700 THEN COMP%=NP/700
REM" ABRE Y CIERRA ARCHIVOS PARA SALIDA DE
DATOS
OPEN "O",#1,ARCHIVO1$: CLOSE #1
OPEN "O",#2,ARCHIVO2$: CLOSE #2
OPEN "O",#3,ARCHIVO3$: CLOSE #3
OPEN "O",#4,ARCHIVO4$: CLOSE #4
OPEN "O",#5,ARCHIVO5$: CLOSE #5
OPEN "O",#6,ARCHIVO6$: CLOSE #6
OPEN "O",#7,ARCHIVO7$: CLOSE #7
OPEN "O",#8,ARCHIVO8$: CLOSE #8
REM" CREA LA PANTALLA INICIAL: DONDE DICE
UNAM IBT ...
CALL PANTALLA
INICIO:
REM" ESTABLECE LA HORA Y FECHA DE CORRIDA
TIEMPO0=TIMER
FECHAS=DATES
REM"INICIALIZA LOS CONTADORES DE TIEMPO EN
CERO

```

```

DIAS=0
TIEMPO1=TIMER+(DIAS*86400!)
TIEMPO2=TIMER+(DIAS*86400!)
TIEMPO3=TIMER+(DIAS*86400!)
TIEMPO4=TIMER+(DIAS*86400!)
CICLO:
REM"INICIA EL CICLO DE CONTROL ORIGINAL
REM" ESTABLECE QUE HA PASADO UN DIA ...
IF FECHAS<DATES THEN DIAS=DIAS+1
FECHAS=DATES
TRH= CTE + ((TIMER-TIEMPO0)+DIAS*86400&)/3600
REM ESTO SOLO LO HACE AL INICIO DE LA
CORRIDA O AL
REM AGREGAR TIEMPO: INICIALIZA TRH!
IF CON2=1 THEN TRH1=TRH
CALL cwrite(145,64,SPO2%,slot%,VARPTR(ER%))
CALL cwrite(145,72,SPN2%,slot%,VARPTR(ER%))
CALL cwrite(129,128,SPCO2%,slot%,VARPTR(ER%))
setad 0, 1, slot%,VARPTR(ER%)
setad 1, 1, slot%,VARPTR(ER%)
setad 2, 1, slot%,VARPTR(ER%)
setad 3, 1, slot%,VARPTR(ER%)
setad 4, 1, slot%,VARPTR(ER%)
setad 5, 1, slot%,VARPTR(ER%)
setad 6, 1, slot%,VARPTR(ER%)
setad 7, 1, slot%,VARPTR(ER%)
cread 0, 0, VARPTR(value%(0)), slot%, VARPTR(ER%)
cread 1, 0, VARPTR(value%(1)), slot%, VARPTR(ER%)
cread 2, 0, VARPTR(value%(2)), slot%, VARPTR(ER%)
cread 3, 0, VARPTR(value%(3)), slot%, VARPTR(ER%)
cread 4, 0, VARPTR(value%(4)), slot%, VARPTR(ER%)
cread 5, 0, VARPTR(value%(5)), slot%, VARPTR(ER%)
cread 6, 0, VARPTR(value%(6)), slot%, VARPTR(ER%)
cread 7, 0, VARPTR(value%(7)), slot%, VARPTR(ER%)
IF ER%<>0 THEN GOTO ErrorReport
CALL itos (VARPTR (value%(0)),VARPTR (value!(0)),0,7)
REM REALIZA LECTURA CON EL SENSOR DE
OXIGENO DISUELTO
DO!=(value!(0)*LSB)-0)/49.21
REM IMPRIME EN PANTALLA EL VALOR DO
FORECOLOR 33
LOCATE 39,62
PRINT USING "Oxígeno Disuelto: ###.## %";DO!
REM DETECTA CON EL SENSOR EL VALOR DE
POTENCIAL HIDROGENO
PH!=(value!(1)*LSB)-0)/337.12
REM IMPRIME EN PANTALLA EL VALOR DE PH
FORECOLOR 205
LOCATE 37,62
PRINT USING "pH:      ##.###";PH!
REM MIDE EL VALOR DE TEMPERATURA
TEM!=value!(2)
REM IMPRIME EN PANTALLA EL VALOR DE
TEMPERATURA
FORECOLOR 341
LOCATE 40,62
PRINT USING "Temperatura:  ##.## "C";TEM!
REM MIDE CON LOS SENSORES LOS FLUJOS DE O2,
N2 Y CO2 E IMPRIME LOS VALORES
FORECOLOR 33
LOCATE 37,17
PRINT "Entrada de Gases (% de Ap. de Valv.):"
FLUJOO2!=(value!(5)*100/VLT)*10*ALFA)-
3.026393799#)/7.486771309#
O2!=FLUJOO2!
FORECOLOR 273
LOCATE 38,35
PRINT USING "O2:  ###.###";O2!
FLUJON2!=(value!(6)*100/VLT)*10*ALFA)-
3.026393799#)/7.486771309#
N2!=FLUJON2!
FORECOLOR 341
LOCATE 39,35
PRINT USING "N2:  ###.###";N2!
FLUJOCO2!=(value!(7)*2*50/VLT2)*10*ALFA)-
.075538191#)/.468461404#
CO2!=FLUJOCO2!
FORECOLOR 205
LOCATE 40,35
PRINT USING "CO2:  ###.###";CO2!

REM MIDE EL VALOR REDOX Y LO IMPRIME EN
PANTALLA
REDOX!=value!(3)*LSB*.2026-509.56
FORECOLOR 409
LOCATE 38,62
PRINT USING "p Redox:      ###.## mV";REDOX!
FORECOLOR 137
LOCATE 39,95
PRINT "Fecha:      "; DATES$
LOCATE 38,95
PRINT "Hora:      "; TIMES
FORECOLOR 137
LOCATE 37,95
PRINT USING "Tiempo Transcurrido: ###.## Hrs";TRH
DO!(CON1)=DO!
PH!(CON1)=PH!
O2!(CON1)=O2!
N2!(CON1)=N2!
CO2!(CON1)=CO2!
REDOX!(CON1)=REDOX!
TRH!(CON1)=TRH
TEM!(CON1)=TEM!
FORECOLOR 33
REM" MANDA A GRAFICAR LOS VALORES
FORECOLOR 33
CALL PLOT (1,25,114,20,VARPTR
(DO!(0)),40,0,CON1,COMP%,3,1!,0)
FORECOLOR 205
CALL PLOT (1,116,205,20,VARPTR
(PH!(0)),8,6,CON1,COMP%,3,1!,0)
FORECOLOR 273
CALL PLOT (1,207,296,20,VARPTR (O2!(0)),100,-
1,CON1,COMP%,3,1!,0)
FORECOLOR 341
CALL PLOT (1,207,296,20,VARPTR (N2!(0)),100,-
1,CON1,COMP%,3,1!,0)
FORECOLOR 205
CALL PLOT (1,207,296,20,VARPTR (CO2!(0)),100,-
1,CON1,COMP%,3,1!,0)
FORECOLOR 409
CALL PLOT (1,298,387,20,VARPTR (REDOX!(0)),199,-
99,CON1,COMP%,3,1!,0)
TIEMPO5=TIMER+(DIAS*86400!)
REM RECONSTRUYE LA PANTALLA INICIAL
IF MOUSE(0) <> 0 THEN CALL PANTALLA
REM COMPARA EL TIEMPO TRANSCURRIDO CON EL
SUPUESTO INICIAL DE CORRIDA
IF TRH > TFH THEN GOTO FINAL
REM MANDA A GUARDAR EN LOS ARCHIVOS DE LA
SUBROUTINA 'SALVAR' CADA TIEMPO TI
IF (TIEMPO5-TIEMPO1) > = TI! THEN GOTO SALVAR
IF (TIEMPO5-TIEMPO4) > =PER%/2 THEN GOTO
ODDOWN
IF (TIEMPO5-TIEMPO2) > =PER% THEN GOTO ODUP
IF (TIEMPO5-TIEMPO3) > =DELTA THEN GOTO
CONTROLPH
REM "REGRESA A CICLO
GOTO CICLO
ODDOWN:
TIEMPO4=TIMER+(DIAS*86400!)
SPO2%=0
SPN2%=(APVALN2!*20.32695575#)+73.5293884#
FG%=(100*APVALN2!)/TIM1%
SPCO2%=(FG%-APVALN2!)*10*163.8766248#)-
88.60994606#
GOTO CICLO
ODUP:
TIEMPO2=TIMER+(DIAS*86400!)
TIEMPO4=TIEMPO2
DIFDO!=SDO!-DO!
IF DIFDO=TOLDO THEN
SPO2%=(APVALO2!*20.30032986#)+72.43368937#
IF DIFDO > TOLDO THEN
SPO2%=(APVALO2!*20.30032986#)+72.43368937#)+(DIFDO!
*GAINDO)
IF DIFDO! < TOLDO THEN
SPO2%=(APVALO2!*20.30032986#)+72.43368937#)-
ABS(DIFDO!*GAINDO)
SPN2%=(N2ODUP!*20.32695575#)+73.5293884#
FG%=(100*(N2ODUP!+APVALO2!))/TIM1%

```

```

SPCO2%=((FG%-
(N2ODUP!+APVALO2!)*10)*163.8766248#)-88.60994606#
GOTO CICLO
CONTROLPH:
IF GAINPH = -1 THEN GOTO CICLO
DIFPH!=SPH!-PH!
IF DIFPH!>TOLPH THEN SPCO2%=SPCO2%-
(DIFPH!*GAINPH)
IF DIFPH! < (-1*TOLPH) THEN
SPCO2%=SPCO2%+ABS(DIFPH!*GAINPH)
IF SPCO2%<0 THEN SPCO2%=0
IF SPCO2%> VLT2 THEN SPCO2%=VLT2
TIEMPO3=TIMER+(DIAS*86400!)
GOTO CICLO
SALVAR:
REM"SE SALVAN LOS DATOS EN LOS ARCHIVOS
CORRESPONDIENTES
OPEN "A",#1,ARCHIVO1$
OPEN "A",#2,ARCHIVO2$
OPEN "A",#3,ARCHIVO3$
OPEN "A",#4,ARCHIVO4$
OPEN "A",#5,ARCHIVO5$
OPEN "A",#6,ARCHIVO6$
OPEN "A",#7,ARCHIVO7$
OPEN "A",#8,ARCHIVO8$
WRITE #1, TRH!(CON1)
WRITE #2, PH!(CON1)
WRITE #3, REDOX!(CON1)
WRITE #4, DO!(CON1)
WRITE #5, O2!(CON1)
WRITE #6, CO2!(CON1)
WRITE #7, N2!(CON1)
WRITE #8, TEM!(CON1)
CLOSE #1:CLOSE #2:CLOSE #3:CLOSE #4
CLOSE #5:CLOSE #6:CLOSE #7:CLOSE #8
CON1=CON1+1
TIEMPO1=TIMER+(DIAS*86400!)
GOTO CICLO
FINAL:
REM"MARCA EL RECUADRO CUANDO LA
FERMENTACION TERMINA
WINDOW 3,,(165,100)-(370,300),2
BEEP : BEEP : BEEP : BEEP
CALL TEXTFACE (1)
PRINT
PRINT "EL TIEMPO DE FERMENTACION"
PRINT
PRINT "    HA TERMINADO"
CALL TEXTFACE (0)
BUTTON 1,1,"Continuar",(20,145)-(180,160),1
BUTTON 2,1,"Terminar",(20,175)-(180,190),1
r%(0)=175
r%(1)=20
r%(2)=190
r%(3)=180
InSetRect r%(0),-4,-4
PENSIZ 3,3
FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
DIALOGO=DIALOG(0)
WEND
INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
BOTON=DIALOG(1)
IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS: WINDOW
CLOSE 3: SYSTEM
IF BOTON=1 THEN CLS: WINDOW CLOSE 3: CALL
PANTALLA: GOTO EXTRA
INTERAC:
REM"NO SE PARA QUE FUNCIONA
NUMMENU=MENU(0): IF NUMMENU <> 1 THEN
RETURN
ARTMENU=MENU(1)
ON ARTMENU GOSUB PARAM, DETENER,
REINICIAR, TERMINAR
RETURN
PARAM:
REM"PANTALLA CUANDO SE QUIERE MODIFICAR
ALGUN DATO
WINDOW 4,,(135,25)-(380,400),2

```

```

CALL TEXTFACE (1)
PRINT "    Parámetro a modificar:"
CALL TEXTFACE (0)
BUTTON 1,1,"Tiempo de Adquisición",(20,30)-(210,45),1
BUTTON 2,1,"Tiempo de Fermentación",(20,50)-(210,65),1
BUTTON 3,1,"DISPONIBLE",(20,70)-(210,85),1
BUTTON 4,1,"Periodo de oscilación",(20,90)-(210,105),1
BUTTON 5,1,"Setpoint de OD",(20,110)-(210,125),1
BUTTON 6,1,"Setpoint de pH",(20,130)-(210,145),1
BUTTON 7,1,"% apertura valvula N2",(20,150)-(210,165),1
BUTTON 8,1,"% apertura valvula O2",(20,170)-(210,185),1
BUTTON 9,1,"Porcentaje del CO2",(20,190)-(210,205),1
BUTTON 10,1,"Ganancia DO",(20,210)-(210,225),1
BUTTON 11,1,"Tolerancia DO",(20,230)-(210,245),1
BUTTON 12,1,"% de apertura de valv. de N2 en
ODUP",(20,250)-(210,265),1
BUTTON 13,1,"Ganancia pH",(20,270)-(210,285),1
BUTTON 14,1,"Tolerancia pH",(20,290)-(210,305),1
BUTTON 15,1,"Tiempo de Control para pH",(20,310)-
(210,325),1
BUTTON 16,1,"OK",(150,330)-(200,345),1
r%(0)=330
r%(1)=150
r%(2)=345
r%(3)=200
InSetRect r%(0),-4,-4
PENSIZ 3,3
FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
DIALOGO=DIALOG(0)
WEND
INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
BOTON=DIALOG(1)
IF BOTON=16 OR DIALOGO=6 THEN WINDOW CLOSE
4: RETURN
ON BOTON GOSUB TADQ, TFER, DISPONIBLE,
PERIODO, OXI, PHD, APERTURAN2, APERTURAO2,
PORCENTAJE, GANDO, TOLEDO, SPN2ODUP,
GANPH,TOLEPH, TCONPH,
WINDOW CLOSE 4
RETURN
REM"EN LAS SIG. SUBROUTINAS SE CAMBIAN LOS
PARAMETROS MENCIONADOS
REM ARRIBA Y REGRESA A LA PANTALLA DE
CAMBIO DE PARAMETRO
TADQ:
CLS
TIO!=TI!
PRINT USING "Actual: #### ## seg. "; TI!
INPUT "Tiempo de Adquisición"; TI!
IF TI!=0 THEN TI!=TIO!
GOTO PARAM
TFER:
CLS
TFHO=TFH
PRINT USING "Actual: #### ## Hrs. "; TFH
INPUT "Tiempo de Fermentación"; TFH
IF TFH=0 THEN TFH=TFHO
TFS=TFH*3600
NP=TFS/TI
IF NP = 700 THEN COMP%=0
IF NP < 700 THEN COMP%=(700/NP)*(-1)
IF NP > 700 THEN COMP%=NP/700
CON1 = 1
CON2 = 1
GOTO PARAM
DISPONIBLE:
PERIODO:
CLS
PERO%=PER%
PRINT USING "Periodo actual: ####"; PER%
INPUT "Valor del Periodo deseado"; PER%
IF PER%=0 THEN PER%=PERO%
GOTO PARAM
OXI:
CLS
SDO!=SDO!
PRINT USING "Actual: ###.## %"; SDO!
INPUT "Setpint de OD Deseado"; SDO!

```

```

IF SDO!=0 THEN SDO!=SDOO!
GOTO PARAM

PHD:
CLS
SPHO!=SPH!
PRINT USING "Actual: ###.###"; SPH!
INPUT "pH Deseado"; SPH!
IF SPH!=0 THEN SPH!=SPHO!
GOTO PARAM

APERTURAN2:
CLS
APVALN2O!=APVALN2!
PRINT USING "Actual:###.## %"; APVALN2!
INPUT "% de apertura de valvula de N2"; APVALN2!
IF APVALN2!=0 THEN APVALN2!=APVALN2O!
GOTO PARAM

APERTURAO2:
CLS
APVALO2O!=APVALO2!
PRINT USING "Actual:###.## %"; APVALO2!
INPUT "% de apertura de valvula de O2"; APVALO2!
IF APVALO2!=0 THEN APVALO2!=APVALO2O!
GOTO PARAM

PORCENTAJE:
CLS
TIM1O%=TIM1%
PRINT USING "Actual: ###.###"; TIM1%
INPUT "Porcentaje deseado:"; TIM1%
IF TIM1%=0 THEN TIM1%=TIM1O%
GOTO PARAM

GANDO:
CLS
GAINDOO=GAINDO
PRINT USING "Actual: ###.###"; GAINDO
INPUT "Ganancia para DO deseada:"; GAINDO
IF GAINDO=0 THEN GAINDO=GAINDOO
GOTO PARAM

TOLEDO:
CLS
TOLDOO=TOLDO
PRINT USING "Actual: ###.## %"; TOLDO
INPUT "Tolerancia para DO deseada:"; TOLDO
IF TOLDO=0 THEN TOLDO=TOLDOO
GOTO PARAM

SPN2ODUP:
CLS
N2ODUPO!=N2ODUP!
PRINT USING "Actual: ###.## ";N2ODUP!
INPUT "SP para N2 en ODUP deseado:";N2ODUP!
IF N2ODUP!=0 THEN N2ODUP!=N2ODUPO!
GOTO PARAM

GANPH:
CLS
GAINPHO=GAINPH
PRINT USING "Actual: ###.###"; GAINPH
INPUT "Ganancia para pH deseada:"; GAINPH
IF GAINPH=0 THEN GAINPH=GAINPHO
GOTO PARAM

TOLEPH:
CLS
TOLPHO=TOLPH
PRINT USING "Actual: ###.## ";TOLPH
INPUT "Tolerancia para pH deseada:"; TOLPH
IF TOLPH=0 THEN TOLPH=TOLPHO
GOTO PARAM

TCONPH:
CLS
DELTAO!=DELTA!
PRINT USING "Actual: ###.## seg."; DELTA!
INPUT "Tiempo de Control de pH deseado:"; DELTA!
IF DELTA!=0 THEN DELTA!=DELTAO!
GOTO PARAM

DETENER:
REM DENTRO DE LAS OPCIONES CUANDO EL
SISTEMA SE HA
REM DETENIDO MOMENTANEAMENTE
WINDOW 5,,(165,100)-(370,300),2
CALL TEXTFACE (1)
PRINT
PRINT " EL SISTEMA SE HA DETENIDO"

PRINT
PRINT " MOMENTANEAMENTE"
CALL TEXTFACE (0)
BUTTON 1,1,"Continuar",(5,175)-(200,190),1
r%(0)=175
r%(1)=5
r%(2)=190
r%(3)=200
InSetRect r%(0),-4,-4
PENSize 3,3
FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
DIALOGO=DIALOG(0)
WEND
INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
CLS: WINDOW CLOSE 5
RETURN

REINICIAR:
REM DENTRO DE LAS OPCIONES CUANDO EL SISTEMA
SE QUIERE REINICIAR
BEEP
WINDOW 6,,(165,100)-(370,300),2
PRINT
CALL TEXTFACE (1)
PRINT " ¿ REALMENTE DESEA"
PRINT " REINICIAR ? "
CALL TEXTFACE (0)
BUTTON 1,1,"Reiniciar",(5,135)-(200,150),1
BUTTON 2,1,"Continuar",(5,175)-(200,190),1
r%(0)=175
r%(1)=5
r%(2)=190
r%(3)=200
InSetRect r%(0),-4,-4
PENSize 3,3
FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
DIALOGO=DIALOG(0)
WEND
INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
BOTON=DIALOG(1)
IF BOTON=1 THEN CLEAR:CLS:GOTO START2
IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS :WINDOW
CLOSE 6
RETURN

TERMINAR:
REM DENTRO DE LAS OPCIONES CUANDO EL SISTEMA
SE TERMINA
BEEP
WINDOW 7,,(165,100)-(370,300),2
PRINT
CALL TEXTFACE (1)
PRINT " ¿ REALMENTE DESEA"
PRINT " TERMINAR ? "
CALL TEXTFACE (0)
BUTTON 1,1,"Terminar",(5,135)-(200,150),1
BUTTON 2,1,"Continuar",(5,175)-(200,190),1
r%(0)=175
r%(1)=5
r%(2)=190
r%(3)=200
InSetRect r%(0),-4,-4
PENSize 3,3
FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
DIALOGO=DIALOG(0)
WEND
INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
BOTON=DIALOG(1)
IF BOTON=1 THEN SYSTEM
IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS: WINDOW
CLOSE 7
RETURN

EXTRA:

```

```

REM"CUANDO LA FERMENTACION HA TERMINADO Y SE
QUIERE AGREGAR TIEMPO DE MAS
WINDOW 8,,(165,100)-(370,300),2
PRINT " TIEMPO ADICIONAL DE "
PRINT " FERMENTACION (seg)"
PRINT USING "(No Exceder de ####.## Hrs.)";TFH
INPUT TA
TFS = (TFH*3600) + TA
TFH = TFH + (TA/3600)
NP = TFS/TFI
CTE = TRH
CON1 = 1
CON2 = 1
CALL PANTALLA
WINDOW CLOSE 8
GOTO INICIO
PANT:
REM PANTALLA AL INICIO DE LA CORRIDA Y DE
REGISTRO DE LA FERMENTACION
SUB PANTALLA STATIC
WINDOW 2,,(0,20)-(640,480),3
FORECOLOR 33
CALL PENSIZO (1,1)
CALL MOVETO (20,24)
CALL LINETO (20,388):CALL LINETO(616,388):CALL
LINETO(616,24):CALL LINETO(20,24)
CALL MOVETO (20,115):CALL LINETO (616,115)
CALL MOVETO (20,82):CALL LINETO (616,82)
CALL MOVETO (20,206):CALL LINETO (616,206)
CALL MOVETO (20,297):CALL LINETO (616,297)
CALL PENSIZO (1,1)
CALL TEXTSIZE (6)
CALL TEXTFONT (1)
CALL TEXTFACE (0)
REM ESCALAS DE LA GRAFICA DE DO
LOCATE 4,3: PRINT "40"
LOCATE 14,4: PRINT "0"
REM ESCALA DE LA GRAFICA DE PH
LOCATE 15,4: PRINT "8"
LOCATE 26,4: PRINT "6"
REM ESCALA DE LA GRAFICA DE FLUJO DE GASES
LOCATE 27,2: PRINT "100"
LOCATE 37,3: PRINT "-1"
REM ESCALA DE LA GRAFICA DE PREDOX
LOCATE 38,2: PRINT "199"
LOCATE 49,2: PRINT "-99"
CALL TEXTFONT (21)
CALL TEXTSIZE(9)
END SUB

```


Apéndice D: Cultivos a 10% de TOD constante (duplicado y triplicado).

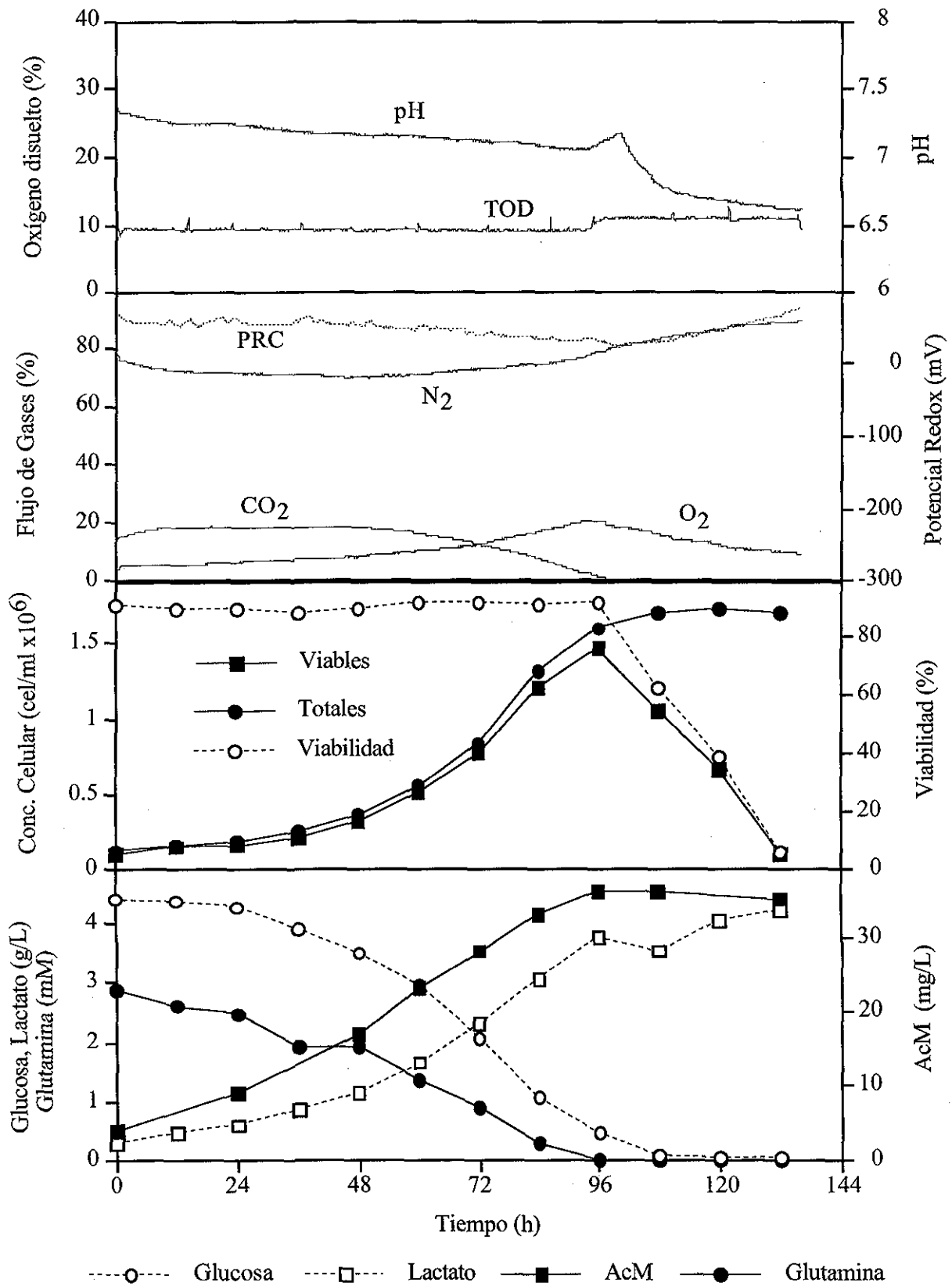


Figura D.1. Cultivo a 10 % de TOD constante (duplicado).

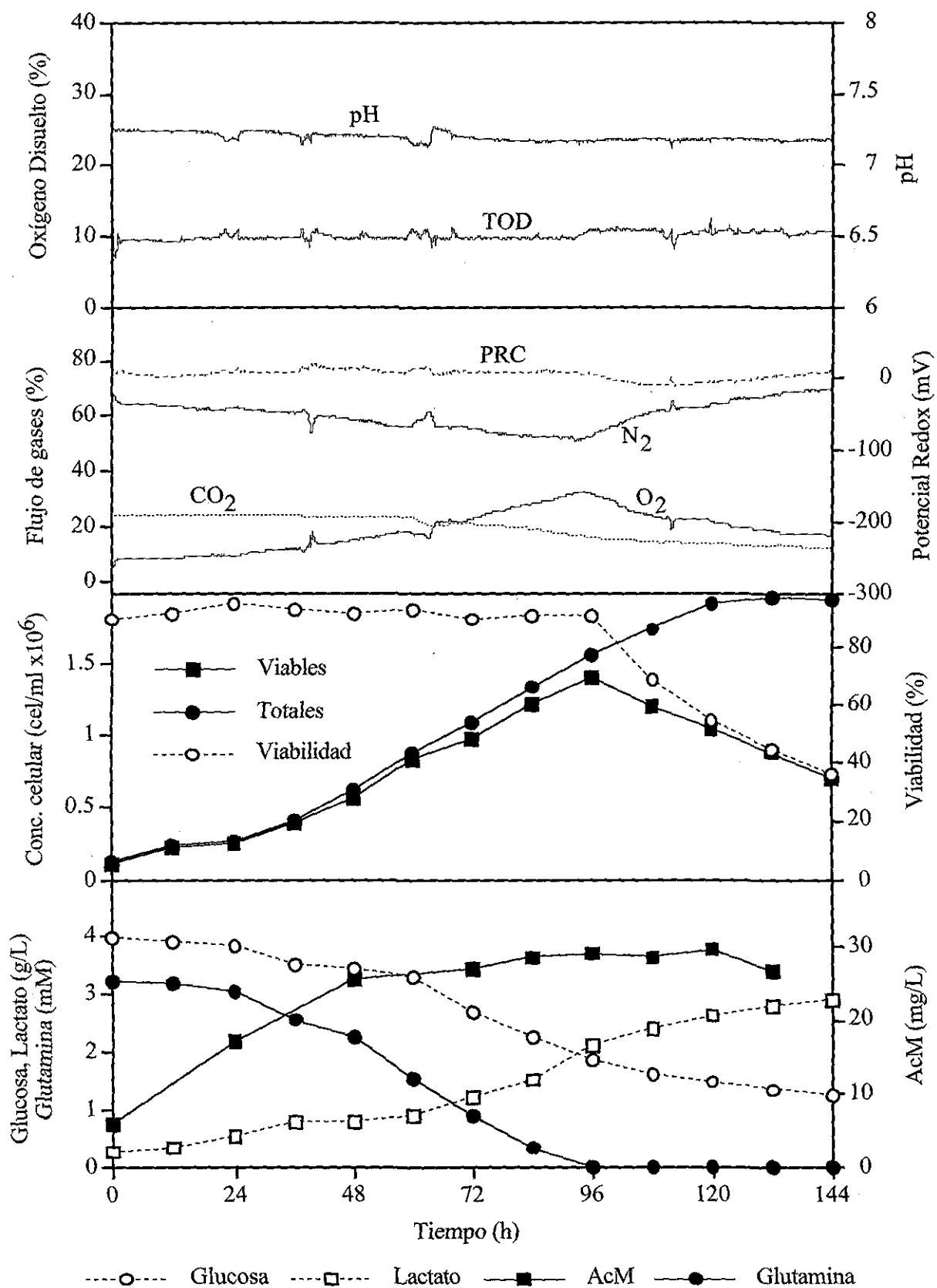


Figura D.2. Cultivo a 10 % de TOD constante (triplicado).

Apéndice E: Cultivos a TOD oscilante con un periodo de 800 s (duplicado y triplicado)

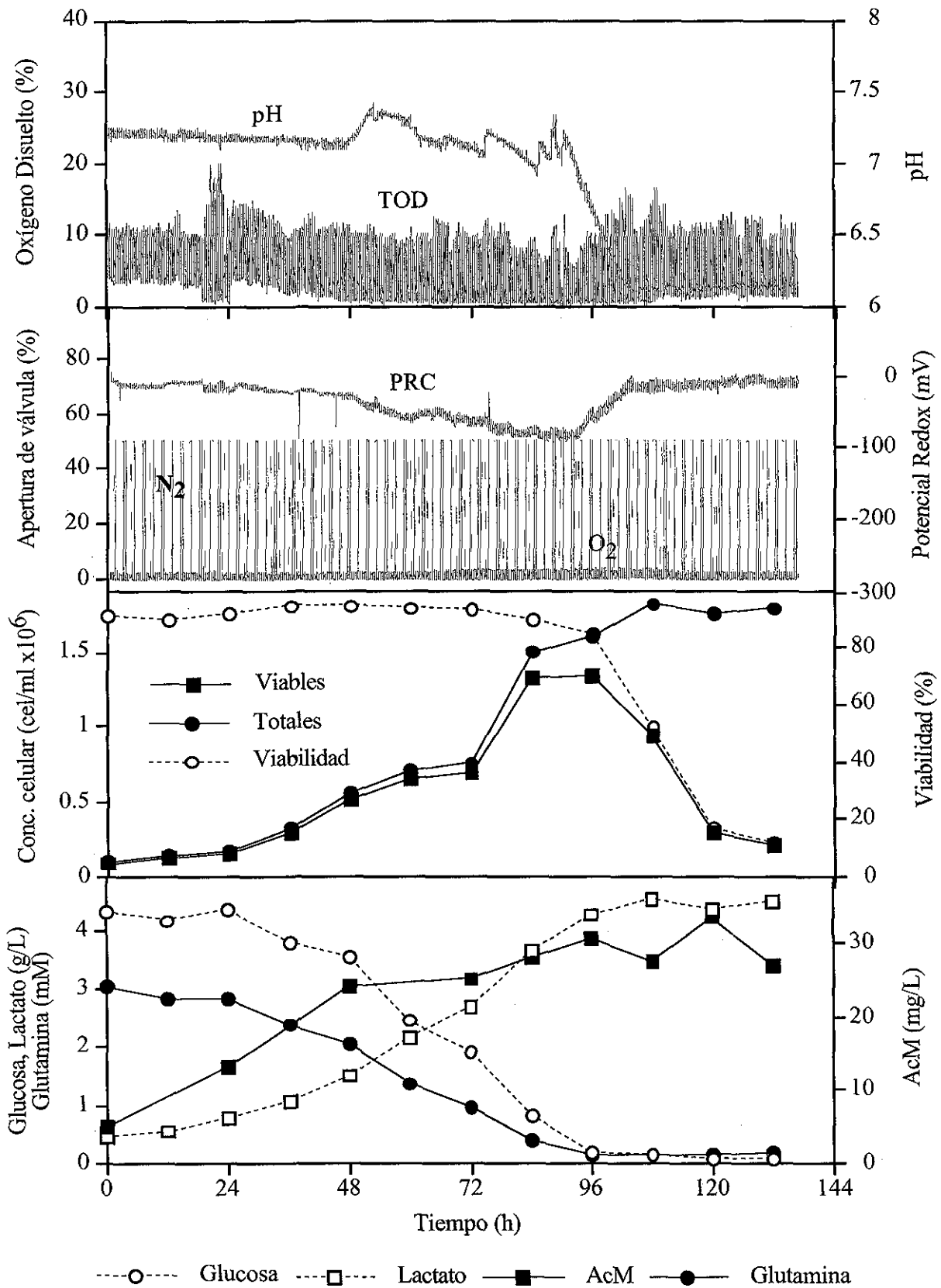


Figura E.1. Cultivo a TOD oscilante con un periodo de 800 s (duplicado).

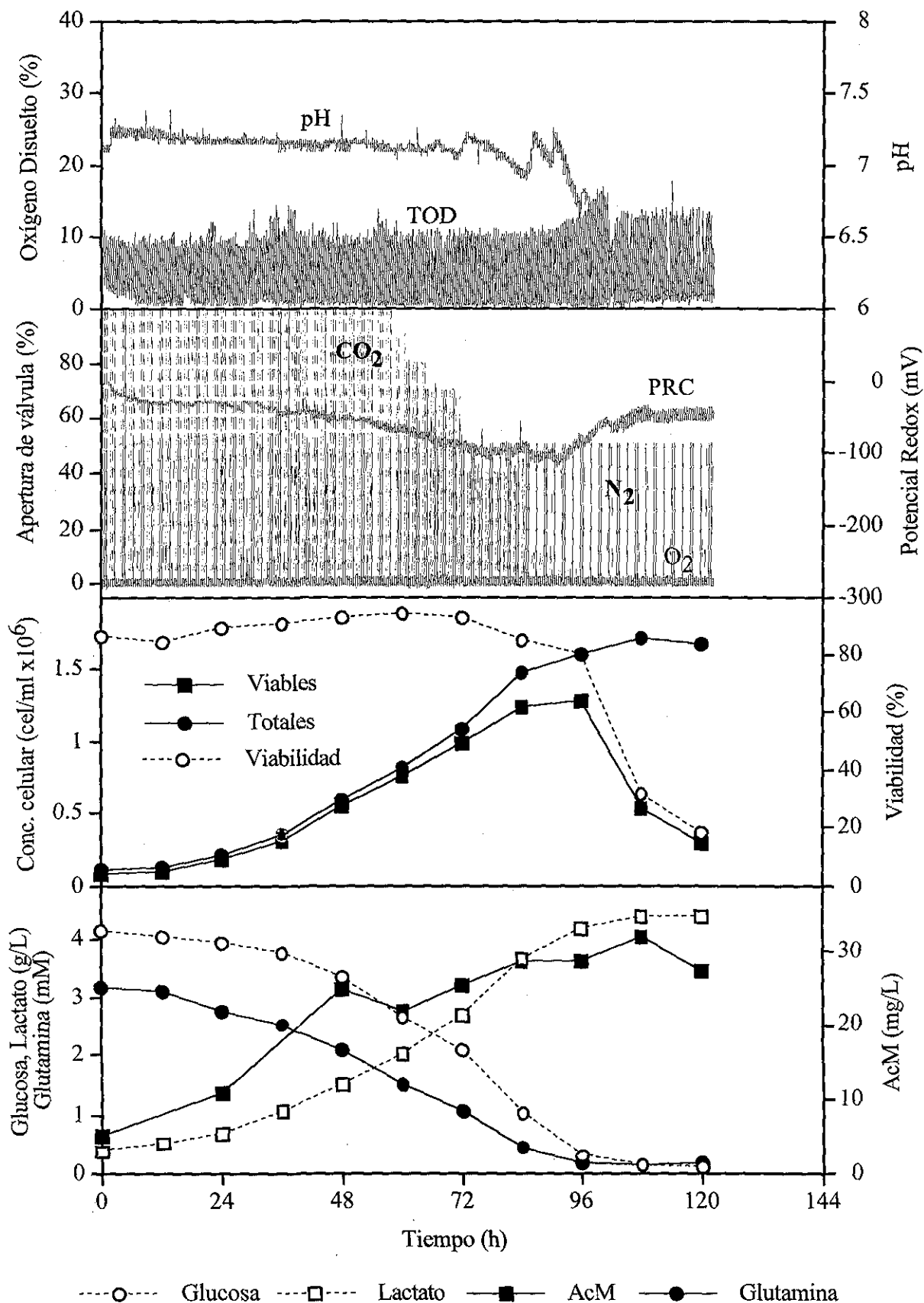


Figura E.2. Cultivo a TOD oscilante con un periodo de 800 s (*triplicado*).

Apéndice F: Cultivos a TOD oscilante con un periodo de 1,600 s (duplicado y triplicado).

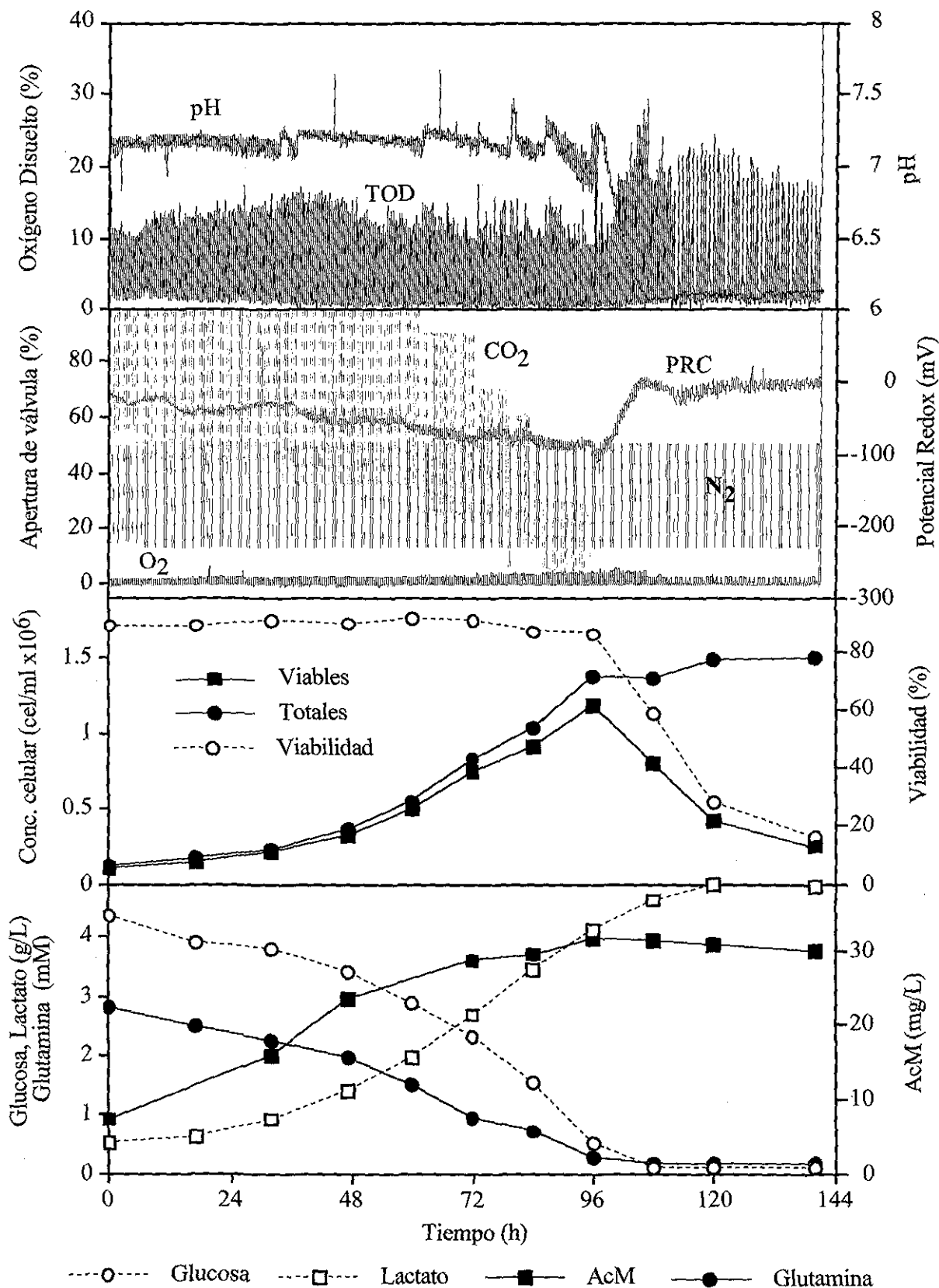


Figura F.1. Cultivo a TOD oscilante con un periodo de 1,600 s (duplicado).

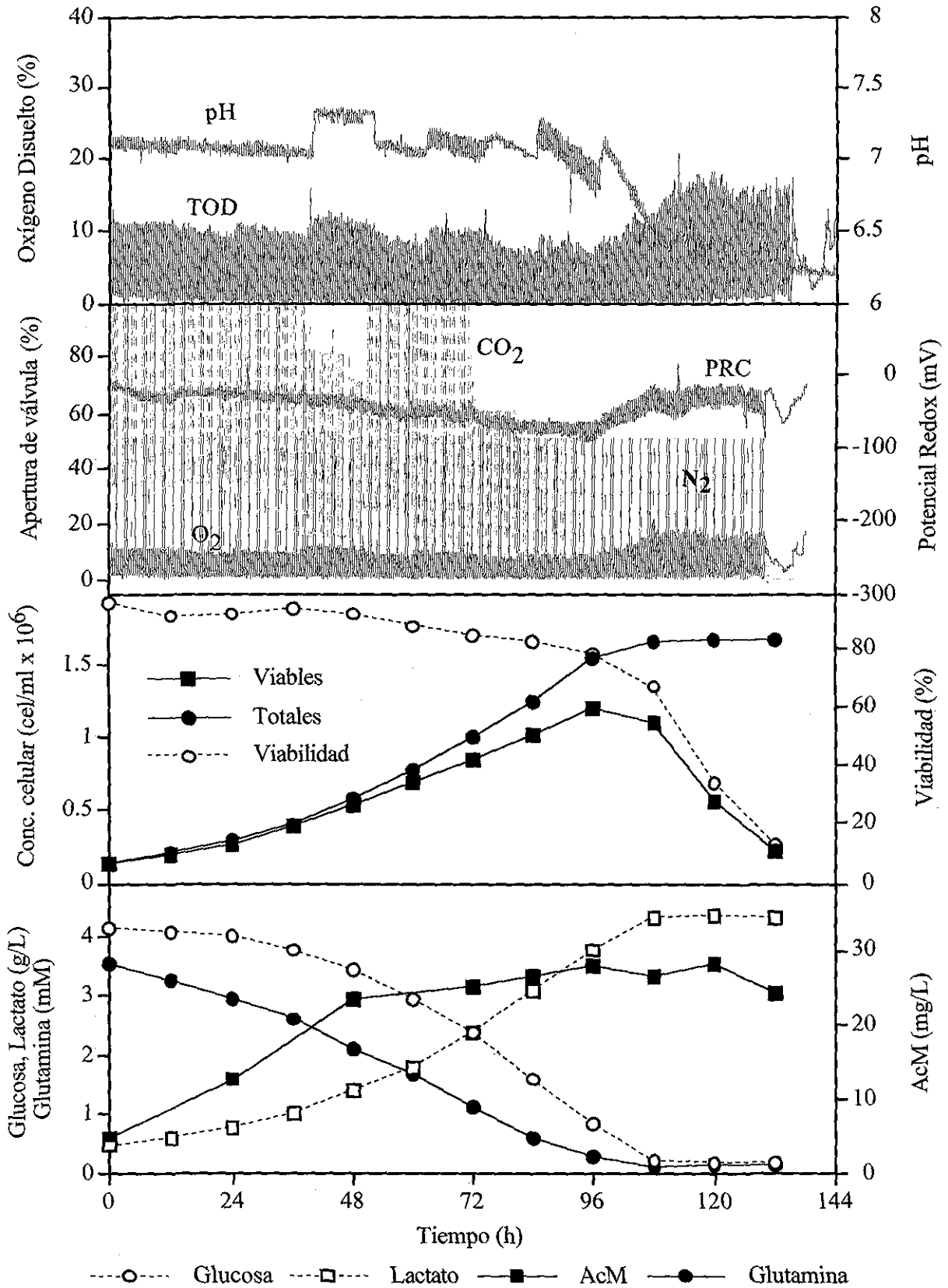


Figura F.2. Cultivo a TOD oscilante con un período de 1,600 s (triplicado).

Apéndice G: Cultivos a TOD oscilante con un periodo de 6,400 s (duplicado y triplicado).

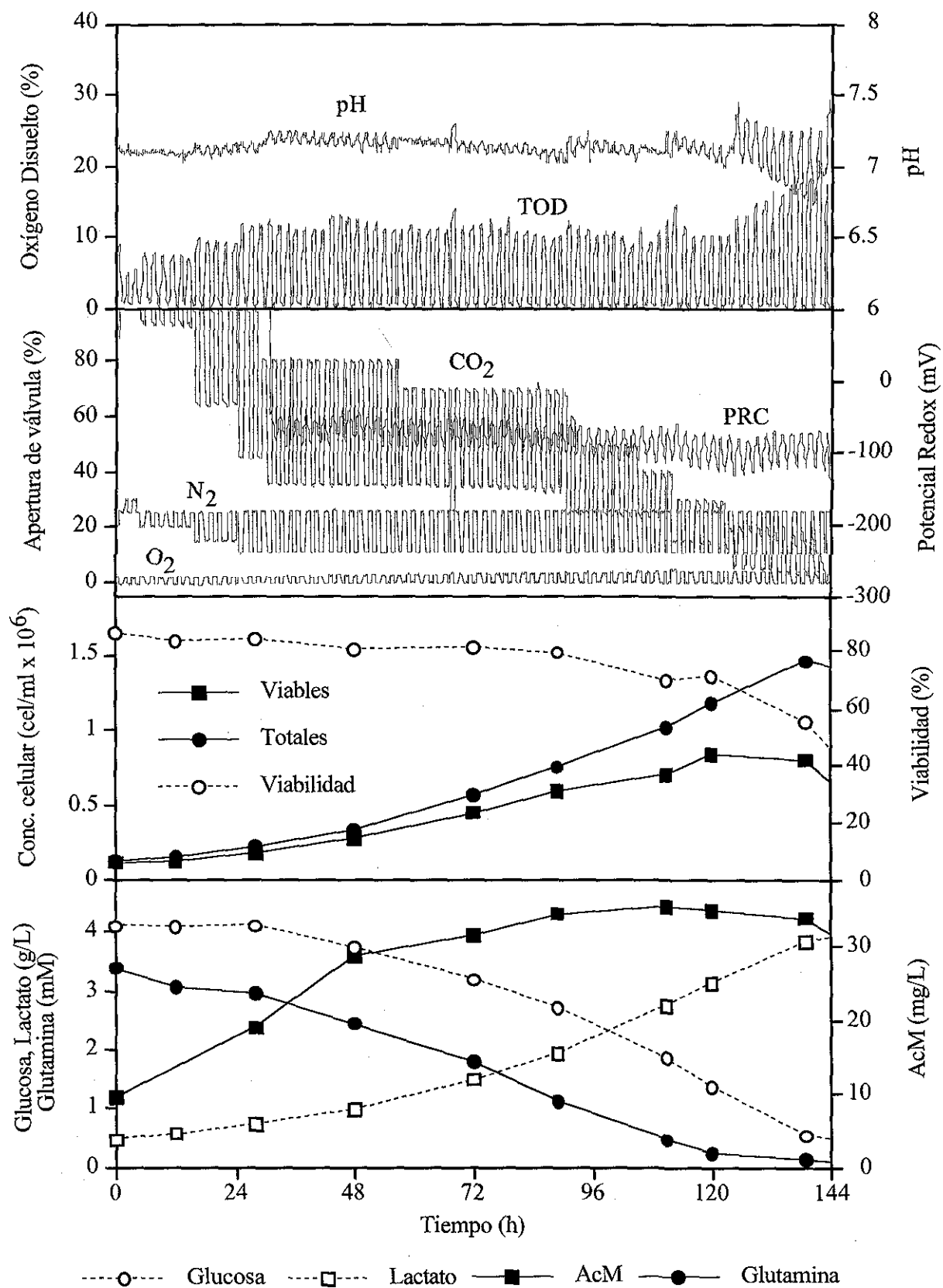


Figura G.1. Cultivo a TOD oscilante con un periodo de 6,400 s (duplicado).

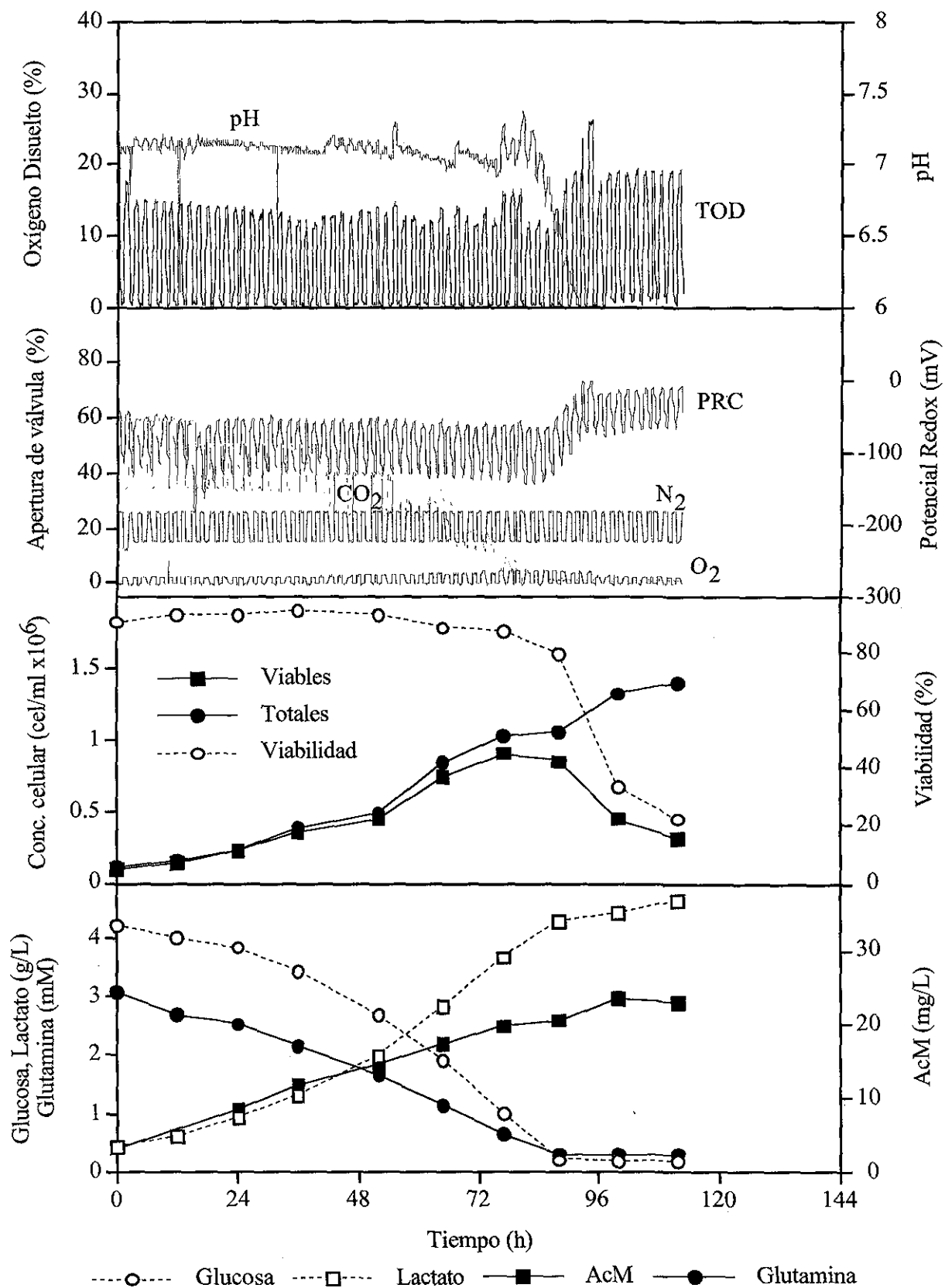


Figura G.2. Cultivo a TOD oscilante con un período de 6,400 s (triplicado).

péndice H: Cultivos a TOD oscilante con un período de 12,800 s (duplicado y triplicado).

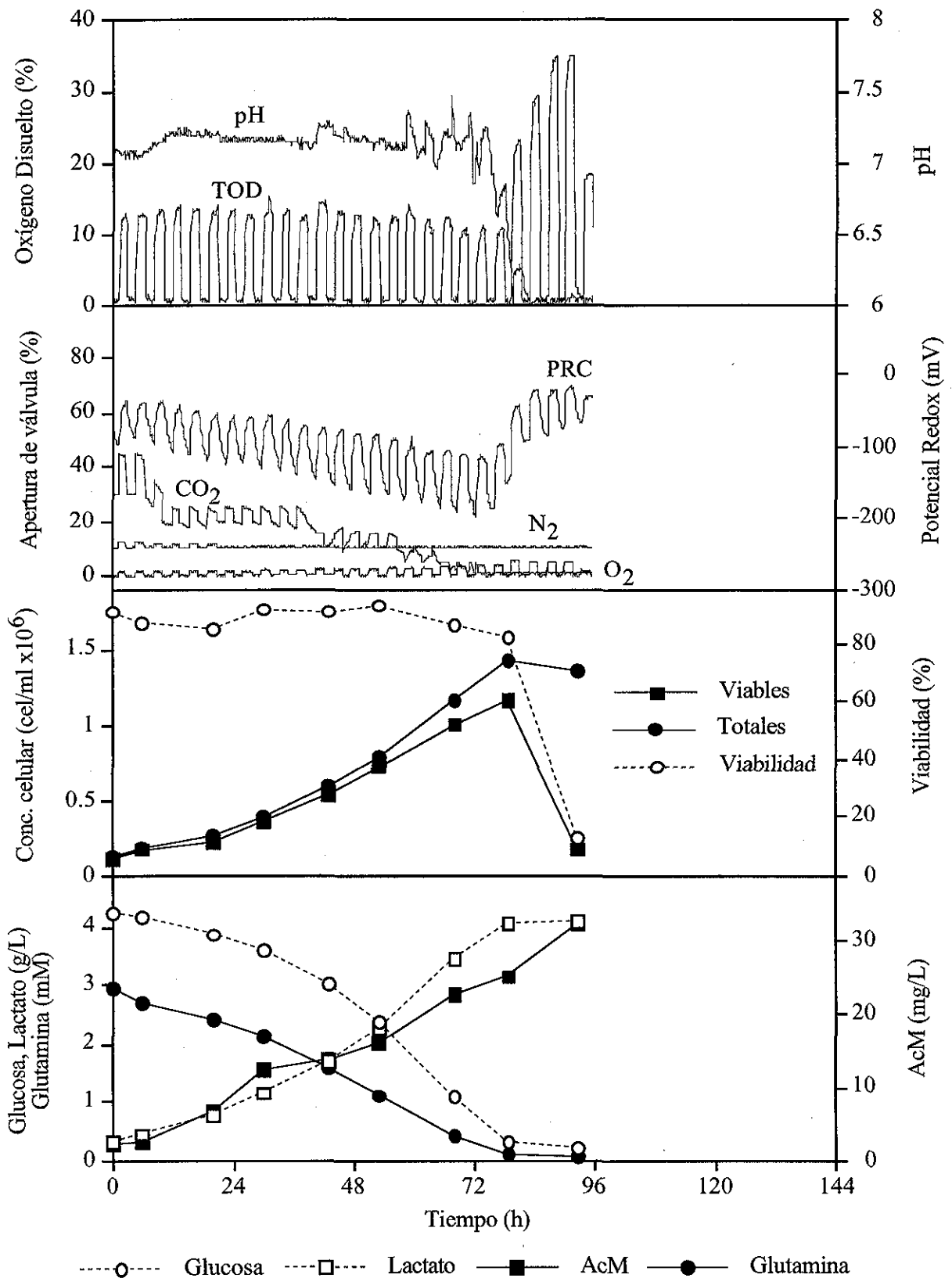


Figura H.1. Cultivo a TOD oscilante con un período de 12,800 s (duplicado).

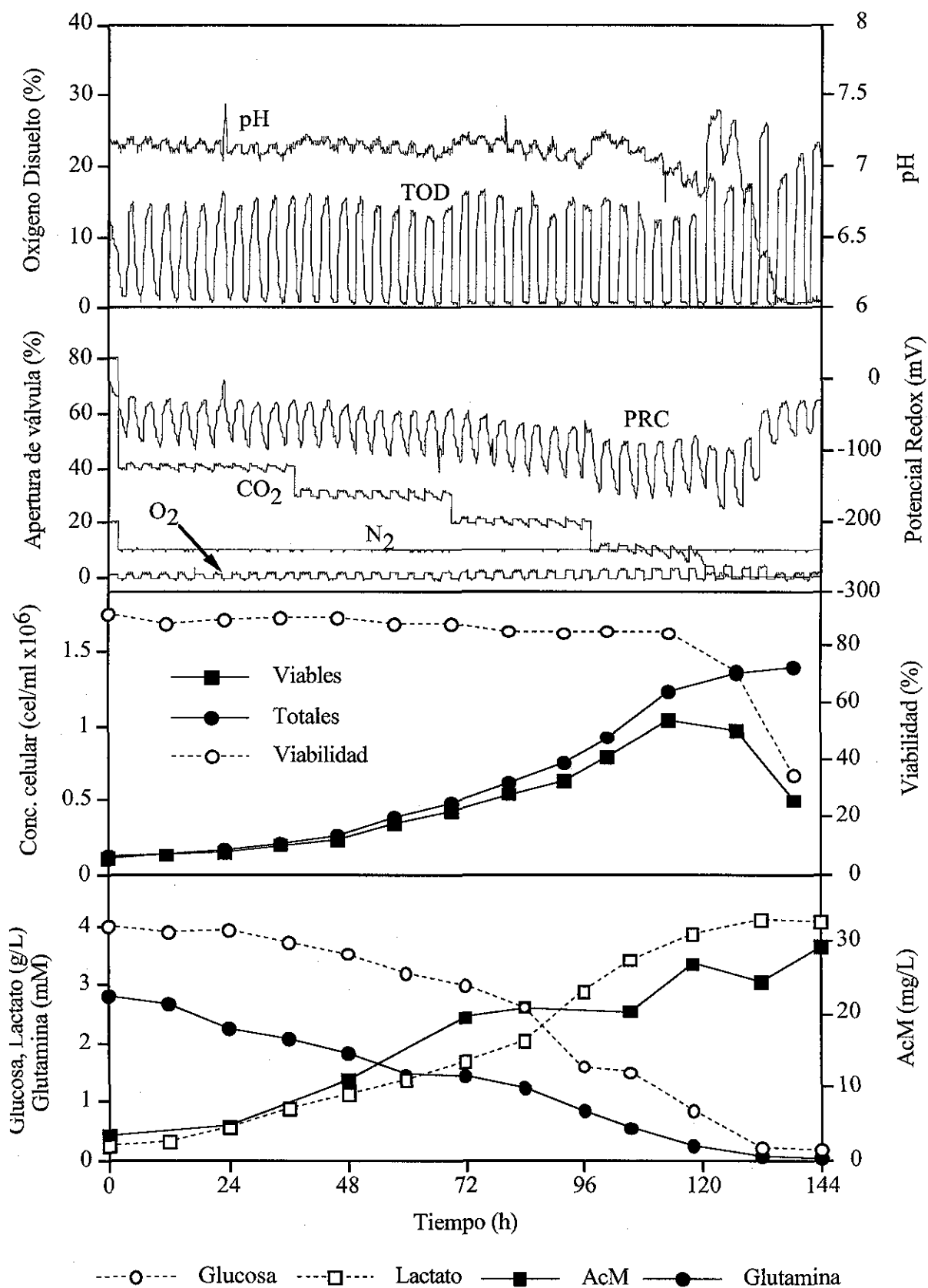


Figura H.2. Cultivo a TOD oscilante con un periodo de 12,800 s (*triplicado*).